

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Título de la tesis:**

Mecanismos reguladores en la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno, orgánica e inorgánica, en el organismo modelo *Chlamydomonas reinhardtii*

Regulatory mechanisms involved in the assimilation of organic and inorganic nitrogen in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*

**Programa de doctorado:** Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

**Directores:** Aurora Galván Cejudo y Emanuel Sanz Luque

**Autor de la tesis:** Carmen María Bellido Pedraza

**Fecha de depósito tesis en el Idep:** 25 abril 2023

TITULO: *Mecanismos reguladores en la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno, orgánica e inorgánica, en el organismo modelo Chlamydomonas reinhardtii*

AUTOR: *Carmen María Bellido Pedraza*

---

© Edita: UCOPress. 2023  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---





## TÍTULO DE LA TESIS:

**Mecanismos reguladores en la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno, orgánicas e inorgánicas en el organismo modelo *Chlamydomonas reinhardtii*.**

**DOCTORANDO/A: Carmen M<sup>a</sup> Bellido Pedraza**

Aurora Galván Cejudo, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y Emanuel Sanz Luque, Investigador Emergencia (Junta de Andalucía) en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

Informa que:

La presente Tesis Doctoral titulada “Mecanismos reguladores en la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno, orgánicas e inorgánicas en el organismo modelo *Chlamydomonas reinhardtii*” realizada por D<sup>a</sup> Carmen M<sup>a</sup> Bellido Pedraza se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba bajo nuestra dirección.

Esta Tesis Doctoral reúne todas las condiciones exigidas, según la legalización vigente. Su evolución y desarrollo ha seguido el plan de trabajo inicialmente previsto, alcanzándose los objetivos previamente marcados. Durante el desarrollo de la Tesis, la doctoranda ha realizado una labor altamente satisfactoria en el grupo de investigación.

Ha realizado dos estancias, en la Universidad de Lisboa (tres meses) y en la Universidad de Huelva (una semana), para la adquisición de competencias en las determinaciones de lípidos y carotenos, respectivamente.

Ha defendido su trabajo de investigación en Congresos Nacionales e internacionales.

Cuenta con dos publicaciones en Q1, como primera autora de trabajos originales perteneciente a su Tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 de marzo de 2023

Firma del/de los director/es

GALVAN  
CEJUDO  
AURORA -  
75385976A

Fdo.:

Firmado digitalmente  
por GALVAN CEJUDO  
AURORA - 75385976A  
Fecha: 2023.03.20  
13:35:12 +01'00'

SANZ LUQUE  
EMANUEL -  
30830733S

Fdo.:

Digitally signed by  
SANZ LUQUE  
EMANUEL - 30830733S  
Date: 2023.03.20  
17:52:42 +01'00'



Mediante la defensa de esta memoria se pretende optar a la obtención de la mención de "Doctorado Internacional", habida cuenta que el doctorando reúne los requisitos exigidos para tal mención:

1. Se cuenta con los informes favorables de dos doctores expertos, con experiencia investigadora acreditada, pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación fuera de España.

2. En el Tribunal, que ha de Evaluar la Tesis existe un miembro de un instituto de educación superior o centro de investigación de un país distinto al nuestro.

3. Parte de la redacción y defensa de esta Memoria se realizará en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España.

4. El doctorando ha realizado una estancia de investigación en el Instituto Portugués de Mar y Atmósfera (IPMA) (Lisboa, Portugal). La estancia, de tres meses de duración, se realizó gracias a la concesión de una beca de movilidad internacional "**Ayudas de Movilidad Internacional para el Fomento de Tesis con Mención Internacional**" de la Universidad de Córdoba.



*Quisiéramos dedicar este trabajo a Emilio Fernández, maestro y padre del Grupo BIO128*

*Por su fidelidad durante toda una vida a una enzima, la Nitrato Reductasa, con la que ha ido marcando hitos en el campo de la investigación.*

*Una enzima que le enseñó que se pueden reparar sus propios errores (complementación intragénica).*

*Una enzima cuya búsqueda del gen, le supuso un hito en el mundo del nitrógeno.*

*Una enzima/gen que le permitió la transformación de Chlamydomonas y elevarla a organismo modelo.*

*Una enzima que además puede formar pareja con otras y convertirla en elemento indeseable por la formación de un tóxico y hacer que se pierda lo que debemos coger. Pero a la vez, una enzima que mantiene a raya ese tóxico y volvamos a recuperar la cordura, cuando tiene otra pareja.*

*Una enzima que va a controlar el destino de la célula y lo que la célula debe almacenar para su bien.*

*En fin, toda una vida dedicada a una enzima a la que, a su vez, debemos buena parte de la vida en este planeta.*

*Gracias, Emilio por tu cariño y tu buen hacer.*



# AGRADECIMIENTOS

---

*Cuando la gratitud es tan absoluta, las palabras sobran.*

*Álvaro Mutis.*

Escribiendo este apartado de mi Tesis doctoral me he dado cuenta de que, de nuevo, pongo punto final a otra etapa. Una etapa que comenzó por aquel noviembre de 2017. Tengo bien guardado el recuerdo de aquel día, cuando por primera vez cruzaba la puerta que separa el “hall” del C6 del que no sería mi grupo BIO-128 sino mi FAMILIA del grupo BIO-128. Esta etapa, ha estado cargada de todo tipo de momentos buenos y no tan buenos, pero tengo que decir que los momentos buenos siempre han sido los más abundantes.

Quisiera empezar dando mi agradecimiento a mis “papis científicos”, Emilio y Aurora. Sé que desde el primer día que Emilio, me abrió las puertas de este grupo, ambos habéis querido lo mejor para mí. Emilio, solo decirte, que he trabajado con ilusión, y que gracias a tu sonrisa y tu valentía sobre cómo afrontar el día a día, me has ayudado a crecer en el ámbito académico y personal. Gracias, a ti también, Aurora. No tengo palabras para agradecerte todo lo que me has ayudado. Horas y horas hablando sobre ciencia. Gracias por compartir conmigo tus chistes durante la escritura de la tesis, para que así el trabajo fuese más ameno. Gracias Emilio y Aurora por formar esta familia tan bonita porque estar en el laboratorio, para mí es estar en casa.

Emanuel, la templanza que te caracteriza junto con tu pasión por la ciencia hacen de ti no solo un gran científico, si no también, una magnífica persona. Gracias, por estar siempre que te he necesitado. Solamente decirte, que he trabajado con ilusión y que a pesar de que hemos tenido días de todo tipo, me quedo con mis momentos favoritos; que, a parte de nuestros ricos desayunos para empezar a trabajar con las pilas bien cargadas, siempre serán, aquellos que me permitían cruzar rápidamente el pasillo que une el laboratorio con tu despacho para darte buenas noticias sobre los resultados. Gracias, por alimentar aún más, mi vocación por la ciencia. Gracias por ayudarme a crecer en el ámbito personal y profesional.

Ángel, muchísimas gracias por resolverme mis dudas cada vez que te he preguntado, por aconsejarme y ayudarme.

Manolo, muchísimas gracias por tus consejos que han sido muchos debido a nuestros trayectos para ir y venir a Montilla. Gracias por adaptarte a

mis horarios cuando tenía experimentos largos y gracias por ayudarme con el PC cada vez que lo he necesitado. Gracias por todo lo que me has ayudado.

Maribel, gracias por cuidarme las *Chlamydomonas* y por supuesto por ayudarme con los cruces. Eres una gran persona y sabes que te quiero un montón. Muchas gracias, por ayudarme siempre que te he necesitado.

David, mil gracias, por confiar en mí. Por enseñarme a utilizar el Cromatógrafo de Gases y por escucharme cada vez que lo he necesitado.

Alexandra, mil gracias por nuestras risas contagiosas a carcajadas. Gracias, por escucharme, apoyarme y, sobre todo, por ayudarme a confiar en mí.

Chudi, super jefaza. Gracias por esos ricos pisquitos de jamón para nuestros desayunos en el laboratorio. Gracias por enseñarme el término tan útil en la vida de “super-paso”. Gracias por ser tan divertida y alegre. Gracias por ser mi compi más fiestera.

Goyi, muchas gracias por tus visitas y nuestros cafelitos y charlitas de media tarde. Gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Victoria, gracias por ser mi apoyo desde que llegue al laboratorio. Gracias por ensayarme todo lo que me has enseñado. Gracias por estar, a pesar de la distancia que nos separa.

A todos mis doctorandos, Jesús, Caterina, Esperanza, Sara y Noelia. Gracias, por ser un buen equipo de trabajo. Por tenernos y por apoyarnos siempre. Ya sabéis, el camino no es fácil, pero al final todo se consigue.

Ainoa y Aitor, no sabéis cuanto os he echado de menos. Gracias por nuestra media mañana a las 12.00 h en las escaleras de emergencia y por todos los momentos que hemos compartido y los que están por venir.

My sister, Neda. I miss you a lot, but I am happy because I know that you are happy. Thank you to call to me when I need and to demonstrate to my, that the distance cannot separate the real friends.

Solamente deciros, a todos que OS QUIERO UN MONTÓN.

A mi grupito de “Doctorandas miniTeam” hemos sido y seremos apoyos incondicionales mutuos. Me siento orgullosa de vosotras mis chicas.

Muchísimas gracias a Vidal Barrón y a su grupo, por acogerme desde el principio y ser una más desde que empezamos a trabajar con el Picarro.

Muchísimas gracias a Rosa León y a su grupo, en especial a Ana M<sup>a</sup> Molina. Por enseñarme un poquito sobre HPLC y sobre todo por pasar juntas unos días magníficos en Huelva.

Afirma Michael J. Fox que *“La familia no es algo importante, lo es todo”*. Es mucho lo que tengo que agradecer a mi familia y difícil de expresar en un papel todos mis sentimientos porque quien bien me conoce, sabe que soy de lágrima fácil. Dar las gracias a mis padres, Miguel y Sole por su apoyo incondicional.

A mi padre, del cual no puedo estar más orgulloso. Tengo que decir que, si siempre lo he estado, ahora mucho más debido a tu nombramiento como *“Maestro Artesano de la Forja por la Junta de Andalucía”* distintivo que hasta el momento solamente recae en 4 personas y tú eres una de ellas. Decirte, que el abuelo, segurísimo estará muy pero que muy orgulloso de ti. Cambie los hierros, la fragua, el carbón y esos planos tan gigantes con los que trabajas, por *Chlamydomonas*, medios de cultivo, nitrato, nitrito y expresión de genes; pero si algo nos une, además de nuestros hoyuelos en las mejillas cuando sonreímos es por ser un poco cabezones y pacientes a la vez para conseguir lo que nos proponemos; y nunca mejor dicho, tú luchando por la pasión que heredaste del abuelo; la forja y yo luchado por ser científica. Papá, gracias por nuestros momentos de aventuras y de locuras, por ser tan divertido, por escucharme siempre y ser siempre mi hombro en el que puedo apoyarme. Te quiero, papá.

A mi madre, mujer ejemplar y luchadora, el pilar más importante de mi vida. Mamá, gracias por estar SIEMPRE. ¿Qué te digo que ya no sepas? Gracias por hacerme tan fuerte, por escucharme cada vez que lo necesito, por prepararme esos ricos *tuppers* para comer en el laboratorio y por apoyarme desde el primer momento en que te dije que iba a empezar a hacer mi tesis doctoral. Ahora, doy un pasito más, pero este pasito, ha sido gracias a que tú, nunca me has soltado de la mano. Gracias, por seguir alimentando esa llamita científica, que como bien sabes, empezó a florecer en mi desde bien pequeña. Gracias, por nuestros paseos para despejarme. Siempre te estaré eternamente agradecida por todo lo que has hecho y seguro que seguirás haciendo por mí. No hay madre mejor que tú. Te quiero, mamá.

A mi hermana Clara, que es mi hermana y mi mejor amiga. Déjame decirte que *“No dejes de soñar”* como bien dice una de nuestras canciones favoritas. Sigue luchando por convertirte en esa diseñadora de moda porque *“hay una estrella en tu interior y sé que tú no la puedes ver”* pero yo sí. Trabaja como hasta ahora, en silencio, pasito a pasito porque al final los sueños se cumplen. Gracias por las risas compartidas, por hacerme comidita rica, por preocuparte de mis *looks de*

*moda* cuando yo estaba a tope con mis experimentos y la redacción de mi tesis. Gracias, por nuestros momentos de locura, por compartir la vida a mi lado. Gracias por convencer a papá y a mamá para poder tener un perrito en casa, nuestro Cocó. Nuestro perrete Coqui llegó a casa para ser uno más en la familia y, como no, para unirse a nuestras locuras que en casa aportarían ese toque de risas y buenos momentos por los que nos caracterizamos. Te quiero rata.

Juan Carlos, gracias por aparecer en el momento justo. Siempre serás mi cuñado favorito. Gracias por integrarte en casa como uno más desde el primer momento. Gracias, por comprarme algún que otro dulce, para animarme cuando más lo necesitaba. Gracias por cuidar a mi hermana y quererla tanto como yo.

A ti, mi mejor amigo y mi fiel compañero de viaje. Dani, mil gracias por estar siempre ahí. Mil gracias por animarme cuando más lo he necesitado, por hacerme reír a carcajadas, por escucharme y por acompañarme en esta maravillosa etapa. Gracias por ser mi apoyo fundamental. Mil gracias por todo, sobre todo por entenderme. Posdata: Gracias por acompañarme algún que otro día al laboratorio y rotularme los tubitos. ¡Te quiero!

Papi, mami, Dani, Her, Juan Carlos y Coqui... solo quiero decirles que mil gracias por todo, sobre todo por apoyarme y comprender mi pasión por la Ciencia, por estar siempre, pero sobre todo en los días de más nervios y estrés y darme ese empujón para no caer. *¡Qué bonito es saber que siempre estáis ahí!* ¡Os quiero Tukis!

A mis abuelos Enrique y Encarna. Seguramente por ser los abuelos más divertidos del mundo. A ambos, por enseñarme tanto sobre la vida, pero sobre todo a mi abuela Encarna, mujer guerrera y valiente. Gracias abuela, porque sin tu saberlo, me has enseñado a ser muy fuerte y preocuparme por lo que realmente importa. ¡Te quiero mujer de las mil batallas!

A mi abuela Trini mi pastelera favorita y mi ángel de la guarda, mi abuelo Miguel. Abuelo, gracias por inculcarme desde muy pequeña tu pasión por la naturaleza o mejor dicho como tu bien decías “por los bichos”. Mil besos al cielo.

A todos mis tíos, pero en especial a mis tíos Yolanda y Antonio, Merche y Nacho. Gracias por ser mis segundos papis, por confiar en mí y por apoyarme siempre. Por ser ese pilar, fundamental para poder conseguir sueños. Por llamarme para recordarme que “era capaz”. Tita Yolanda y tita Merche, mis mujeres guerreras, ¡os quiero!

A mi prima María. Divertida, responsable y perfeccionista son los adjetivos que mejor la describen. Con su sonrisilla de mujercita de 12 años hace que junto con ella viajes al fin del mundo. Te quiero “pizco”.

A mi familia política, ya que es mi familia, por recibirme con los brazos abiertos y ser una más en casa desde el primer día. Un agradecimiento especial para Inma. Gracias Inma, por apoyarme, por llamarme y preocuparte por mí.

A todos mis amigos, que sois los mejores, pero vosotros sabéis bien quienes sois. Muchas gracias por TODO, por nuestras risas, por ser hombro y apoyo cuando más lo he necesitado, por nuestros días al solecito, por nuestras celebraciones varias, si total, da igual lo que celebremos, lo bueno es juntarse, por nuestros brindis y como no, por nuestros besos y abrazos. Quisiera tener un agradecimiento especial a:

A mi familia de La Caña. Gracias Paco y M<sup>a</sup> del Mar. Gracias, Cuqui y Paco junior. Toda una vida juntos. Gracias por esos días de piscina y fiestas de verano incansables. Gracias familia, ¡os quiero!

A mi rubio, mi David García. Gracias David por ser, desde hace 23 años uno más en casa. Por ser ese hermano gemelo de mi hermana. Gracias, por todo David, ¡ya sabes cuanto te quiero!

A mis compañeras de piso: Ester, M<sup>a</sup> Carmen, Patricia, María y M<sup>a</sup> Paz. Muchas gracias, chicas, por nuestras salidas al centro, nuestras cenas ricas, nuestros ratitos de sofá y series que tanto nos gustaban, aunque yo...con la música, ya me quedaba dormida. Muchas gracias, por despertarme del sofá cuando me quedaba dormida. ¡Os quiero!

A Irene y Manolo. Mis mejores amigos. ¡Que deciros que no sepáis! Pues solamente, que gracias, porque en esta etapa habéis sido un apoyo fundamental. Gracias por dejarme ser la tata más feliz y afortunada del mundo. A mis dos soles, mi Manueli, que siempre será mi ojito derecho y mi Irene Junior mi ratita presumida. Con vuestras risas, soy muy pero que muy feliz. ¡Os quiero!

A mi amiga Irene Chacón. Irene, gracias, por TODO. Cerca o lejos, no hay distancia para nosotras. Gracias, por venirte conmigo unos días a Portugal mientras hacia mi estancia. Siempre recordaré como algo especial aquel día en la feria cuando vimos a los portugueses bailando “La Macarena”. Gracias, por tu amistad. Te quiero.

A mi “chusta favorito” mi amigo F.A. Casado. Siempre estaré orgullosa de ti. Has conseguido todo lo que te has propuesto. Gracias, por ser siempre tan tú,

por ponerme la música a todo volumen en el coche y por compartir tantos y tantos momentos juntos.

A Marta y Enrique por todos los ratitos tan divertidos, nuestras cenas ricas y nuestros días de natación. A Marta, por nuestras charlitas y nuestros audios de algunos que otros minutos para “contarnos un poco”. Gracias, por apoyarme siempre.

A Juan y Leti, por preocuparse tanto por mí y por llamarme un “ratito” para desconectar un poco. Gracias por vuestras visitas rápidas, para “no molestarme”. Gracias, chicos por vuestro apoyo.

A mis amigos de mi Hermandad, o mejor dicho a mi FAMILIA de mi Hermandad. Gracias, a todos por quererme tanto y por preocuparos tanto por mí. Gracias por todas nuestras risas y todos los momentos compartidos. Gracias por ser esa familia tan bonita.

A mis ángeles de la guarda, las estrellas que más brillan en el cielo, pero en especial a mi tita Charoni. Sé que más que nadie hubieras disfrutado este momento a pesar de no entender nada o casi nada. Siempre te tengo presente. Allá donde estés, sé que me cuidas y sé, que tú más que nadie me has dado fuerzas para conseguir todo lo que me he propuesto.

*“La sonrisa es mía pero el motivo sois vosotros” Toy Story*

*A todas las personas que me quieren y que se preocupan por mí.  
A los que han estado y estarán apoyándome y ayudándome  
siempre.  
Gracias, por compartir este trabajo tan bonito  
y pasión conmigo llamado  
**Ciencia.***



## **RESUMEN/ABSTRACT**

---



# RESUMEN

---

Las algas son organismos fotosintéticos presentes en una gran diversidad de ecosistemas. Estos organismos son los productores primarios dominantes en la tierra y tienen un papel primordial en la producción de O<sub>2</sub>, fijación de CO<sub>2</sub>, ciclo del nitrógeno (N) y en la estabilización de los ecosistemas. Sin embargo, su alta capacidad de proliferación en condiciones de exceso de nutrientes, como las producidas por la contaminación de diferentes nichos acuáticos, también es la causa de la eutrofización de estos ecosistemas. Desde un punto de vista biotecnológico, algunas algas tienen un alto valor debido a su interés alimenticio, nutracéutico y su capacidad de producir compuestos de valor añadido.

*Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga verde que se ha desarrollado como un organismo modelo y que ha permitido conocer a nivel bioquímico, genético y molecular una gran cantidad de procesos biológicos, entre los que destacamos la asimilación de nitrógeno (N). Esta microalga también ha permitido abordar las bases para entender las interacciones mutualistas con bacterias, basadas en el intercambio de carbono (C) por nitrógeno. En las últimas décadas, *Chlamydomonas* también ha emergido como un organismo con un gran potencial biotecnológico en procesos de biorremediación y producción de biocombustibles.

*Chlamydomonas*, al igual que las plantas, puede utilizar fuentes de N inorgánico como amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y orgánico (aminoácidos, urea, úrico, etc.). Sin embargo, existe una preferencia de unas formas de N sobre otras, que obedece a mecanismos reguladores. Además, en condiciones de exceso de N (fundamentalmente NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), las algas pueden generar el gas de efecto invernadero óxido nitroso (N<sub>2</sub>O).

En este trabajo hemos intentado avanzar en el estudio de cómo el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como nutriente o como molécula señal, impacta en otras rutas en *Chlamydomonas*. En primer lugar, estudiamos la desasimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub>O (Capítulo 1). En segundo lugar, abordamos el papel del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como molécula señal, sobre la asimilación del nitrógeno orgánico, la acumulación de almidón, lípidos, compuestos carotenoides, y clorofila (Capítulo 2). Finalmente, un análisis transcriptómico, junto con un estudio de promotores y de factores de transcripción, nos ha permitido sugerir nuevos papeles reguladores mediados por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NIT2 (Capítulo 3).

**Capítulo 1.** El óxido nitroso ( $N_2O$ ) es un potente gas de efecto invernadero cuya producción y liberación está aumentado considerablemente durante las últimas décadas, en gran parte por causas antropogénicas. Para el estudio de la desasimilación de  $NO_3^-/NO_2^-$  hasta  $N_2O$  por microalgas, nos hemos planteamos los siguientes objetivos. 1) Búsqueda de genes implicados en dicho proceso que estén presentes en los genomas de algas (*NIRK*, *CYP55*, *FLV* y *HCP*) y el establecimiento/validación de una estrategia para estudiar la desasimilación de  $NO_3^-/NO_2^-$  a  $N_2O$  en *Chlamydomonas*. Para ello se ha utilizado la metodología de espectroscopia CRDS (*Cavity Ring-Down Spectroscopy*) que permite monitorizar las concentraciones de  $N_2O$  y  $CO_2$ , de forma continua, y hemos usado estirpes de *Chlamydomonas* en las que se ha interrumpido la asimilación de  $NO_3^-/NO_2^-$  mediante la mutación  $NO_2^-$  reductasa (NiR). Esto nos ha permitido conocer el papel de diferentes actores involucrados en este proceso de desasimilación como son NIT2 (el regulador maestro de la asimilación de  $NO_3^-$ ); NIT1/NIA1 ( $NO_3^-$  reductasa), ARC/NOFNiR (Nitrito reductasa formadora de NO que funciona junto a la NR), CYP55 y FLV (NO reductasas, mitocondrial y cloroplástica, respectivamente).

Los resultados han permitido proponer que el complejo NR/ARC tiene un gran impacto en las emisiones de  $N_2O$  tanto en luz como en oscuridad, a través de la producción de NO. Que ambas CYP55 y FLV son necesarias, como NO reductasas, para que se produzcan altas emisiones de  $N_2O$ . Dado que FLV y CYP55 tienen localizaciones diferentes, se sugiere que debe existir una coordinación mitocondria-cloroplasto para dicho proceso. Además, en este Capítulo hemos estudiado cómo estas condiciones que favorecen la producción de  $N_2O$  impactan en el metabolismo central de las algas y afectan las emisiones de  $CO_2$ .

**Capítulo 2.** El papel de  $NO_3^-$  como señal, independiente de su asimilación, se ha estudiado en estirpes de *Chlamydomonas* que no pueden reducir  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , pero donde se genera una situación diferente a la falta de N. Los resultados indican que muchos de estos efectos del  $NO_3^-$  están mediados por el gen regulador NIT2 y determinan una inhibición de la gametogénesis, inhibición de la asimilación de formas de nitrógeno orgánico, evita la degradación de la clorofila y permite mantener una actividad fotosintética apropiada, y a la vez sintetizar más almidón, pero menos triacilglicéridos (TAGs). El mantenimiento de los niveles de DGDG (*DiGalactosylDiacylGlycerol*; un lípido de la membrana del tilacoide), compuestos carotenoides y clorofila apoyan al efecto de  $NO_3^-$ /NIT2 en la protección del aparato fotosintético.

En presencia de  $\text{NO}_3^-$ , la estirpe carente de NR está impedida para asimilar fuentes orgánicas de N. El trabajo realizado en este Capítulo nos ha permitido aislar mutantes afectados en un componente de señalización, aún por identificar, cuya alteración permite revertir específicamente la regulación negativa por  $\text{NO}_3^-$  /NIT2 para la asimilación de N orgánico.

**Capítulo 3.** En este Capítulo, se ha realizado un análisis transcriptómico que nos ha permitido estudiar los niveles de transcritos de aquellas rutas que se han estudiado en los Capítulos 1 y 2. Se han determinado los patrones de expresión de genes que estarían regulados positiva y negativamente por  $\text{NO}_3^-$  y NIT2, entre los que se incluyen los implicados en la desasimilación de  $\text{NO}_2^-$  y la asimilación de N orgánico. Finalmente, un análisis de promotores y estudio de expresión de Factores de Transcripción (FTs) en respuesta a  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  o deficiencia de nitrógeno, ha permitido proponer modelos de regulación para algunas de las rutas estudiadas.



## ABSTRACT

---

Algae are photosynthetic organisms that thrive in a great variety of ecosystems. These organisms are the dominant primary producers on our planet and have essential roles in O<sub>2</sub> production, CO<sub>2</sub> fixation, nitrogen (N) cycle, and the stabilization of different ecosystems. However, their high proliferation capacity under excess nutrient conditions, like those present in contaminated aquatic niches, can cause the eutrophication of ecosystems. From a biotechnological perspective, some algae are very relevant due to their nutritional and nutraceutical interest, as well as their capacity to produce high-value products.

*Chlamydomonas reinhardtii* is a green microalga that has arisen as a model organism, helping understand many biological processes at the molecular level, including nitrogen (N) assimilation. This microalga has also been used to understand algal-bacteria mutualistic interactions based on carbon and nitrogen exchange. Moreover, *Chlamydomonas reinhardtii* has emerged as an important biotechnological tool in bioremediation and biofuel production.

Like plants, *Chlamydomonas* can use inorganic ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), and nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and organic (amino acids, urea, uric, etc.) nitrogen. However, there exists a preference for some forms of N over the others, which is controlled by complex regulatory mechanisms. Furthermore, under excess N (mainly NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), microalgae can generate the greenhouse gas nitrous oxide (N<sub>2</sub>O).

In this thesis dissertation, we studied the impact of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as a nutrient or signal molecule on different processes in *Chlamydomonas*. First, we studied NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dissimilation to N<sub>2</sub>O (Chapter 1). Second, we tackled the role of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as a signal molecule in regulating organic N assimilation and accumulation of starch, lipids, carotenoids, and chlorophyll (Chapter 2). Finally, a transcriptomic analysis and a study of promoters and Transcription Factors (TFs) have allowed us to elucidate new regulatory roles mediated by NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NIT2 (Chapter 3).

**Chapter 1.** Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is a potent greenhouse gas whose emission rate has increased during the last decades, mainly due to anthropogenic causes. To study NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dissimilation by green microalgae, we set the following goals. 1) Identification of genes involved in this process (*NIRK*, *CYP55*, *FLV*, and *HCP*) present in different algal genomes, and 2) the validation of a strategy to

enhance and study the dissimilation pathway in *Chlamydomonas*. With this purpose, we have used CRDS (*Cavity Ring-Down Spectroscopy*), which allows the continuous measurement of  $N_2O$  and  $CO_2$  in *Chlamydomonas* strains lacking  $NO_2^-$  reductase activity (NiR). This strategy dramatically increased  $N_2O$  production and allowed us to study the role of NIT2 (the master regulator of nitrate assimilation), NIT1/NIA1 (nitrate reductase (NR), ARC/NOFNiR (a protein involved in NR-dependent NO synthesis from  $NO_2^-$ ), CYP55 (mitochondrial NO reductase), and FLV (chloroplast NO reductase) in this process. The results presented in this Chapter show that the NR/ARC complex greatly impacts  $N_2O$  emissions, in both light and darkness, by affecting NO accumulation. Furthermore, our data highlight that CYP55 and FLV are required for  $N_2O$  emissions in light and dark conditions. The need for both proteins and the different subcellular locations of FLV and CYP55 suggest a crosstalk between mitochondria and chloroplast in this process. This section also studied how variations in the capability to synthesize  $N_2O$  affected  $CO_2$  emissions.

**Chapter 2.**  $NO_3^-$  role as a signal, independent of its assimilation and mediated by NIT2, has been analyzed in a *Chlamydomonas* strain lacking  $NO_3^-$  reduction capability. This strain cannot grow in  $NO_3^-$  but can take it up, impacting numerous processes. Our results indicate that intracellular  $NO_3^-$  is involved in gametogenesis inhibition, blocking organic N assimilation, preventing chlorophyll degradation, protecting photosynthetic activity, promoting a more pronounced starch synthesis, and exhibiting a reduced accumulation of TriAcylGlyceride (TAG). The maintenance of DGDG (DiGalactosylDiacylGlycerol; a lipid of the thylakoid membrane) and photosynthetic pigments (carotenoids and chlorophyll) in the presence of non-assimilable  $NO_3^-$  indicates that  $NO_3^-$ /NIT2 are relevant players in the protection of the photosynthetic apparatus.

The same strain that cannot grow in organic N in the presence of  $NO_3^-$  has allowed us to isolate mutants affected in a signaling component, still unknown, which lose the repression and recover the ability to grow in organic N in the presence of  $NO_3^-$ .

**Chapter 3.** In this Chapter, a transcriptomic analysis in the presence of  $NO_3^-$  and in different strains was performed, allowing us to complement the studies of those genes showed in Chapters 1 and 2. In addition, the expression patterns of genes positive and negatively regulated by  $NO_3^-$  and NIT2 have been assessed,

including those involved in  $\text{NO}_2^-$  dissimilation and organic N assimilation. Finally, the analysis of different promoters and the expression patterns of some TFs has allowed us to propose a regulatory model for some of the studied pathways.



# ABREVIATURAS

---

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucélico
ARNm	Ácido ribonucélico mensajero
C	Carbono
CCM	Mecanismos de Concentración de CO <sub>2</sub>
cDNA	ADN complementario
CEF	Flujo de Electrones Cíclico
CMEF	Flujo de Electrones Cloroplasto-Mitocondria
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cre	Chlamydomonas reinhardtii
DAF-FM DA	Diacetato de 4-Amino-5-metilamino-2',7'difluorofluoresceína 1,1-Dietil-2-hidroxi-2-nitroso-hydracina sódica
DEA-NONOato	(Donador de NO)
e <sup>-</sup>	electrones
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
Fv/Fm	Rendimiento cuántico máximo del PSII
GC	Guanilato Ciclasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Disulfuro de Glutación
GTP	Guanosín TriFosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta afinidad
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta afinidad
LDs	Lipids Droplets "Gotas de Grasa"
Lys	Lisina
MM	Medio Mínimo con amonio
M-N	Medio Mínimo sin nitrógeno
N	Nitrógeno

N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
NO	Óxido nítrico
P	Fósforo
p/v	Relación peso/volumen
PCEF	Flujo de Electrones PseudoCíclico
ppm	partes por millón
S	Azufre
<i>s.p</i>	especies
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
TAG	Triacilglicéridos
TAP	Medio Tris-Acetato-Fosfato
TCA	Ciclo de Krebs
T-N	Tris-Acetato-Fosfato sin nitrógeno
u.a	Unidades Arbitrarias

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
I.1. Impacto Ecológico y Potencial Biotecnológico de las algas	23
I.2. <i>Chlamydomonas</i> como organismo modelo	24
I.3. Asimilación de nitrógeno en <i>Chlamydomonas</i>	25
I.4. Asimilación de Nitrógeno Inorgánico	26
I.4.1. Asimilación de $\text{NH}_4^+$	26
I.4.2. Asimilación de $\text{NO}_3^-$	28
I.5. Asimilación de Nitrógeno Orgánico	30
I.5.1. Asimilación de aminoácidos y péptidos	30
I.5.2. Asimilación de urea	32
I.5.3. Asimilación de purinas	32
I.6. Regulación de la asimilación de Nitrógeno	33
I.7. Metabolismo del óxido nítrico	35
I.8. Respuestas frente a la deficiencia de Nitrógeno	37
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 1. Desasimilación de <math>\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-</math> a <math>\text{N}_2\text{O}</math> en <i>Chlamydomonas</i></b>	<b>47</b>
1.1. Análisis de genomas de algas para la búsqueda de genes implicados en la desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ y la producción de $\text{N}_2\text{O}$	47
1.2. Establecimiento y validación de una estrategia para estudiar la desasimilación de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$ en <i>Chlamydomonas</i> y determinar el papel de NIT2 y la NR	49
1.2.1. Los mutantes <i>nii1</i> no crecen en $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ pero pueden reducirlos hasta $\text{N}_2\text{O}$	50
1.2.2. El complejo NR-ARC contribuye fuertemente a la producción de $\text{N}_2\text{O}$ tanto en luz como en oscuridad	53
1.2.3. El complejo NR-ARC es importante en la desasimilación de $\text{NO}_2^-$ produciendo NO	53
1.2.4. Emisiones de $\text{N}_2\text{O}$ a partir de $\text{NO}_2^-$ en estirpes WT y mutante <i>nit1nit2</i>	54
1.3. Papel de FLV y CYP55 en la desasimilación de $\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$	55
1.4. Análisis de las alteraciones en las emisiones de $\text{CO}_2$ como consecuencia de la desasimilación de $\text{NO}_2^-$	59
1.4.1. El $\text{NO}_2^-$ altera las emisiones de $\text{CO}_2$ en los mutantes de NiR	59
1.4.2. Estudio del efecto del $\text{NO}_2^-$ y del NO en las emisiones de $\text{CO}_2$	63

1.4.3. Análisis de las emisiones de CO <sub>2</sub> en oscuridad	65
1.5. Estudio fenotípico de los mutantes de NiR	66

## **CAPÍTULO 2. Regulación por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NIT2 sobre la asimilación del nitrógeno orgánico y otros procesos en *Chlamydomonas*** 77

2.1. Estudios comparativos de las estirpes 305 ( <i>nit1NIT2</i> ) y 137c ( <i>nit1nit2</i> )	78
2.1.1. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NIT2 regulan negativamente la gametogénesis	78
2.1.2. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NIT2 sobre la clorofila, actividad fotosintética, acumulación de pigmentos, almidón y lípidos	79
2.1.3. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NIT2 sobre la clorofila, actividad fotosintética, y pigmentos	80
2.1.4. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sobre relación C/N en la estirpe 305	85
2.1.5. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sobre la acumulación de almidón en las estirpes 305 y 137c	85
2.1.6. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sobre la acumulación de lípidos en las estirpes 305 y 137c	86
2.2. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NIT2 sobre el crecimiento de fuentes orgánicas de nitrógeno	91
2.2.1. Inhibición por NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en la asimilación de urea y úrico	92
2.2.2. Reversión de la estirpe 305 para el crecimiento en fuentes de N orgánico	93
2.3. Estudio de revertientes que han perdido la señal negativa de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	94
2.3.1. Consumo de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , urea y úrico	97
2.3.2. Efecto del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sobre la gametogénesis en la estirpe R7	98
2.3.3. Análisis de los patrones de expresión de genes para la asimilación de Nitrógeno	99

## **CAPÍTULO 3. Estudio de rutas metabólicas, promotores y factores de transcripción que se regulan por nitrógeno** 107

3.1. Patrones de expresión de genes en la estirpe WT y el mutante <i>nit2</i>	107
3.1.1. Síntesis y degradación de clorofila	108
3.1.2. Síntesis de carotenos	108
3.1.3. Metabolismo del almidón	108
3.1.4. Síntesis de TAG	108
3.1.5. Gametogénesis	109
3.1.6. Metabolismo del NO	110
3.1.7. Asimilación de nitrógeno	110
3.2. Análisis de TFs (Factores de Transcripción) y TRs (Reguladores Transcripcionales) regulados en respuesta a NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NIT2	113

3.3. Estudios de los promotores de los genes regulados para identificar motivos de unión a TFs	114
3.3.1. Análisis del promotor de NIT2	115
3.3.2. Estudios de los promotores de los genes regulados para identificar motivos de unión a TFs.	118
3.3.3. Hipótesis de modelo de regulación transcripcional por NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NIT2	119

## CONCLUSIONES 131

## CONCLUSIONS 133

## MATERIALES Y MÉTODOS 137

1. Material biológico. Estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	137
2. Medios de cultivo de <i>Chlamydomonas</i>	138
2.1. Soluciones stocks para preparar los medios de cultivo	138
2.2. Medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP)	138
2.3. Medio Mínimo (MM)	139
2.4. Medio de Sueoka (HSM)	139
2.5. Condiciones de cultivo	140
3. Cuantificación del crecimiento de los cultivos de <i>Chlamydomonas</i>	140
3.1. Determinación de absorbancia	140
3.2. Cuantificación de células de <i>Chlamydomonas</i>	140
3.3. Cuantificación de la clorofila	141
4. Cruces genéticos <i>Chlamydomonas</i>	141
5. Ensayos bioquímicos	141
5.1. Determinación de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	141
5.2. Cuantificación de N <sub>2</sub> O y CO <sub>2</sub>	142
5.3. Determinación de NO	143
5.4. Determinación de O <sub>2</sub>	143
5.5. Determinación de urea	144
5.6. Determinación de úrico	144
5.7. Determinación de almidón	144
5.8. Determinación de la composición elemental	145
6. Determinación parámetros fotosintéticos Fv/Fm, ETR y NPQ	145
7. HPLC	146
8. Cuantificación de lípidos: HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)	147
8.1. Obtención de ácidos grasos mediante el método de Folch	147

8.2. Preparación de estándares y fases móviles	148
8.3. HPTLC	148
9. Biología Molecular	149
9.1. Extracción de ARN	149
9.2. Tratamiento con DNAsa (para RNA)	149
9.3. Extracción de ADN genómico (ADNg)	150
9.4. Cuantificación de ácidos nucleicos	150
9.5. Gel de electroforesis y purificación de fragmentos de ADN	150
9.6. Secuenciación de ADN	151
9.7. Síntesis de ADN complementario (ADNc)	151
9.8. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	151
9.8.1. Diseño y lista de cebadores usados	151
9.8.2. PCR de colonia.	152
9.8.3. RT-qPCR: PCR cuantitativa para la expresión génica	153
relativa.	
10. Análisis transcriptómico	153
11. Herramientas bioinformáticas. Bases de datos.	154
<b>FINANCIACIÓN</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>181</b>
Anexo I	181
Anexo II	199
Anexo III	215

# ÍNDICE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Imágenes de microalgas	23
Figura I.2. Detalles de una célula vegetativa de <i>Chlamydomonas</i>	25
Figura I.3. Asimilación de N inorgánico en <i>Chlamydomonas</i>	27
Figura I.4. Estructura modular de la NR de <i>Chlamydomonas</i> y su interacción con ARC o THB1	30
Figura I.5. Asimilación de N orgánico en <i>Chlamydomonas</i>	31
Figura I.6. Funciones y metabolismo del NO en <i>Chlamydomonas</i>	36

## CAPÍTULO 1. Desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$ en *Chlamydomonas*

Figura 1.1. Modelo de hipótesis de trabajo para el estudio de la desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	50
Figura 1.2. Los mutantes <i>nii1</i> no crecen en $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ pero pueden metabolizarlos	51
Figura 1.3. El mutante <i>nii1</i> M3 metaboliza el $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$	52
Figura 1.4. El complejo NR-ARC contribuye fuertemente a la producción de $\text{N}_2\text{O}$ tanto en luz como en oscuridad, a partir de $\text{NO}_2^-$	53
Figura 1.5. La estirpe G1 produce poco NO y emite poco $\text{N}_2\text{O}$	54
Figura 1.6. Emisiones de $\text{N}_2\text{O}$ a partir de $\text{NO}_2^-$ la estirpe WT y el mutante <i>nit1nit2</i>	55
Figura 1.7. La ausencia de FLV o CYP55, disminuye drásticamente la producción de $\text{N}_2\text{O}$ a partir de $\text{NO}_2^-$	57
Figura 1.8. Acumulación de NO en las estirpes M3, M3 <i>flv</i> y M3 <i>cyp55</i>	58
Figura 1.9. Efecto del donador de NO en las emisiones de $\text{N}_2\text{O}$ por las estirpes G1, M3 <i>cyp55</i> y M3 <i>flv</i>	59
Figura 1.10. El $\text{NO}_2^-$ altera las emisiones de $\text{CO}_2$ en los mutantes de NiR	61
Figura 1.11. Emisiones de $\text{CO}_2$ en las estirpes M3 y M3 <i>flv</i> en condiciones mixotróficas y autotróficas	62
Figura 1.12. Emisiones de $\text{CO}_2$ en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i> en condiciones mixotróficas y autotróficas	63
Figura 1.13. Efecto del $\text{NO}_2^-$ en las emisiones de $\text{CO}_2$ en la estirpe M3	64
Figura 1.14. Efecto del NO en las emisiones de $\text{CO}_2$ en condiciones mixotróficas	65
Figura 1.15. Efecto del NO en las emisiones de $\text{CO}_2$ en condiciones heterotróficas	66

Figura 1.16. Efecto protector del $\text{NO}_2^-$ en la degradación de clorofila en los mutantes de NiR	68
Figura 1.17. Consumo de $\text{NO}_2^-$ por los mutantes de NiR	69
Figura 1.18. Determinación de los niveles de $\text{O}_2$	70

## CAPÍTULO 2. Regulación por $\text{NO}_3^-$ y $\text{NIT}_2$ sobre la asimilación del nitrógeno orgánico y otros procesos en *Chlamydomonas*

Figura 2.1. Fenotipo $\text{nit}^-$ de las estirpes 305 y 137c de <i>Chlamydomonas</i>	77
Figura 2.2. Cambios en <i>Chlamydomonas</i> tras la deficiencia de N y su posterior readministración	78
Figura 2.3. Aspecto de los cultivos de las estirpes 305 y 137c tras la deficiencia de N y efecto del $\text{NO}_3^-$	81
Figura 2.4. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en el contenido de clorofila y densidad celular en las estirpes 305 y 137c	82
Figura 2.5. Efecto de diferentes concentraciones de $\text{NO}_3^-$ en parámetros fotosintéticos en las estirpes 305 y 137c	83
Figura 2.6. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la concentración de clorofila y compuestos carotenoides en las estirpes 305 y 137c	84
Figura 2.7. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la relación C/N en la estirpe 305	85
Figura 2.8. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la acumulación de almidón en las estirpes 305 y 137c	86
Figura 2.9. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la acumulación de lípidos en la estirpe 305	87
Figura 2.10. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la acumulación de TAG en las estirpes 305 y 137c	88
Figura 2.11. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la acumulación de MGDG, SQDG y DGDG en las estirpes de 305 y 137c	90
Figura 2.12. Cociente DGDG/MGDG en las estirpes 305 y 137c en respuesta a $\text{NH}_4^+$ , deficiencia de N (-N) y $\text{NO}_3^-$	91
Figura 2.13. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en el crecimiento en urea y úrico en las estirpes 305 y 137c	92
Figura 2.14. Inhibición por $\text{NO}_3^-$ en el consumo de urea y úrico en la estirpe 305	93
Figura 2.15. Reversión de la estirpe 305 en aminoácidos más $\text{NO}_3^-$	94
Figura 2.16. Los revertientes R7, R9 y R10 mantienen la protección por $\text{NO}_3^-$ para la degradación de clorofila	95
Figura 2.17. Contenido en carotenoides en la estirpe 305 y los revertientes en $\text{NH}_4^+$ , deficiencia de N (-N) y $\text{NO}_3^-$	96

Figura 2.18. Acumulación de almidón de los revertientes en respuesta a $\text{NO}_3^-$	96
Figura 2.19. Acumulación de TAG y DGDG en la estirpe R9 en $\text{NH}_4^+$ , deficiencia de N (-N) y $\text{NO}_3^-$	97
Figura 2.20. Consumo de $\text{NO}_2^-$ en la estirpe 305 y el revertiente R7	97
Figura 2.21. Consumo urea y úrico en el revertiente R7	98
Figura 2.22. Patrones de expresión de <i>LAO1</i> en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	100
Figura 2.23. Patrones de expresión de <i>NRT2.1</i> en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	101
Figura 2.24. Patrones de expresión de <i>NIA1</i> en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	102

### CAPÍTULO 3. Estudio de rutas metabólicas, promotores y factores de transcripción que se regulan por nitrógeno

Figura 3.1. Regulación por NIT2 de los genes implicados en la asimilación de N inorgánico	111
Figura 3.2. Regulación por NIT2 de los genes implicados en la asimilación de N orgánico	112
Figura 3.3. Diagrama de Venn de factores transcripcionales expresados diferencialmente en respuesta a $\text{NO}_3^-$ de la estirpe WT (704)	113
Figura 3.4. Diagrama de Venn de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente en respuesta a $\text{NO}_3^-$ de la estirpe WT (704)	114
Figura 3.5. Esquema del análisis del promotor de <i>NIT2</i>	115
Figura 3.6. Patrones de expresión de <i>BLZ8</i> en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	122
Figura 3.7. Patrones de expresión de <i>NRR1</i> en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	123
Figura 3.8. Patrones de expresión de <i>NSG17</i> en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	124
Figura 3.9. Patrones de expresión de <i>bHLH3</i> en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	125
Figura 3.10. Modelo de regulación para la asimilación de N en <i>Chlamydomonas</i> y acumulación de lípidos	128

### MATERIALES Y MÉTODOS

MM1. Tecnología CRDS del analizador Picarro	142
---	-----



# ÍNDICE TABLAS

---

## CAPÍTULO 1. Desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$ en *Chlamydomonas*

Tabla 1.1. Presencia de <i>NIRK</i> , <i>CYP55</i> , <i>HCPs</i> , <i>FLVs</i> , número de genes, y producción de $\text{N}_2\text{O}$ en microalgas	48
Tabla 1.2. Emisiones de $\text{N}_2\text{O}$ a partir de $\text{NO}_2^-$ 10 mM por diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i> en condiciones mixotróficas y heterotróficas	56
Tabla 1.3. Emisiones de $\text{CO}_2$ en condiciones mixotróficas y heterotróficas en $\text{NO}_2^-$ 10 mM por diferentes estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	60

## CAPÍTULO 2. Regulación por $\text{NO}_3^-$ y NIT2 sobre la asimilación del nitrógeno orgánico y otros procesos en *Chlamydomonas*

Tabla 2.1. Efecto del $\text{NO}_3^-$ y NIT2 en la gametogénesis	79
Tabla 2.2. Efecto del $\text{NO}_3^-$ en la gametogénesis en el revertiente R7	99

## CAPÍTULO 3. Estudio de rutas metabólicas, promotores y factores de transcripción que se regulan por nitrógeno

Tabla 3.1 Factores de transcripción que regulan la acumulación de lípidos en <i>Chlamydomonas</i>	127
---	-----

## MATERIALES Y MÉTODOS

MM.1. Estirpes de <i>Chlamydomonas</i>	137
MM.2. Lista de cebadores	152



# **INTRODUCCIÓN**

---

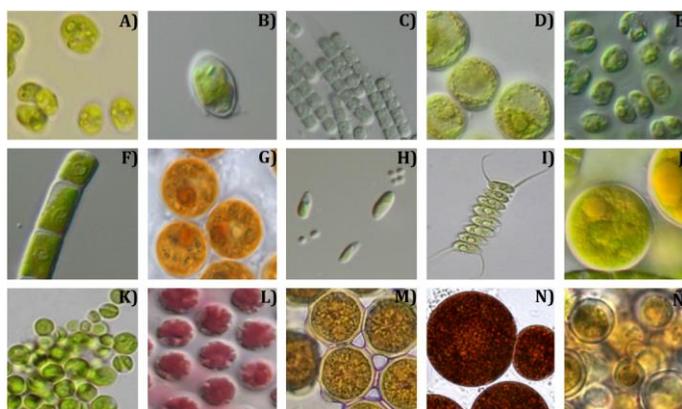


# INTRODUCCIÓN

## I.1. Impacto Ecológico y Potencial Biotecnológico de las algas

Las algas son organismos fotosintéticos presentes en una gran diversidad de hábitat; desde sistemas acuáticos de aguas dulce y marinos, hasta arenas del desierto, aguas termales, y nieve. La variedad morfológica de estos organismos varía desde microalgas unicelulares hasta formas complejas multicelulares que pueden llegar hasta más de 60 metros de longitud (algunas de las microalgas más estudiadas pueden verse en la Figura I.1). Las algas son los productores primarios dominantes en la tierra y tienen un papel primordial en la productividad global, producción de O<sub>2</sub>, fijación y captación de CO<sub>2</sub> y en los ciclos biogeoquímicos.

Por su alto contenido en proteínas, vitaminas, antioxidantes, carotenoides, etc., las algas están teniendo un uso, cada vez más en auge, en alimentación, siendo procesadas industrialmente para suplementos alimenticios. Además, pueden ser fuente de compuestos utilizados en la industria cosmética, compuestos medicinales (Grossman et al., 2007; Wells et al., 2017), así como de fitohormonas (Calatrava et al., 2022), entre otros.



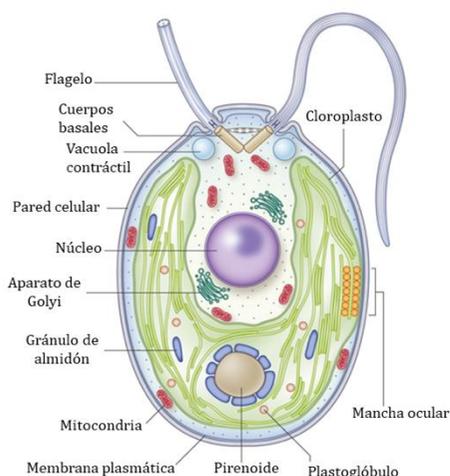
**Figura I.1. Imágenes de microalgas.** A) *Chlamydomonas reinhardtii*, B) *Chloroidium* sp., C) *Phormidesmis* sp., D) *Chlorococcum* sp., E) *Heterochlamydomonas* sp., F) *Klebsormidium nitens* G) *Symbiodinium* sp. H) *Coccomyxa simplex* I) *Desmodesmus quadricauda*, J) *Chlorococcum* cf. *Oleofaciens*, K) *Chlorella vulgaris*, L) *Porphyridium purpureum*, M) *Coelastrum indicum*, N) *Coelastrella aeroterrestica*, Ñ) *Bracteacoccus aggregatus*. Imágenes tomadas de (Chekanov et al., 2020; Ferreira de Oliveira and Bragotto, 2022; Ramos et al., 2018; Rodríguez-Palacio et al., 2022)

Las algas también tienen interés por su impacto en la estabilidad de los ecosistemas. En este sentido, las algas pueden interactuar con otros organismos de su entorno, siendo estas interacciones mutualistas favorables para la supervivencia de los organismos involucrados y de interés ecológico. Por ejemplo, el alto contenido en carbono de los corales viene del CO<sub>2</sub> fijado por algas del género *Symbiodinium* que viven dentro de los tejidos del coral. Por otro lado, la proliferación en exceso de algas en lagos y océanos (*algal bloom*) ocasiona la eutrofización de estos ecosistemas acuáticos. Además, ciertos grupos de algas y cianobacterias son productoras de neurotoxinas las cuales causan un importante daño en los ecosistemas en los que proliferan descontroladamente (Grossman et al., 2007).

En la actual era genómica en la que nos encontramos, se han secuenciado cientos de genomas de algas (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) que pueden proporcionar información acerca de la fisiología, rutas metabólicas, producción de compuestos de interés, etc.

## **I.2. *Chlamydomonas* como organismo modelo**

*Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas* de aquí en adelante) ha emergido como un importante organismo modelo (Salomé and Merchant, 2019) y son muchos los atributos que han contribuido a ello. *Chlamydomonas* tiene un crecimiento fácil y versátil en el laboratorio, puede crecer en condiciones mixotróficas, autotróficas y heterotróficas, lo que permite la selección de mutantes para el estudio de los mecanismos responsables del crecimiento en diferentes condiciones ambientales. Tiene un ciclo de vida asexual como alga haploide unicelular, pero también un ciclo de vida sexual con la formación de células diploides. Esto posibilita la realización de cruces genéticos y transferencia de genes/mutaciones. El genoma de *Chlamydomonas* ha sido secuenciado (Merchant et al., 2007) y existen una gran colección de mutantes, muchos de ellos etiquetados ([www.chlamycollection.org](http://www.chlamycollection.org)). También, se han desarrollado multitud de herramientas moleculares, incluyendo técnicas de transformación de sus tres genomas (nuclear, cloroplástico, y mitocondrial). Todo ello ha permitido desarrollar numerosos estudios bioquímicos, metabólicos, y fisiológicos que han permitido el conocimiento de la estructura, función y regulación de numerosos procesos biológicos (muchos de ellos recogidos en la última edición del *Chlamydomonas Sourcebook*, 2023).



**Figura I.2. Detalles de una célula vegetativa de *Chlamydomonas*.** Adaptada de Sasso et al., 2018.

Pero *Chlamydomonas* también ha emergido como un organismo con un gran potencial biotecnológico (León-Bañares et al., 2004). Cabe destacar la utilización de *Chlamydomonas* para la obtención de vacunas (Jones et al., 2013; Specht and Mayfield, 2014), anticuerpos (Tran et al., 2012), y su uso en humanos en ensayos clínicos para mejorar la colitis ulcerosa (Fields et al., 2020), entre otros. Además, *Chlamydomonas* también es un excelente modelo para estudiar las bases de las interacciones mutualistas con bacterias, basadas en el intercambio de carbono por nitrógeno (Calatrava et al., 2023a, 2018). Ciertas interacciones mutualistas tienen un potencial biotecnológico aplicable a biorremediación, y producción de  $H_2$  (Fakhimi et al., 2020; Torres et al., 2022), entre otras aplicaciones (revisado en Calatrava et al., 2023a).

Uno de los procesos claves ampliamente estudiados en *Chlamydomonas* durante las últimas décadas es la asimilación de N. Algunos de los estudios pioneros realizados en esta alga han sido esenciales para ayudar a dilucidar mecanismos conservados en plantas. En esta Tesis Doctoral hemos utilizado esta alga para analizar el papel del  $NO_3^-$  como nutriente y como molécula señal en la regulación de una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos del alga.

### I.3. Asimilación de nitrógeno en *Chlamydomonas*

El N es un macronutriente fundamental para todos los organismos vivos, siendo necesario para la construcción de biomoléculas esenciales como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. La mayor cantidad de N en el planeta se encuentra en forma de  $N_2$ , pero este sólo está disponible como fuente de N para algunos eucariotas en simbiosis con bacterias fijadoras de  $N_2$ . Por lo tanto, para la mayoría de los eucariotas fotosintéticos,  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$  (N inorgánico) constituyen la fuente primordial de N para su asimilación. El N inorgánico en su forma más reducida ( $NH_4^+$ ) es incorporado a esqueletos carbonados, que en condiciones autotróficas provienen del  $CO_2$  fijado

fotosintéticamente, lo que lleva a la construcción de los primeros pilares necesarios para la síntesis de proteínas, los aminoácidos.

El aumento exponencial en la demanda de alimento en el mundo ha disparado el uso de abonos nitrogenados como fertilizantes para aumentar los rendimientos en agricultura. Esto ha llevado a procesos indeseables como la pérdida de N en forma de gases (NO, N<sub>2</sub>O), o mediante lixiviación y escorrentías del exceso de N que la planta no asimila. Estos procesos conllevan pérdidas económicas, contaminación atmosférica, y alteración de los ecosistemas acuáticos por la llegada masiva de N a los mismos (Berman and Bronk, 2003; Seitzinger and Sanders, 1997).

*Chlamydomonas*, al igual que las plantas, también puede asimilar formas de N orgánico como aminoácidos, ureas, purinas y oligopéptidos. Sin embargo, *Chlamydomonas* prefiere las formas de N inorgánico dando lugar a lo que se ha denominado pirámide nutricional del N. El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es la forma preferente y se encuentra en la base de la pirámide. En segundo lugar, está el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (la parte media de la pirámide) y finalmente están las formas de N orgánico (en el pico de la pirámide). Esta jerarquía obedece a mecanismos reguladores, todavía no muy bien conocidos. De manera que el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> reprime la asimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N orgánico; y el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reprime la asimilación de N orgánico (Calatrava et al., 2023b).

## I.4. Asimilación de Nitrógeno Inorgánico

La asimilación de N inorgánico se ilustra en la Figura I.3. (Calatrava et al., 2023b) en la que se representan tanto la asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como la de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

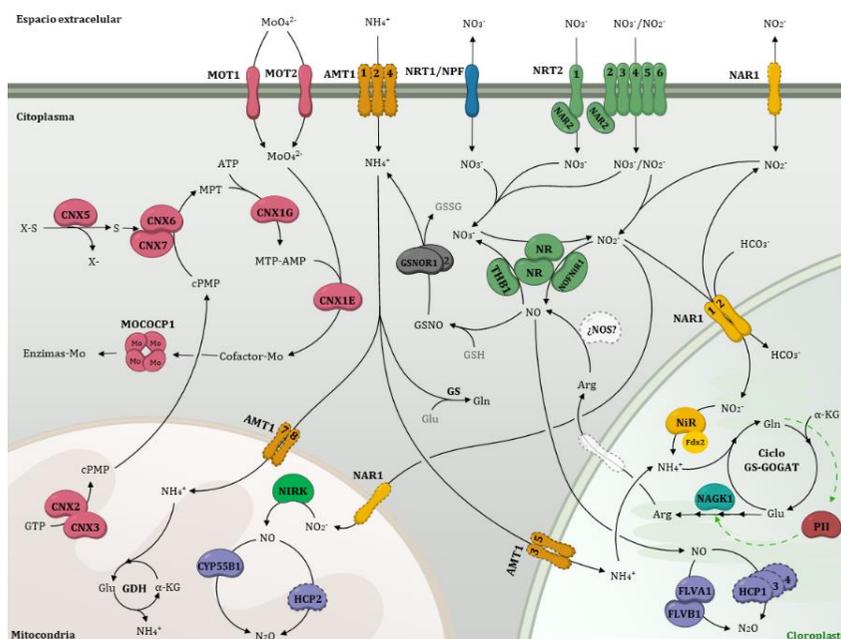
### I.4.1. Asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

La asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conlleva dos procesos: transporte al interior de la célula y del cloroplasto y, en segundo lugar, la incorporación a esqueletos carbonados mediante el ciclo GS/GOGAT (*Glutamine Synthetase/Glutamate Synthase*).

Entre los transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se distinguen aquellos de baja afinidad, pero alta capacidad (LATS, *Low Affinity Transport System*) y los de alta afinidad, pero baja capacidad (HATS, *High Affinity Transport System*). Se propone que los LATS se encuentran fundamentalmente en células vegetativas y plegametos, mientras que en los gametos estarían presentes ambos, LATS y HATS (Ermilova et al., 2010). La identidad molecular de los LATS no está del todo bien establecida y se ha propuesto que, además de AMTs (*AMmonium Transporters*), algunos miembros pueden estar relacionados con canales de K<sup>+</sup> (Ariz et al., 2018). En cambio, los HATS son transportadores de la familia AMT-MEP (*AMmonium Transporter-MEthylammonium/ammonium Permease*), los cuales están

relacionados con las proteínas de humanos RH (*Rhesus Human*) (Marini, 1997; Von Wirén et al., 2000; Westhoff et al., 2002). El genoma de *Chlamydomonas* tiene 8 genes que codifican miembros de la familia AMT-MEP (AMT1.1-8, ahora denominados AMT1A-H) y dos genes que codifican proteínas RHs (RH1 y RH2). Estas proteínas RHs se han propuesto también como LATS (Ariz et al., 2018). Sin embargo, la proteína RH1 de *Chlamydomonas* funciona como un canal bidireccional de CO<sub>2</sub> localizado en la membrana plasmática y que se requiere para el crecimiento del alga en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (Soupene et al., 2004; Yoshihara et al., 2008).

En cuanto a los AMTs, tendría diferente localización en la célula y su expresión responde de manera diferencial a N. Esto sugiere que estos transportadores permiten una adaptación a cambios ambientales, respondiendo de manera precisa a las necesidades celulares de N y asegurando un flujo adecuado del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a los compartimentos donde se va a asimilar. Las predicciones de localización indican que AMT1.1, 2, 4 estarían en la membrana plasmática, mientras que AMT1.3 y 5 estarían en el cloroplasto y AMT1.7 y 8 estarían presentes en la mitocondria. En cuanto a su regulación, AMT1.1, 2, 4, 6, y 8 aumentan su expresión en respuesta a deficiencia de N (González-Ballester et al., 2004; Schmollinger et al., 2014).



**Figura I.3. Asimilación de N inorgánico en *Chlamydomonas*.** Figura adaptada de Calatrava et al., 2023b. Las diferentes rutas se identifican por el color de las proteínas involucradas. Verde, transporte y reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Rosa, biosíntesis del cofactor de molibdeno. Amarillo, asimilación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Naranja, transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Morado, reducción de NO.

La mayor parte del  $\text{NH}_4^+$  se asimila en el cloroplasto a través del ciclo GS-GOGAT, generando glutamato. El genoma de *Chlamydomonas* contiene al menos 4 genes que codifican glutaminas sintetasas (*GLN1-4*), de las cuales dos tendrían una localización citosólica (*GLN1* y 4) y otras dos (*GLN2* y 3) tendrían localización cloroplástica. De ellas *GLN1,2* y 3 se inducen en deficiencia de N (Schmollinger et al., 2014). En el caso de GOGAT, existen dos genes que codificarían isoformas plastídicas. Tanto los transcritos como las proteínas para la GOGAT dependiente de NADPH (*GSN1*) como la ferredoxina-GOGAT (*GSF1*) aumentan su abundancia en respuesta a la falta de N (Schmollinger et al., 2014).

#### I.4.2. Asimilación de $\text{NO}_3^-$

La asimilación de  $\text{NO}_3^-$  requiere dos pasos secuenciales de transporte y dos de reducción. En primer lugar, el  $\text{NO}_3^-$  es transportado al interior celular, para ser reducido a  $\text{NO}_2^-$  en el citoplasma en una reacción catalizada por la Nitrato Reductasa (NR). Seguidamente, el  $\text{NO}_2^-$  es transportado al cloroplasto, donde se reduce a  $\text{NH}_4^+$  por la ferredoxina-Nitrito Reductasa (NiR), y finalmente el  $\text{NH}_4^+$  alimenta el ciclo GS/GOGAT (Figura I.3).

Los transportadores de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  pertenecen a tres familias diferentes en *Chlamydomonas* que se denominan NRT2, NRT1 y NAR1.

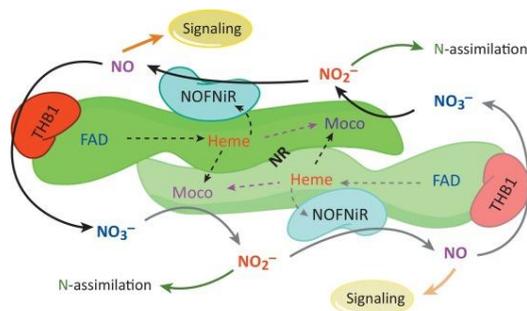
Los transportadores NRT2 (*Nitrate Transporter 2*), también conocidos como NNP (*Nitrate Nitrite Porter*), están presentes en bacterias, hongos, algas y plantas. *Chlamydomonas* contiene 6 genes que codifican transportadores NRT2 (NRT2.1-6, recientemente denominados NRT2A-F) y algunos de ellos (NRT2.1 y 2) requieren un segundo componente denominado NAR2 (*Nitrate Assimilation-Related*) (Quesada et al., 1994; Zhou et al., 2000). Los diferentes transportadores NRT2 tienen características funcionales diferentes. Aquí, se destaca que NRT2.1, que funciona con la proteína accesoria NAR2, es un transportador de alta afinidad y biespecífico de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  (HAN/NiT, system I) (Galván et al., 1996) que es esencial para el crecimiento en  $\text{NO}_3^-$  y que participa en la señalización de  $\text{NO}_3^-$  (Llamas et al., 2002; Rexach et al., 2002).

La familia de transportadores NRT1/NPF (*Nitrate Transporter 1/Nitrate Peptide Family*) (Zhang et al., 2020) está altamente representada en los genomas de plantas donde parecen tener una amplia especificidad de sustrato desde  $\text{NO}_3^-$  hasta aminoácidos, péptidos, glucosinatos, auxina, ácido abscísico y monoterpenos (Léran et al., 2014; O'Brien et al., 2016; Payne et al., 2017).

En *Arabidopsis*, NRT1.1/NPF6.3 es el miembro mejor estudiado y al que se considera un tranceptor (Ho et al., 2009; Léran et al., 2014; Vidal et al., 2020). *Chlamydomonas*, al igual que muchas algas, tiene un solo gen *NRT1* (Sanz-Luque et al., 2015a).

NAR1 se relaciona con los transportadores FNT (*Formate Nitrite Transporters*) (Rexach et al., 2000; Suppmann and Sawers, 1994). *Chlamydomonas* contiene 6 genes *NAR1* (*NAR1.1-6*, ahora denominados *NAR1A-F*). De entre ellos se destaca *NAR1.1* que codifica un transportador de  $\text{NO}_2^-$  al cloroplasto (Rexach et al., 2000) y *NAR1.2* (*LCIA*) que codifica un transportador biespecífico de  $\text{NO}_2^-/\text{HCO}_3^-$  (Mariscal et al., 2006). Estos dos genes muestran una regulación diferencial por N y C. Mientras que *NAR1* está bajo control del regulador maestro de la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ , NIT2 (Rexach et al., 2000), *LCIA* es un gen implicado en el mecanismo de concentración de  $\text{HCO}_3^-$  y está bajo control del regulador CCM1 (*Carbon Concentrating Mechanism 1*) (Wang et al., 2014; Yamano et al., 2015). Así, los transportadores *NAR1* podrían servir para coordinar la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  de acuerdo con la disponibilidad de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  (Mariscal et al., 2006, 2004).

En el citosol, la reducción del  $\text{NO}_3^-$  la lleva a cabo la Nitrato Reductasa (NR), una proteína homodimérica que en *Chlamydomonas* está codificada por un único gen (*NIA1/NIT1*) (Fernández et al., 1989). Cada monómero contiene los cofactores FAD, hemo b557, y cofactor de molibdeno, que constituyen tres dominios o centros redox (Fernández et al., 1989; Zhou and Kleinhofs, 1996). Para la reducción de  $\text{NO}_3^-$ , los electrones ( $e^-$ ) se transfieren secuencialmente desde el NAD(P)H a los centros redox FAD, hemo, y cofactor de molibdeno para finalmente reducir el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  (Figura I.4). La NR juega un papel clave en el metabolismo del  $\text{NO}_3^-$  en *Chlamydomonas* porque, no solo es necesaria para el crecimiento en  $\text{NO}_3^-$ , sino que también tiene un papel regulador. Como regulador participa en la síntesis y eliminación de la molécula señal óxido nítrico (NO). La estructura modular de la NR le permite interactuar con otras proteínas y formar minicadenas de transporte de  $e^-$  para su transferencia a diferentes sustratos. La interacción de la NR con la molibdoproteína ARC/NOFNiR permite la transferencia de electrones al  $\text{NO}_2^-$  para la síntesis de NO (Chamizo-Ampudia et al., 2016). Por otra parte, la interacción con una THB1 (*Truncated Hemoglobine 1*) le permite la transferencia de  $e^-$  y la dioxigenación del NO para dar lugar a  $\text{NO}_3^-$  (Sanz-Luque et al., 2015b). Este ciclo en el que la NR tiene un papel central se ha denominado **ciclo  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$**  y permite transformar una señal positiva ( $\text{NO}_3^-$ ) en otra negativa (NO) y viceversa (Figura I.4) (Bellido-Pedraza et al., 2020; Calatrava et al., 2017; Chamizo-Ampudia et al., 2017; Calatrava et al., 2023b).



**Figura I.4. Estructura modular de la NR de *Chlamydomonas* y su interacción con ARC o THB1.** Figura tomada de (Chamizo-Ampudia et al., 2017)

Finalmente, la reducción de  $\text{NO}_2^-$  hasta  $\text{NH}_4^+$  se lleva a cabo en el cloroplasto por la enzima Nitrito Reductasa (NiR). Esta enzima requiere de electrones que le son suministrados por la Ferredoxina reducida ( $\text{Fd}_{\text{red}}$ ) que se genera como consecuencia del transporte electrónico fotosintético (Knaff and Hirasawa, 1991) o del NADH generado por el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato en oscuridad (Márquez et al., 2004; Jin et al., 1998). Un único gen codifica la enzima NiR en *Chlamydomonas* (*NiR1*) (Quesada et al., 1998). Esta enzima es una proteína monomérica que posee dos centros redox como grupos prostéticos: una agrupación sulfoférrica [4Fe-4S] y un sirohemo, ambos unidos por una cisteína que hace de nexo de unión (Campbell and Kinghorn, 1990).

## I.5. Asimilación de Nitrógeno Orgánico

Las diferentes rutas que *Chlamydomonas* posee para captar y asimilar fuentes de N orgánico se resumen en la Figura I.5.

### I.5.1. Asimilación de aminoácidos y péptidos

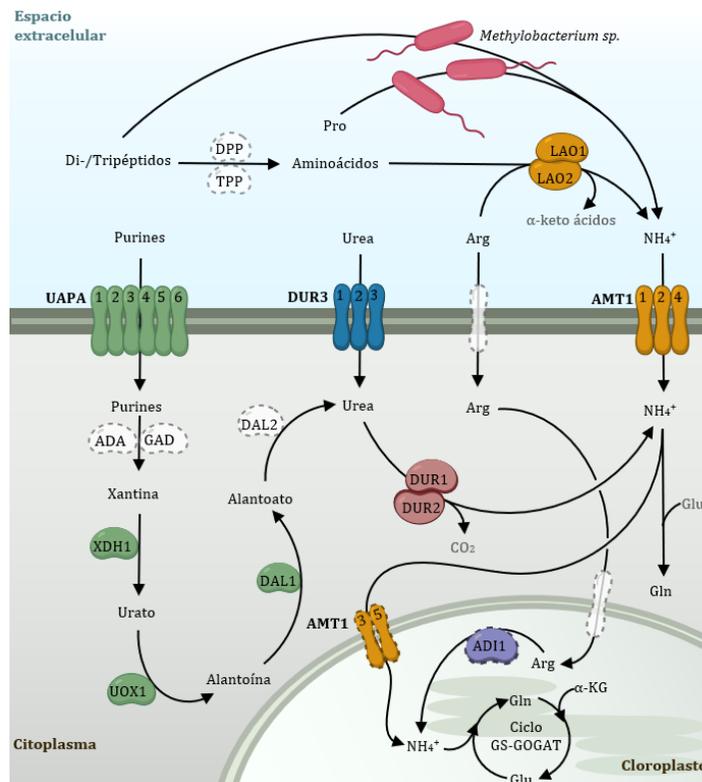
*Chlamydomonas* puede utilizar diferentes tipos de L-aminoácidos, D-aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos como fuente de nitrógeno, pero tenemos que destacar que el uso de los aminoácidos es muy específico para cada especie (Calatrava et al., 2023b, 2019; Chaiboonchoe et al., 2014; Zuo et al., 2012).

Para la asimilación de aminoácidos y péptidos, *Chlamydomonas* utiliza tres mecanismos: transporte, desaminación extracelular y mutualismo con bacterias.

A) **Transporte.** Solamente la arginina se transporta eficientemente (Kirk and Kirk, 1978). Pero la identificación molecular de dicho transportador(es) se desconoce. En el cloroplasto, la ADI1 (*Arginina Deiminase 1*) desamina la arginina para producir citrulina y  $\text{NH}_4^+$ .

B) **Desaminación extracelular.** La enzima periplásmica LAO1 es esencial para este proceso en *Chlamydomonas*. LAO1 es una deaminasa, LAAO (*L-Aminoacid Oxidase*) codificada por el gen *LAO1*. En *Chlamydomonas* LAO1

permite el crecimiento en la mayoría de los aminoácidos proteogénicos, así como en ciertos di- y tripéptidos (Calatrava et al., 2019; Piedras et al., 1992; Vallon and Richard, 1993). LAO1 cataliza la desaminación de L-aminoácidos generando  $\text{NH}_4^+$ , el correspondiente  $\alpha$ -cetoácido y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Vallon and Richard, 1993). Interesantemente, los cetoácidos producidos por el alga no se incorporan, quedando libres en el medio de cultivo (Muñoz-Blanco et al., 1990). Sin embargo, algunos de estos cetoácidos pueden ser sustratos para la síntesis de fitohormonas y usados para establecer interacciones mutualistas con bacterias (Calatrava et al., 2022). Por ejemplo, cuando el sustrato de la LAO1 es el triptófano, se produce la síntesis de ácido indolacético.



**Figura I.5. Asimilación de N orgánico en *Chlamydomonas*.** Figura adaptada de Calatrava et al., 2023b. Las diferentes rutas se identifican por el color de las proteínas involucradas. Verde, asimilación de bases púricas. Azul, asimilación de urea. Naranja, asimilación de aminoácidos y péptidos.

C) **Mutualismo** de *Chlamydomonas* con bacterias. Este tercer mecanismo ocurre cuando existen fuentes de N orgánico que *Chlamydomonas* no puede utilizar como son: el aminoácido prolina, dipéptidos y tripéptidos (alanil-alanina, glicina-glicina, glicina-glicina-glicina, glicil-prolina, prolina-glicina,

glicina-hidroxiprolina, hidroxiprolil-glicina) (Calatrava et al., 2023b, 2018). Esta interacción mutualista se ha puesto de manifiesto con bacterias del género *Methylobacterium* donde se muestra que hay especificidad de especies para complementar el crecimiento de *Chlamydomonas* dependiendo del péptido. Esta interacción mutualista se basa en el intercambio C por N, donde la bacteria mineraliza la fuente de N para proporcionar  $\text{NH}_4^+$  a *Chlamydomonas*, y el alga fija C que le transfiere a la bacteria.

### I.5.2. Asimilación de urea

La urea es un subproducto del metabolismo del N y constituye una fuente importante de N para el fitoplancton (Mitamura et al., 2012). En los ecosistemas acuáticos la urea procede de la excreción por parte del zooplancton, fitoplancton y algunos animales, y la regeneración por bacterias heterotróficas (Berman and Bronk, 2003; Karsten, 1993; Painter et al., 2008). La concentración de urea en los ecosistemas acuáticos suele ser inferior a la concentración de N inorgánico, pero puede aumentar debido a la escorrentía de agua desde las zonas fertilizadas (Kudela et al., 2008; Solomon et al., 2010). La captación de urea se puede llevar a cabo por canales de urea/amida, acuaporinas, transportadores de baja afinidad de la familia SLC14 (*SoLuted Carried14*) (Raunser et al., 2009), y las proteínas DUR3 que son transportadores activos de alta afinidad incluidos en la Familia de proteínas Simportadoras de Sodio:Solutos (SSSF).

En *Chlamydomonas*, la urea se transporta por los sistemas DUR3A, DUR3B y DUR3C (Leftley and Syrett, 1973; Williams and Hodson, 1977). En el interior celular, la urea se hidroliza hasta  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{CO}_2$  mediante la acción secuencial de dos enzimas DUR1 (*urea carboxylase*) que cataliza la carboxilación de urea a alofanato, y DUR2 (*allophanate hydrolase*) que cataliza la formación de amoníaco y  $\text{CO}_2$  (Hodson et al., 1975; Leftley and Syrett, 1973; Semler et al., 1975). Ambos genes *DUR1* y *DUR2* se encuentran adyacentes y con diferente orientación (cola-cola) en una agrupación génica junto con *DUR3A* y *DUR3B*. Estos genes se inhiben por  $\text{NH}_4^+$  y se activan por urea (Hodson et al., 1975) o simplemente por la ausencia de cualquier fuente de N (Schmollinger et al., 2014).

### I.5.3. Asimilación de purinas

A nivel fisiológico, *Chlamydomonas* presenta dos actividades de transporte de purinas, una específica para adenina, guanina e hipoxantina, y la otra específica para xantina y urato (Lisa et al., 1995; Pérez-Vicente et al., 1991). De estas bases nitrogenadas, la xantina parece ser la única que se acumula

transitoriamente en vacuolas como material sólido (Pérez-Vicente et al., 1995). En el genoma de *Chlamydomonas* encontramos seis genes (*UAPA1-6/XUV1-6*) que codifican estas permeasas, las cuales pertenecen a la familia NCS2 (*Nucleobase: Symporter Cation 2*). Además hay un único gen (*NCS1*) que codifica un miembro de la familia Nucleobase:Cación Simportador 1. En *Arabidopsis*, *NCS1* es responsable del transporte de nucleobases hacia el cloroplasto (Mourad et al., 2012).

Una vez en el interior celular, las bases púricas se metabolizan inmediatamente y se utilizan como fuente de N y energía, o bien como precursores de la síntesis de ácidos nucleicos (Lisa et al., 1995). Adenina y guanina son desaminadas por las enzimas ADA y GDA (*Adenine* y *Guanine Desaminases*), dando como productos  $\text{NH}_4^+$  e hipoxantina o xantina, respectivamente. La XDH (*Xanthine Dehydrogenase*) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a urato, utilizando  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones. Seguidamente, la enzima UOX (*Uricase or Urate Oxidase*) lleva a cabo la oxidación de urato hasta alantoína. La alantoína se convierte en alantoato mediante la enzima AN (*AlanthoiNase*) y este alantoato se degrada por la enzima AC (*AlanthoiCase*); enzima hidrolasa que es capaz de catalizar la degradación del alantoato a ureidoglicolato y urea, así como del ureidoglicolato a glioxilato y urea (Calatrava et al., 2023b).

La expresión de los genes que codifican los transportadores de purinas *UAPA1-6/XUV1-6*, y las enzimas XDH y UOX se inducen en deficiencia de N (Schmollinger et al., 2014), mientras que la enzima AC parece tener expresión constitutiva (Piedras et al., 1995).

A nivel postranscripcional, muchas de las proteínas que participan en la asimilación de N podrían regularse mediante mecanismos redox. Estudios proteómicos muestran que tras la deficiencia de N se produce la oxidación reversible de cisteínas en AMT1.5, GLN1, NRT2.1, NiR, UAPA6, UOX1, XDH1, LAO1 o AMT1.1 (Smythers et al., 2020). El significado de dicha regulación redox se desconoce, pero se sugiere que estas modificaciones podrían tener un papel importante en aumentar la actividad de aquellos mecanismos implicados en la captación de N.

## **I.6. Regulación de la asimilación de Nitrógeno**

Como se indicó anteriormente, las diferentes formas de N que *Chlamydomonas* puede asimilar constituyen una pirámide nutricional y esto obedece a mecanismos reguladores. Es bien conocido que el  $\text{NH}_4^+$  reprime la asimilación de cualquier otra forma de N, estableciéndose como la fuente

preferente. Diferentes estrategias se han usado para obtener mutantes insensibles a  $\text{NH}_4^+$  e identificar el gen correspondiente. Una estrategia inicial consistió en la mutagénesis insercional y escrutinio de sensibilidad a clorato en presencia de  $\text{NH}_4^+$ . Esto llevó a la obtención de un mutante FAR1 (*Free Ammonium Repression*) (Zhang and Lefebvre, 1997) y tres Nrg (*Nitrogen repression gen*) (Prieto et al., 1996). La mutación FAR1 mapeaba en el cromosoma I, mientras que Nrg1 permitió la identificación del retrotransposón REM1 (Pérez-Alegre et al., 2005). Una segunda estrategia, también de mutagénesis insercional, pero utilizando una estirpe que porta el reportero ARS (*ARylSulphatase*) bajo el promotor del gen *NIA1* (*pNIA1-ARS*) llevó al aislamiento de unos 30 mutantes parcialmente insensibles a  $\text{NH}_4^+$  (González-Ballester et al., 2005) entre ellos *cyg56*. CYG56 es un guanilato ciclasa dependiente de NO, cuyo estudio permitió identificar al NO como molécula señal relevante para la regulación de la ruta de señalización negativa (de Montaigu et al., 2010). Recientemente se ha aislado el mutante *nri1* (*nitrogen repletion insensitive 1*) mediante una estrategia en la que la movilidad de una estirpe de *Chlamydomonas* dependía de la expresión de un gen, que codifica una proteína del flagelo, bajo el control del promotor de *NIT1/NIA1*. La estirpe parental usada para la generación de mutantes no tenía flagelos funcionales en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , mientras que el mutante *nri1* era capaz de nadar constantemente en presencia de  $\text{NH}_4^+$  (Jia et al., 2022). La caracterización de este mutante permitió identificar un factor de transcripción de la familia bHLH, previamente conocido como *NSG17*. Se ha propuesto que *NRI1/NSG17* media la represión por  $\text{NH}_4^+$  de *NIA1*, así como de los genes para la asimilación de N orgánico y la gametogénesis. Además, los gametos de la estirpe *nri1* muestran dificultad para su diferenciación inversa hacia células vegetativas, cuando se les proporciona  $\text{NH}_4^+$  (Jia et al., 2022).

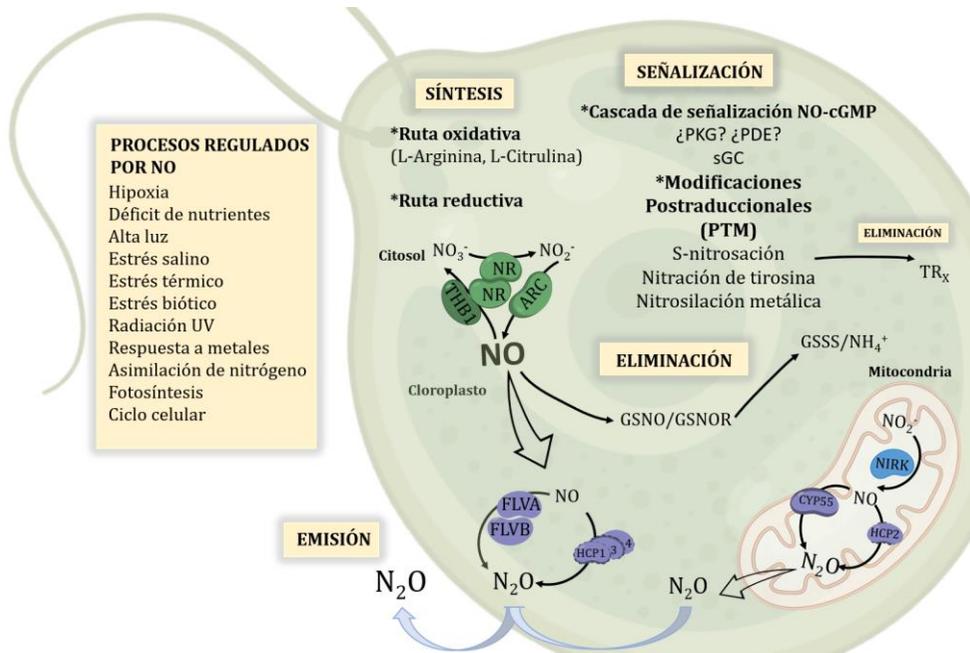
Al contrario que para la represión por  $\text{NH}_4^+$ , sí se conoce desde hace tiempo el regulador maestro para la señal positiva del  $\text{NO}_3^-$  que es *NIT2*. El *locus NIT2*, en el cromosoma III, se clonó por etiquetado de transposón (*Gulliver*) que se activaba en respuesta a clorato (Schnell and Lefebvre, 1993). Los mutantes *nit2* tienen fenotipo nit, son incapaces de crecer en  $\text{NO}_3^-$  y están afectados en la expresión de genes esenciales para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ ; entre los que se incluyen *NIT1/NIA1*, *NRT2.1*, y *NAR2*, entre otros. La intensa búsqueda para encontrar otros mutantes con el mismo fenotipo resultó infructuosa. Así, tras el análisis de unos 30.000 mutantes se propone que *NIT2* es el único regulador maestro para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Camargo et al., 2007; González-Ballester et al., 2005). Sin embargo, se han aislado otros mutantes (unos 30) que muestran una insensibilidad parcial a la señal positiva de  $\text{NO}_3^-$ . Entre estos se identificó un factor regulador CCCH tipo *NZF1* (*Nitrate Zinc Finger 1*) (Higuera et al., 2014).

NIT2 es un factor de transcripción de la familia RWP-RK, la cual incluye también el factor MID que controla el “*mating type*” (Goodenough et al., 2007). A nivel transcripcional, *NIT2* muestra baja expresión en  $\text{NH}_4^+$ , se induce en deficiencia de N, pero es en  $\text{NO}_3^-$  cuando tiene su máxima actividad, induciendo de forma óptima la expresión de genes para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Camargo et al., 2007; Higuera et al., 2014). Al igual que *MID1*, *NIT2* contiene múltiples sitios de poliadenilación que permiten la formación de transcritos con el mismo marco abierto de lectura, pero con 3'UTR de diferentes longitudes. NZF1 (*Nitrate Zinc Finger 1*) es un factor que favorece la formación de la forma más larga del transcrito de *NIT2*. NZF1 promueve la selección de una señal de poliadenilación que posiblemente aumenta la estabilidad del mRNA de *NIT2* y su transporte al citoplasma, aumentando su traducción y la cantidad de proteína NIT2 (Higuera et al., 2014).

## 1.7. Metabolismo del óxido nítrico

En los últimos años se ha producido un gran aumento en el número de publicaciones que establecen al NO como una importante molécula señal en organismos fotosintéticos. En *Chlamydomonas*, el NO regula una gran cantidad de procesos biológicos como respuesta a drogas, herbicidas, metales y oxidantes, asimilación de N, regulación del ciclo celular, respuesta a la deficiencia de nutrientes (como Fe y N), respuesta a hipoxia y anoxia, respuesta a exceso de luz, y respuesta a estrés salino (revisado en Astier et al., 2021). Con respecto a la asimilación de N, el NO media la represión de *NIA1* por  $\text{NH}_4^+$  (de Montaigu et al., 2010), inhibe las actividades de transporte de alta afinidad de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , y la actividad NR (Sanz-Luque et al., 2013); y la represión por  $\text{NH}_4^+$  de *GLB1* (*PII*) (Zalutskaya et al., 2018).

La ausencia de genes que codifiquen una NO sintasa en los genomas de plantas y algas, con la excepción de algunas microalgas (Foresi et al., 2010; Jeandroz et al., 2016), ha llevado a poner un gran esfuerzo en la identificación de los mecanismos para la biosíntesis de NO en eucariotas fotosintéticos. En resumen, la NR se ha propuesto como una enzima clave para la producción de NO a partir de  $\text{NO}_2^-$  y el sistema de *Chlamydomonas* ha permitido identificar un sistema en el que la NR junto con la enzima ARC utilizan  $\text{NO}_2^-$  como sustrato para la producción de NO. Esto implicaría una producción de NO asociada a la ruta de asimilación de  $\text{NO}_3^-$ . Pero, además, se considera que deben existir otras rutas independientes de NR que operan en eucariotas fotosintéticos (Astier et al., 2021; Corpas et al., 2017).



**Figura I.6. Funciones y metabolismo del NO en *Chlamydomonas*.** Figura adaptada de (Astier et al., 2021).

El NO sintetizado puede ejercer su función señalizadora a través de diferentes vías de señalización que con frecuencia involucran la unión a cofactores (grupos hemo) o la modificación postraduccionales de proteínas. Además, esta molécula señal también debe tener un rápido “turnover” que permita su eliminación (Figura I.6) (Astier et al., 2021).

En *Chlamydomonas* se han identificado posibles sGC (*soluble Guanylate Cyclases*), como son CYG11, CYG12 y CYG56, que son enzimas que se suelen activar por la unión de NO. Sin embargo, la regulación por NO, no ha sido demostrada en el caso de CYG56 (de Montaigu et al., 2010), y CYG11 se activa más por monóxido de carbono (CO) que por NO, lo que definiría a CYG11 como una posible GC sensora de CO (Horst et al., 2019). El producto de estas enzimas es el GMPc (*cyclic Guanosyl Monophosphate*), un segundo mensajero involucrado en multitud de procesos celulares. Los efectores regulados por esta molécula, como pueden ser proteínas quinasas dependientes de cGMP, fosfodiesterasas, o canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos, se desconocen.

Las modificaciones postraduccionales por S-nitrosilación/nitración de proteínas, son un proceso de señalización bien conocido y presente en todos los organismos. Un análisis proteómico de *Chlamydomonas* tras el tratamiento con GSNO (*S-nitrosoglutathione*) permitió la identificación de 492 proteínas que son S-nitrosiladas (Morisse et al., 2014). Estas proteínas participan en procesos

relacionados con el metabolismo, la replicación, la transcripción, la movilidad celular, la homeostasis redox, la respuesta a estrés o el ritmo circadiano, entre otros.

La degradación del NO está mediado principalmente por las enzimas GSNORs (*Glutathione NO Reductases*), TRXs (*Thioredoxins*) y THBs (*Truncated Hemoglobins*). Sin embargo, el NO también es sustrato de NO reductasas que reducen el NO a N<sub>2</sub>O. El N<sub>2</sub>O es un potente gas de efecto invernadero y *Chlamydomonas* tiene dos enzimas que reducen NO a N<sub>2</sub>O, CYP55 (*Cytochrome p450 reductase*) y FLV (*FLaVoprotein*) (Burlacot et al., 2020; Plouviez et al., 2017). CYP55 se propone como responsable de la síntesis de N<sub>2</sub>O en la oscuridad mientras que FLV lo haría en la luz. Estos estudios suponen una prueba, a nivel molecular, de que las algas serían potenciales productoras de N<sub>2</sub>O (Plouviez et al., 2019; Timilsina et al., 2020). El estudio de Burlacot y colaboradores con diferentes algas propone que la producción de N<sub>2</sub>O dependiente de NO estaría restringida a las clorofitas (Burlacot et al., 2020), las cuales suponen el segundo grupo de organismos más abundante en el océano.

## I.8. Respuestas frente a la deficiencia de Nitrógeno

En *Chlamydomonas*, la falta de N da lugar a una reprogramación de su metabolismo que ha sido extensamente estudiada a nivel transcriptómico, proteómico y metabolómico (Blaby et al., 2013; Bölling and Fiehn, 2005; Goodenough et al., 2014; Miller et al., 2010; Msanne et al., 2012; Schmollinger et al., 2014). En general, estas respuestas se pueden clasificar en: 1) respuestas dirigidas a la captación de N extracelular, 2) respuestas encaminadas a guardar y reciclar el N, y 3) adaptaciones celulares para favorecer la supervivencia (regulación del metabolismo, fotosíntesis, etc.). Todo ello lleva a que las células vegetativas entren en un periodo de quiescencia programada y reversible, de manera que, si se readministra N, las células vuelvan a su estado vegetativo.

Para la captación de N extracelular, las células inducen la expresión de genes implicados en el transporte y asimilación de diferentes compuestos de N. Para la asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se inducen los transportadores *AMT1.1*, *AMT1.2*, *AMT1.3*, *AMT1.4*, *AMT1.5*, y *AMT1.8*, y las enzimas *GLN1*, *GLN3* y *GSN1*. En el caso de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, se inducen los transportadores *NRT1*, *NAR2*, *NRT2.1*, *NRT2.6*, *NAR1.1*, *NAR1.2*, *NAR1.6*, las enzimas NR (*NIA1*) y NiR (*NII1*) y el regulador *NIT2*. Para la asimilación de urea, los transportadores *DUR3A-C* y las enzimas *DUR1* y *DUR2*. En el caso de la asimilación de purinas, se inducen los transportadores de bases púricas UAPA1-6, y las enzimas *XDH* y *UOX*. Finalmente, *LAO1* y *RIDA* para la desaminación de aminoácidos (Schmollinger et al., 2014).

A pesar de la falta de N, las células de *Chlamydomonas* son capaces de dividirse por un tiempo ( $\approx 24$  h), antes de que el ciclo celular se detenga por completo (Schmollinger et al., 2014; Spudich and Sager, 1980). Esto es posible gracias al reciclado de macromoléculas que contienen N. También se ha descrito que disminuyen los ribosomas cloroplásticos y citoplasmáticos, el contenido total de ARN, prácticamente no hay aumento neto de clorofila y las proteínas totales en el cultivo aumentan solo levemente. Esto se traduce en que el contenido de clorofila y proteína por célula disminuya un 65% y 50%, respectivamente. Algunas de las proteínas que más se inducen en esta condición son proteínas con un bajo contenido en N (Lys, Arg) (Schmollinger et al., 2014).

Durante la deficiencia de N, la producción de energía recae en la respiración en vez de en la fotosíntesis (Schmollinger et al., 2014). La disminución de la actividad fotosintética es consecuencia de una regulación transcripcional y postranscripcional. Hay una disminución rápida de los transcritos que codifican los complejos fotosintéticos, el transporte de electrones, los pigmentos fotosintéticos y el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Blaby et al., 2013; Juergens et al., 2015; Miller et al., 2010; Schmollinger et al., 2014).

Una falta de N persistente lleva a un aumento en la relación C/N en las células, la cual es atribuible a una menor disponibilidad de N y a un aumento en la acumulación de almidón y lípidos neutros (Msanne et al., 2012; Schmollinger et al., 2014; Siaut et al., 2011; Wang et al., 2009). El aumento de la expresión de genes para la síntesis de almidón ocurre rápidamente cuando las células se transfieren a medio sin N, alcanzando un pico en las primeras horas, para luego disminuir a niveles basales (Blaby et al., 2013). En cambio, los genes involucrados en la biosíntesis de TAG aumentan gradualmente. Esta regulación lleva a una síntesis de almidón que parece preceder a la de TAG (Cakmak et al., 2012; Fan et al., 2012; Siaut et al., 2011).

Los TAG son lípidos neutros que no forman parte de las membranas, sino que se acumulan en las gotas de grasa (LDs, *Lipid Droplets*) y se sintetizan principalmente en el retículo endoplásmico desde donde emergen. Durante la vida de *Chlamydomonas*, las LDs se forman, se metabolizan y desaparecen en respuesta al estado de desarrollo o cambios ambientales. Las LDs previenen de la lipotoxicidad, del efecto tóxico de ácidos grasos libres, contribuyen a la homeostasis lípido/energía y se degradan para proporcionar los ácidos grasos necesarios para la re-síntesis de lípidos de membrana, abastecer las necesidades energéticas, o producir precursores para procesos de señalización celular (Farese and Walther, 2009; Ischebeck et al., 2020). El tamaño y la composición de las LDs varía según las condiciones ambientales. Son pequeñas, en condiciones óptimas de cultivo, pero aumentan en condiciones adversas como

es la falta de N (Goold et al., 2016; Siaux et al., 2011). En cuanto a la composición de las LDs, estas contienen  $\approx 90\%$  TAGs,  $\approx 10\%$  de lípidos de membrana y  $\approx 5\%$  de proteínas. Sin embargo, según las condiciones ambientales, varía la composición de TAG, la relación TAG/lípidos de membrana, y la composición en proteínas. Por ejemplo, en deficiencia de N los TAG contienen menos ácidos grasos poliinsaturados (Goold et al., 2016; Légeret et al., 2016) y la mayoría de los lípidos provienen de LDs del retículo endoplasmático ( $\approx 60\%$  DGTS (*Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine*), PtdIns (*Phosphatidylinositol*) y PtdEtn (*Phosphatidylethanolamine*) (Goodson et al., 2011; Goold et al., 2016). En cuanto a su localización, las LDs con alto contenido en TAG se encuentran en el citosol pero también se han encontrado en cloroplasto en respuesta a la falta de N o alta luz (Fan et al., 2011; Goodson et al., 2011; Goold et al., 2016). La asociación de LDs a membranas del cloroplasto estaría apoyada por la presencia de enzimas que participan en la síntesis de TAG y que tienen una localización cloroplástica como son GPAT1 (*Plastid Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1*), DGAT1 (*Diacylglycerol Acyltransferase 1*), y PDAT1 (*Phospholipid Diacylglycerol Acyltransferase 1*). En resumen, se propone que el metabolismo de estas LDs estaría conectado con la homeostasis de los lípidos del cloroplasto.

Finalmente, la falta de N determina que las células vegetativas (haploides) de *Chlamydomonas* se diferencien en gametos. Durante este programa de diferenciación, tiene lugar la expresión de una serie de genes que definen el “*mating type*” y otros que participan en la activación de peregametos en gametos (Abe et al., 2005, 2004; Goodenough et al., 2007; Sager and Granick, 1954).

Entre estos genes podemos encontrar algunos de los genes NSG1-18 (*Nitrogen-Starved Gametogenesis*) a los que se les asigna una expresión temporal, que puede ser rápida, media, o tardía. Algunos de ellos parecen estar relacionados con procesos de adquisición de N (Abe et al., 2005).

El “*mating type*” está regulado por la proteína MID, un factor de transcripción que pertenece a la familia RWP-RK. MID participa en la activación/represión de los siguientes genes: 1) SAD1 (*Sexual Adhesion*), localizado en el locus MT, 2) SAG1 (*Sexual Agglutination*), no ligado a MT y que codifica la aglutinina<sup>+</sup> y se expresa en los gametos + pero no en los gametos - (Ferris et al., 2005), 3) GSP1 (*Gamete-Specific Plus, mating type, molecule 1*), no ligado a MT, y que codifica una proteína con homeodominio que es específica de gameto + y funciona en el cigoto (Kurvari et al., 1998), y 4) GSM1 (*Gamete-Specific Minus, mating type, molecule 1*), no ligado a MT, y que codifica una proteína con homeodominio que interacciona con GSP1. Finalmente, para la activación de peregameto a gameto es necesaria luz azul, ya que son las

fototropinas y el criptocromo CrCRY quienes regulan el proceso (Zou et al., 2017).

# OBJETIVOS

---

El objetivo de este trabajo ha sido investigar cómo el  $\text{NO}_3^-$  como nutriente o como molécula señal impacta en diferentes rutas y procesos en *Chlamydomonas*. Estos objetivos se desarrollan en los siguientes Capítulos:

**Capítulo 1.** Desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  en *Chlamydomonas*.

**Capítulo 2.** Regulación por  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 sobre la asimilación del nitrógeno orgánico y otros procesos en *Chlamydomonas*.

**Capítulo 3.** Estudio de rutas metabólicas, promotores y factores de transcripción que se regulan por nitrógeno.

Los tres Capítulos están interconectados, siendo los estudios transcriptómicos (Capítulo 3) los que iniciaron las preguntas que se tratan de responder en los Capítulos 1 y 2.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



# **CAPÍTULO 1. Desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$ en *Chlamydomonas***

---



# CAPÍTULO 1. Desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ a $\text{N}_2\text{O}$ en *Chlamydomonas*

---

Para el estudio de la desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  nos planteamos los siguientes objetivos:

- Análisis de genomas de algas para la búsqueda de genes implicados en dicho proceso.
- Establecer y validar una estrategia para estudiar la desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  y estudiar el papel de NIT2, NR y NiR en dicho proceso.
- Estudiar el papel de FLV y CYP55 en la desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ .
- Análisis en las alteraciones de las emisiones de  $\text{CO}_2$  como consecuencia de la desasimilación de  $\text{NO}_2^-$ .
- Estudio fenotípico de los mutantes de NiR.

## 1.1. Análisis de genomas de algas para la búsqueda de genes implicados en la desasimilación de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ y la producción de $\text{N}_2\text{O}$

Las razones que justifican este análisis son las siguientes:

a) Al igual que otras microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii* puede desasimilar  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  en condiciones axénicas (Guiéysse et al., 2013; Plouviez et al., 2019, 2017).

b) En *Chlamydomonas*, se han identificado dos proteínas, CYP55 y FLVs, involucradas en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  mediante actividad NO reductasa ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) (Burlacot et al., 2020; Plouviez et al., 2017).

c) *Chlamydomonas* conserva en su genoma otros genes que también podrían estar involucrados en la desasimilación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$ . Estos son *NIRK*, que codifica una enzima con actividad  $\text{NO}_2^-$  reductasa ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ), y los genes *HCPs* (*Hybrid Cluster Proteins*), que codifican enzimas que se han propuesto como NO reductasas en bacterias ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ). Muchos de los genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo del NO se regulan por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  (Capítulo 3).

**Tabla 1.1. Presencia de *NIRK*, *CYP55*, *HCPs*, *FLVs*, número de genes, y producción de N<sub>2</sub>O en microalgas**

Microalga	<i>NIRK</i>	<i>HCP</i>	<i>CYP55</i>	<i>FLVA</i>	<i>FLVB</i>	N <sub>2</sub> O Ref.	Microalga	<i>NIRK</i>	<i>HCP</i>	<i>CYP55</i>	<i>FLVA</i>	<i>FLVB</i>	N <sub>2</sub> O Ref.
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	4	1	1	1	+ [1,2]	<i>Coccomyxa subelipsoidea</i>				2	2	+ [1]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	1	3	2	1	1		<i>Coccomyxa sp. Obi</i>				1	1	
<i>Scenedesmus obliquus UTEX 393</i>	1	2	1	2	2	+ [3]	<i>Micromonas pusilla</i>				1	1	
<i>Scenedesmus obliquus EN0004</i>	1	2	1	2	1	+ [3]	<i>Micromonas commoda</i>				1	1	
<i>Chlamydomonas debaryana</i>	1	4		1	1		<i>Chlorella desiccata</i>	3				3	
<i>Chlamydomonas incerta</i>	1	4		1	1		<i>Chlamydomonas sp.UWO 241</i>	2				1	
<i>Chlamydomonas schloesseri</i>	1	4		1	1		<i>Monoraphidium neglectum SAG 48.87</i>	1	2				
<i>Volvox reticuliferus</i>		2	1	2	2		<i>Ostreobium quekettii</i>				1		
<i>Raphidocelis subcapitata</i>		2	1	1	1		<i>Pedinophyceae sp. YPF-701</i>				1		
<i>Volvox africanus</i>		1	1	2	1		<i>Picochlorum sp. BPE23</i>				2		
<i>Gonium pectorale</i>		2	1	1	1		<i>Trebouxia sp. A1-2</i>				1		
<i>Chlorella variabilis</i>		2	1	1	1	+ [1]	<i>Nannochloropsis salina</i>	1					+ [5,6]
<i>Scenedesmus sp. NREL 46B-D3</i>		1	1	1	1		<i>Nannochloropsis oceanica CCMP1779</i>	1					
<i>Micractinium conductrix</i>		5		1	1		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	1					- [1]
<i>Volvox carteri</i>		2		2	2		<i>Yamagishiella unicocca</i>	1					
<i>Astrephomene gubernaculifera</i>		2		1	1		<i>Haematococcus lacustris</i>	1					
<i>Monoraphidium minutum</i>		2		1	1		<i>Yamagishiella unicocca</i>	1					
<i>Chlamydomonas eustigma</i>		1		1	1		<i>Tetrabaena socialis</i>	1					
<i>Scenedesmus sp. PABB004</i>		1		1	1		<i>Galdieria sulphuraria</i>	1					- [1]
<i>Chlorella vulgaris</i>		1	1		1	+ [4]	<i>Porphyridium purpureum</i>						- [1]
<i>Gonium pectorale</i>		2	1	1			<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	1					- [1]
<i>Chlorella ohadii</i>	1	2			2		<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1	1				- [1]
<i>Bathycoccus prasinos</i>				1	1		<i>Guillardia theta CCMP2712</i>	1					
<i>Bathycoccus lucimarinus</i>				1	1		<i>Andalucia godoyi</i>	1					
<i>Ostreococcus tauri</i>				1	1		<i>Phaeocystis antarctica CCMP1374</i>	1					
<i>Klebsormidium nitens</i>				1	1		<i>Emiliana huxleyi</i>	1					

Especies de la división Clorofita en verde. Especies de la división Rodofita en gris. N<sub>2</sub>O/Ref., representa si son positivos o negativos (+/-) en la producción de N<sub>2</sub>O. Ref. [1](Burlacot et al., 2020); [2] (Plouviez et al., 2017); [3] (Weathers, 1984); [4] (Guieysse et al., 2013); [5] (Flores-Leiva et al., 2010); [6] Fragesone et al., 2011). Todas las ID de las proteínas se encuentran en el Anexo I.

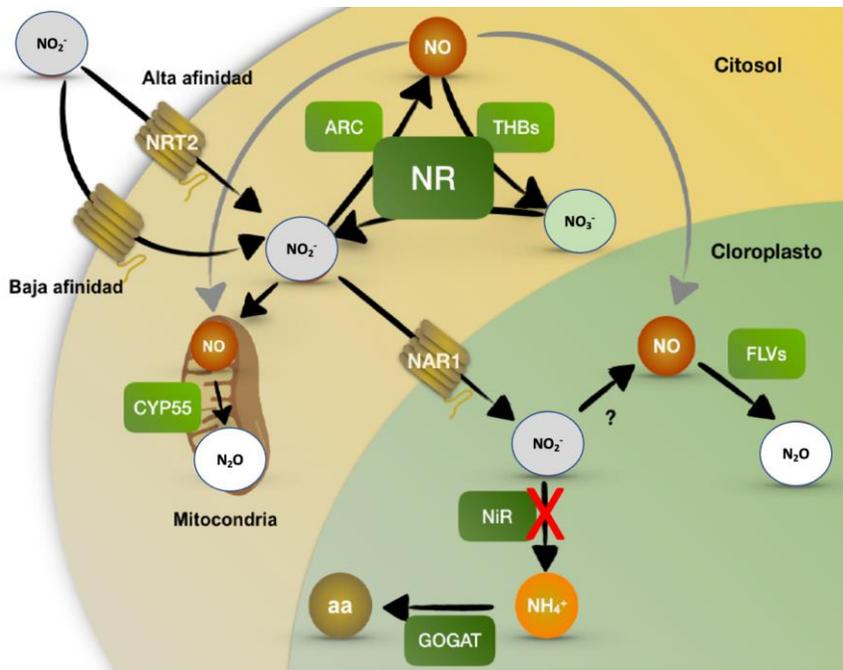
Primeramente, quisimos estudiar qué genes estaban conservados en los genomas de algas que las hacen potencialmente productoras de  $N_2O$ . Este análisis, publicado y discutido en detalle en Bellido-Pedraza et al., 2020 (Anexo I), destaca que, de los 33 genomas inicialmente analizados, sólo tres especies de clorofitas (*Chlamydomonas reinhardtii*, dos subespecies de *Scenedesmus obliquus*, y *Chlorella sorokiniana*) contienen un “set” completo *NIRK*, *CYP55*, *FLVs*, y *HCPs* y producen  $N_2O$  (Burlacot et al., 2020; Plouviez et al., 2019, 2017). Una búsqueda actualizada nos ha permitido identificar que otras especies de algas verdes como *Chlamydomonas schloesseri*, *Chlamydomonas incerta*, *Edaphochlamys debaryana* y *Chlorella ohadii* poseen *NIRK*, *FLVs*, y *HCPs*, pero la producción de  $N_2O$  no está documentada (Tabla 1.1).

El resto de las microalgas, poseen *NIRK* o contienen uno o varios de los genes que codifican las proteínas *FLVs*, *CYP55*, y *HCPs*. Este segundo grupo engloba la mayoría de las algas, incluida *Chlorella vulgaris*, un alga para la que se ha descrito la producción de  $N_2O$  a partir de  $NO_2^-$  en condiciones axénicas (Guieysse et al., 2013). Sin embargo, se desconoce la fuente de  $NO$  en ausencia de *NIRK*.

## **1.2. Establecimiento y validación de una estrategia para estudiar la desasimilación de $NO_3^-$ y $NO_2^-$ a $N_2O$ en *Chlamydomonas* y determinar el papel de *NIT2* y la *NR***

Nuestra hipótesis de trabajo es que los mutante de *NiR* (*nii1*), que no pueden asimilar  $NO_3^-$  o  $NO_2^-$ , pueden ser una herramienta útil para estudiar la desasimilación hasta  $N_2O$ . En la Figura 1.1 se resumen las posibles rutas para la metabolización del  $NO_3^-/NO_2^-/NO$  en *Chlamydomonas*. Además, la construcción de dobles o triples mutantes permitiría estudiar la función de cada uno de estos componentes de las rutas de desasimilación.

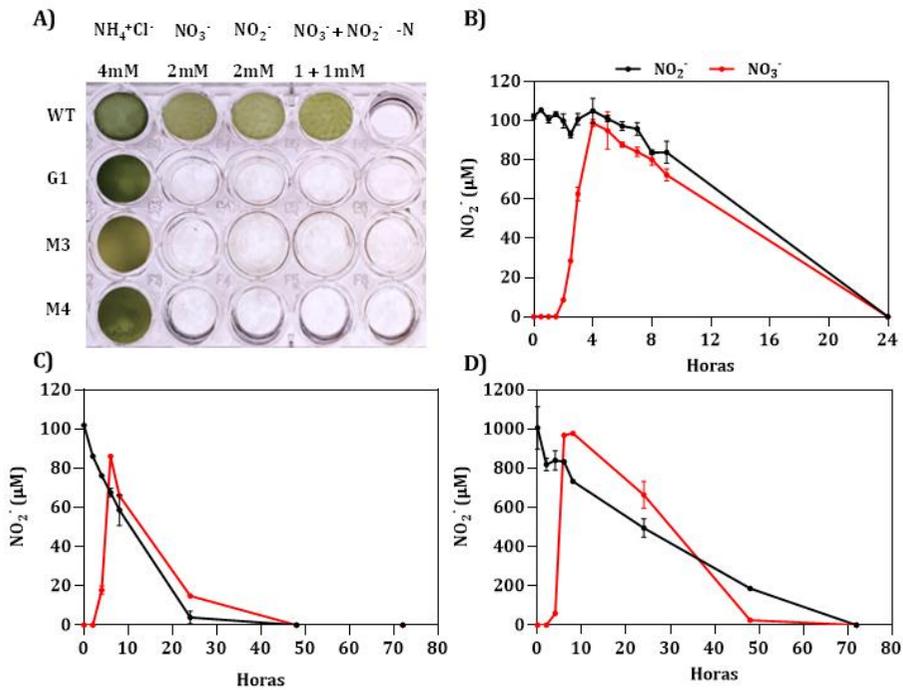
En un primer estudio se procedió a validar el sistema, así como analizar el papel de la *NR* y *NIT2* en el proceso de desasimilación de  $NO_2^-$ . Los resultados de este estudio se han publicado (Bellido-Pedraza et al., 2022) (Anexo II) y se comentan y discuten a continuación.



**Figura 1.1. Modelo de hipótesis de trabajo para el estudio de la desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ .** En este modelo se muestran las diferentes rutas que seguiría el  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  en los mutantes de NiR.

### 1.2.1. Los mutantes *nii1* no crecen en $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ pero pueden reducirlos hasta $\text{N}_2\text{O}$

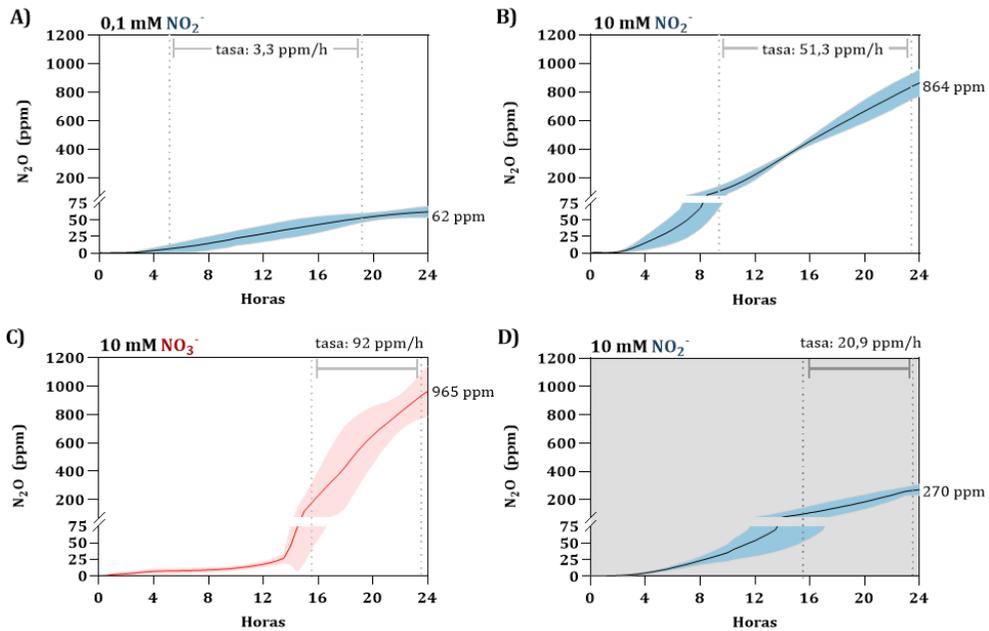
Los mutantes de *Chlamydomonas* (G1, M3 y M4) carecen de la enzima NiR (ver Materiales y Métodos para más detalles) y no pueden reducir el  $\text{NO}_2^-$  hasta  $\text{NH}_4^+$ , por lo tanto, no pueden crecer en medios que contengan  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  como única fuente de nitrógeno (Navarro et al., 2000) (Figura 1.2A). Para la validación del sistema se utilizó la estirpe M3. Esta estirpe se creció en medios con  $\text{NH}_4^+$  y luego se transfirió a las condiciones de los correspondientes ensayos ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$ ). Nuestros resultados muestran que la estirpe M3 es capaz de metabolizar el  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$ , haciéndolos desaparecer del medio de cultivo (Figuras 1.2B-D). Esto ocurrió tanto en cultivos cerrados herméticamente (Figuras 1.2C-D) como en aquellos en los que se permitió el intercambio gaseoso (Figura 1.2B). En el caso del  $\text{NO}_3^-$ , se produce la reducción a  $\text{NO}_2^-$  en primer lugar, el cual posteriormente se excreta al medio para finalmente ser metabolizado.



**Figura 1.2. Los mutantes *nii1* no crecen en  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  pero pueden metabolizarlo.** **A)** Crecimiento de los cultivos de los mutantes *nii1* (M3, M4, y G1) en diferentes fuentes de N. **B)** Reducción de  $\text{NO}_3^-$  100  $\mu\text{M}$  a  $\text{NO}_2^-$  y posterior metabolización del  $\text{NO}_2^-$  por la estirpe M3 en cultivos no herméticos. Consumo de  $\text{NO}_2^-$  100  $\mu\text{M}$  en cultivos no herméticos. **C)** Reducción de  $\text{NO}_3^-$  100  $\mu\text{M}$  a  $\text{NO}_2^-$  y posterior metabolización del  $\text{NO}_2^-$  en la estirpe M3 en cultivos herméticos. Consumo de  $\text{NO}_2^-$  100  $\mu\text{M}$  en cultivos herméticos. **D)** Reducción de  $\text{NO}_3^-$  1000  $\mu\text{M}$  a  $\text{NO}_2^-$  y posterior metabolización del  $\text{NO}_2^-$  en la estirpe M3 en cultivos herméticos. Consumo de  $\text{NO}_2^-$  1000  $\mu\text{M}$  en cultivos herméticos. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

En los cultivos herméticamente cerrados se monitorizaron las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  utilizando la metodología de espectroscopia CRDS (*Cavity Ring-Down Spectroscopy*). Esta metodología permite monitorizar la concentración de  $\text{N}_2\text{O}$ , de forma continua, en el espacio de cabeza de los cultivos. Nuestros resultados mostraron que los cultivos de la estirpe M3 producían  $\text{N}_2\text{O}$  de una forma dependiente de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  y también en medios con  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1.3). Cuando las células se incubaron en presencia de  $\text{NO}_2^-$  0,1 mM, éstas comenzaron a producir  $\text{N}_2\text{O}$  después de 2-3 h con una tasa de producción de 3,3 ppm/h. La producción alcanzó su máximo a las 21 h, con una concentración final de 62 ppm después de 24 h (Figura 1.3A). En presencia de  $\text{NO}_2^-$  10 mM, la tasa de producción fue 15 veces mayor (51 ppm/h) y la producción no se detuvo

después de 24 h, alcanzando valores de 864 ppm durante el primer día (Figura 1.3B). Cuando las células se incubaron con 10 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1.3C), la producción se retrasó, debido a que las células tenían que reducir el  $\text{NO}_3^-$  hasta  $\text{NO}_2^-$  (excretarlo y volverlo a captar), antes de reducirlo hasta  $\text{N}_2\text{O}$ . Sin embargo, la tasa de producción de  $\text{N}_2\text{O}$  fue mucho mayor alcanzando valores de 92 ppm/h. En medios sin N no se observaron emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ .



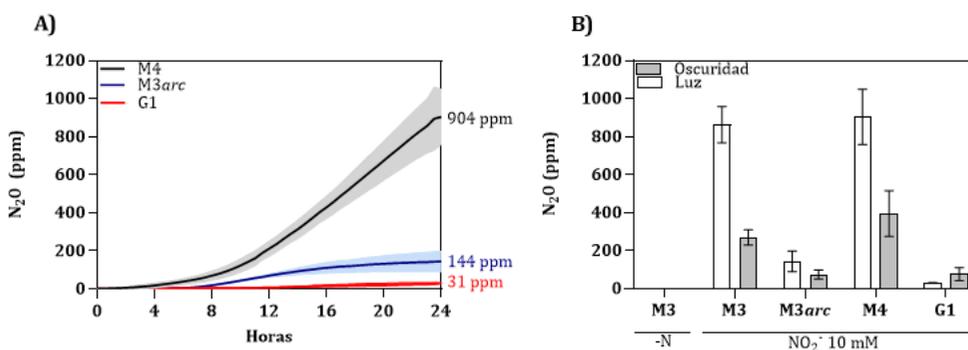
**Figura 1.3. El mutante *nii1* M3 metaboliza el  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$ . A), B), y C) Emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  en cultivos herméticos en luz y D) oscuridad. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .**

Tanto la producción total de  $\text{N}_2\text{O}$  a las 24 h como la tasa de producción fueron más bajas en la oscuridad (270 ppm y 20 ppm/h, respectivamente) que, en la luz, lo que resalta la importancia de la presencia de luz en este proceso.

Estos resultados nos permitieron validar que los mutantes *nii1* generan cantidades muy significativas de  $\text{N}_2\text{O}$  y constituyen un modelo útil para estudiar la desasimilación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  y la relevancia de otras enzimas involucradas en este proceso.

## 1.2.2. El complejo NR-ARC contribuye fuertemente a la producción de N<sub>2</sub>O tanto en luz como en oscuridad

En plantas y algas, la NR (enzima citosólica) parece ser la principal responsable de la síntesis de NO desde NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, a pesar de que se proponen otras rutas de síntesis de NO en el cloroplasto y en la mitocondria (Astier et al., 2018). Es por ello, que decidimos estudiar el papel del complejo NR-ARC en el suministro de NO para la posterior formación de N<sub>2</sub>O. Comparamos la emisión de N<sub>2</sub>O entre los mutantes M4 y M3 (*nii1*, NR+), G1 (*nii1*, NR-), y el mutante M3arc (*nii1*, *arc*) (Figura 1.4). La estirpe M4 es igual que la estirpe M3 salvo que carece de los transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de alta afinidad (ver Materiales y Métodos). Al usar altas concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en estos experimentos, los niveles de emisiones de N<sub>2</sub>O en las estirpes M3 y M4 fueron prácticamente los mismos (Figura 1.4). Nuestros resultados mostraron que las estirpes que carecían de NR o ARC producían niveles mucho más bajos de N<sub>2</sub>O que las estirpes M3 y M4 tanto en la luz como en la oscuridad (Figura 1.4). En luz, la contribución de la NR en los niveles de N<sub>2</sub>O a las 24 h sería de un 96% (≈900 ppm en M3 o M4 vs 31 ppm en G1), mientras que en oscuridad su contribución sería de un 72% (≈300 ppm en M3 o M4 frente a 77 ppm en G1) (Figura 1.4B).

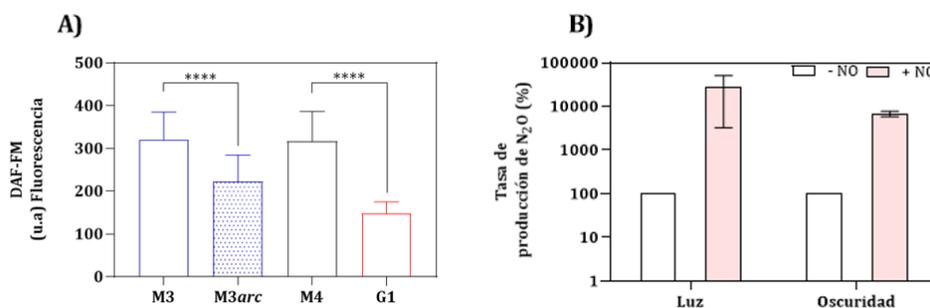


**Figura 1.4. El complejo NR-ARC contribuye fuertemente a la producción de N<sub>2</sub>O tanto en luz como en oscuridad, a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.** **A)** Emisión de N<sub>2</sub>O en luz por las estirpes M4, G1 y M3arc, a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM. **B)** Comparación de las emisiones de N<sub>2</sub>O por las diferentes estirpes en luz y en oscuridad. Las barras de error representan ±SD, *n* ≥ 3.

## 1.2.3. El complejo NR-ARC es importante en la desasimilación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produciendo NO

Para confirmar que la NR sería el mayor proveedor de NO para su posterior reducción a N<sub>2</sub>O, procedimos a medir los niveles de NO en las cuatro estirpes

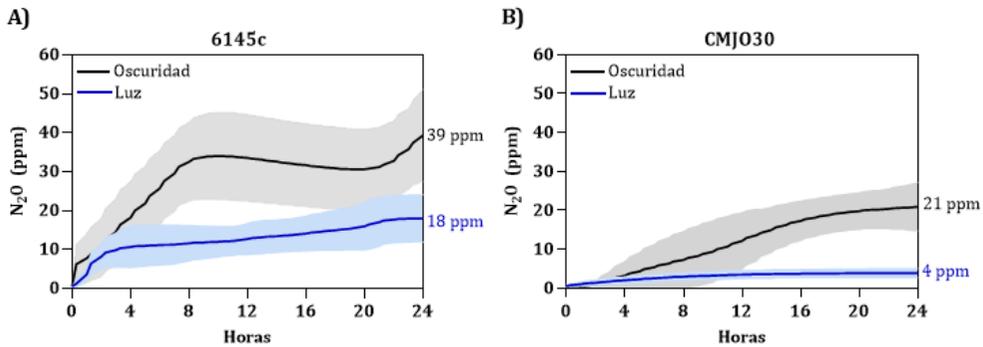
(M3, M3arc, M4 y G1). Utilizamos la sonda de fluorescencia DAF-FM en células que se habían incubado durante 24 h en presencia de luz y  $\text{NO}_2^-$  10 mM. Las estirpes G1 y M3arc mostraron una significativa reducción en la fluorescencia respecto a las estirpes M4 y M3 (Figura 1.5A). Además, cuando la estirpe G1 fue suplementada con un donador de NO (DEA-NONOate 40  $\mu\text{M}$ ) se produjo un gran aumento en las tasas de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  (Figura 1.5B). Este dato sugiere que la baja producción de  $\text{N}_2\text{O}$  observada en la estirpe G1 sería consecuencia de una limitada síntesis de NO. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el complejo NR-ARC tiene un papel predominante en la producción del sustrato para las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ .



**Figura 1.5. La estirpe G1 produce poco NO y emite poco  $\text{N}_2\text{O}$ .** **A)** Acumulación intracelular de NO, medido con la sonda fluorescente DAF-FM, tras incubar las estirpes M3arc y G1 en  $\text{NO}_2^-$  10 mM. Unidades arbitrarias (u.a) de fluorescencia. **B)** Aumento en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  tras añadir el donador de NO (DEA-NONOate 40  $\mu\text{M}$ ). Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ . Se realizó una prueba *t* de Student's. \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

#### 1.2.4. Emisiones de $\text{N}_2\text{O}$ a partir de $\text{NO}_2^-$ en estirpes WT y mutante *nit1nit2*

Las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  a partir  $\text{NO}_2^-$  disminuyen considerablemente cuando la asimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  es funcional (estirpe WT, 6145c), pero son aún más reducidas en un mutante *nit1nit2* (CMJ030) que carece de la NR y del regulador transcripcional NIT2 que es clave para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1.6). Las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en luz alcanzaron valores de 18 y 4 ppm en las estirpes 6145c y CMJ030, respectivamente; en la oscuridad, los valores fueron 39 y 21 ppm, respectivamente. Estos datos indican que el  $\text{N}_2\text{O}$  es un bioproducto derivado de la ruta de asimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  en *Chlamydomonas*.



**Figura 1.6. Emisiones de N<sub>2</sub>O a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en la estirpe WT y el mutante *nit1nit2*.** Las emisiones de N<sub>2</sub>O que se muestran son a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM, tanto en luz como en oscuridad. **A)** Estirpe WT (6145c). **B)** Mutante *nit1nit2* (CMJ030). Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

### 1.3. Papel de FLV y CYP55 en la desasimilación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub>O

FLV y CYP55 se han propuesto como dos NO reductasas que reducen NO a N<sub>2</sub>O en luz y en oscuridad, respectivamente (Burlacot et al., 2020; Plouviez et al., 2017). A continuación, pasamos a estudiar el comportamiento de FLV y CYP55 en nuestro sistema y para ello construimos las estirpes dobles mutantes M3*flv* y M3*cyp55* (ver Materiales y Métodos).

Como muestra la Tabla 1.2 y la Figura 1.7, las emisiones de N<sub>2</sub>O disminuyen significativamente en las estirpes M3*flv* y M3*cyp55* cuando se comparan con las observadas en la estirpe M3, tanto en luz como en oscuridad. En luz, M3*flv* produce  $\approx$ 36 ppm y M3*cyp55*  $\approx$ 4 ppm frente a las  $\approx$ 900 ppm que produce M3. En oscuridad, M3*flv* produce  $\approx$ 65 ppm y M3*cyp55*  $\approx$ 1 ppm frente a  $\approx$ 270 ppm que produce M3. Es decir, la ausencia de la proteína CYP55 parece reducir casi completamente las emisiones de N<sub>2</sub>O en ambas condiciones.

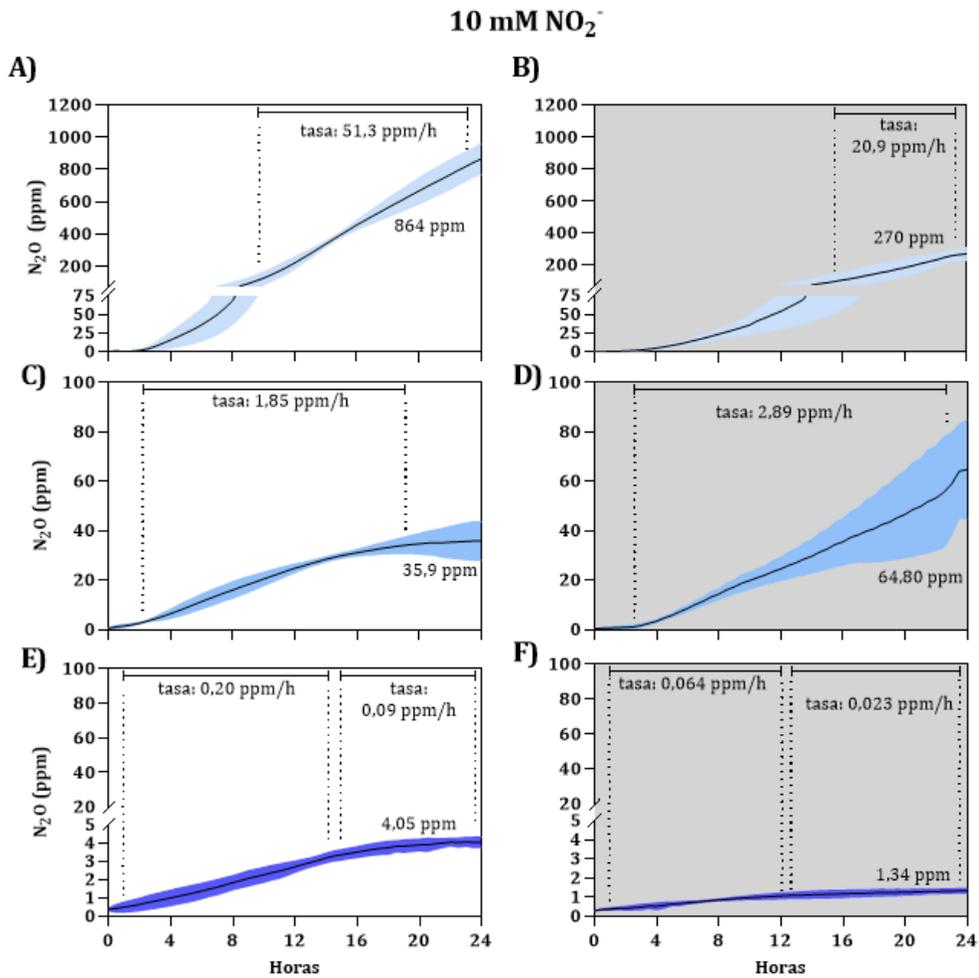
**Tabla 1.2. Emisiones de N<sub>2</sub>O a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM por diferentes estirpes de *Chlamydomonas* en condiciones mixotróficas y heterotróficas.**

Emisiones de N <sub>2</sub> O en luz		
Estirpes	Fondo Genético	N <sub>2</sub> O (ppm)
M3	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2)	864,04±95,30
M3arc	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2) arc	144,44±54,39
M3flv	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2) flv	35,87±7,84
M3cyp55	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2) cyp55	4,05±0,28
M4	( $\Delta$ NIII, NIA1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIA1	904,67±145
G1	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)	30,9±1,14
6145	WT	17,97±6,08
CMJO30	nit1nit2	3,86±1,22
Sin células		0,40±0,01

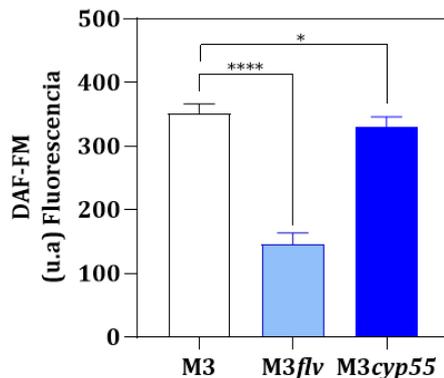
Emisiones de N <sub>2</sub> O en oscuridad		
Estirpes	Fondo Genético	N <sub>2</sub> O (ppm)
M3	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2)	269,96±35,13
M3arc	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2) arc	75,27±23,18
M3flv	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2) flv	64,80±20,08
M3cyp55	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2) cyp55	1,34±0,12
M4	( $\Delta$ NIII, NIA1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIA1	395,67±120,33
G1	( $\Delta$ NIII, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)	77,03±34,41
6145	WT	39,34±11,85
CMJO30	nit1nit2	20,99±6,16

Datos de emisión de N<sub>2</sub>O (ppm) acumulados tras 24 h de inducción. Se representa la media ± desviación estándar de al menos tres experimentos. Para cada una de las estirpes se describe el fondo genético.



**Figura 1.7. La ausencia de FLV o CYP55, disminuye drásticamente la producción de N<sub>2</sub>O a partir de 10 mM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.** Se muestra las emisiones de N<sub>2</sub>O de las estirpes M3 (A, B); M3<sub>flv</sub> (C, D) y M3<sub>cyp55</sub> (E, F) en luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris). Las barras de error representan ±SD, n ≥ 3.

Para ver si la incapacidad de sintetizar N<sub>2</sub>O es resultado de un defecto de la producción de NO, se determinó la acumulación de NO usando DAF-FM en las estirpes dobles mutantes y en M3 (Figura 1.8A). Se observó que los niveles de NO eran similares en las estirpes M3<sub>cyp55</sub> y M3, pero no en M3<sub>flv</sub>, la cual acumulaba tres veces menos NO. Curiosamente, M3<sub>flv</sub> tiene un comportamiento similar a la estirpe G1 que carece de NR.



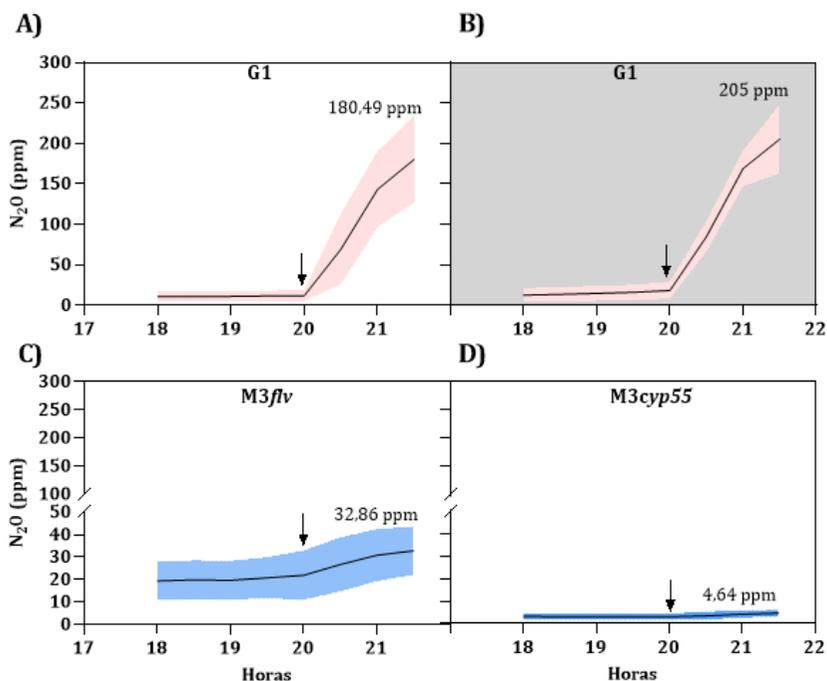
**Figura 1.8. Acumulación de NO en las estirpes M3, M3flv y M3cyp55.** Acumulación de NO tras 20 h de incubación en  $\text{NO}_2^-$  10 mM. Unidades arbitrarias (u.a) de fluorescencia. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ . Se realizó una prueba *t* de Student's. \*  $p < 0,05$ . \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Con el objeto de determinar si las bajas emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en M3flv se deben a una baja producción de NO, a pesar de tener NR, se estudió el efecto del donador de NO en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  (Figura 1.9). En la estirpe G1 (usada como control), al añadir el donador de NO, se observa un aumento en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  que va desde  $\approx 20$  ppm a  $\approx 200$  ppm, tanto en luz como en oscuridad. Es decir, el donador de NO revierte la deficiencia de su producción por la NR, indicando que la baja emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  en este mutante se debe a una baja producción de NO al faltarle la enzima NR.

En la estirpe M3flv y luz, al añadir NO se observa un aumento muy ligero en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  que va desde  $\approx 20$  ppm a  $\approx 30$  ppm ( $\approx 20$  veces menos si se compara con G1). Es decir, este dato sugiere que la ausencia de FLV es lo que determina la baja producción de NO y  $\text{N}_2\text{O}$ . Sin embargo, no sabemos por qué la ausencia de FLV reduce los niveles intracelulares de NO. Una posibilidad sería que la falta de FLV, que funciona como una válvula de escape en condiciones de alto poder reductor (Chaux et al., 2017), redujese el flujo de electrones en el cloroplasto disminuyendo el NADPH producido. Esta caída en la producción de NADPH podría disminuir la actividad de síntesis de NO por parte de la NR que requiere poder reductor.

En la estirpe M3cyp55, el donador de NO prácticamente no varía la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  en luz ( $\approx 3$  ppm a  $\approx 4$  ppm,  $\approx 180$  veces menos si se compara con G1). Este dato, junto con los niveles de NO observados en este mutante, sugiere que las células son capaces de producir NO (NR), pero la ausencia de CYP55 conlleva una producción casi nula de  $\text{N}_2\text{O}$  a pesar de tener FLV.

Estos datos son interesantes, ya que se relacionan las actividades de estas dos proteínas (FLV y CYP55) presentes en diferentes orgánulos y apunta a una interacción entre el cloroplasto y la mitocondria. Sin embargo, se requieren más datos experimentales para conocer los mecanismos que expliquen por qué la ausencia de CYP55 lleva a que la enzima FLV no sea capaz de sintetizar  $N_2O$ , a pesar del exceso de NO.



**Figura 1.9. Efecto del donador de NO en las emisiones de  $N_2O$  por las estirpes G1, M3cyp55 y M3flv.** Las diferentes estirpes fueron incubadas en presencia de  $NO_2^-$  10 mM. A las 20 h se añadió el donador de NO (DEA-NONOate 40  $\mu$ M, indicado con la flecha) y cuantificó la producción de  $N_2O$ . **A), C) y D)** estirpes G1, M3flv, y M3cyp55 en presencia de luz. **B)** estirpe G1 en oscuridad. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

## 1.4. Análisis de las alteraciones en las emisiones de $CO_2$ como consecuencia de la desasimilación de $NO_2^-$

### 1.4.1. El $NO_2^-$ altera las emisiones de $CO_2$ en los mutantes de NiR

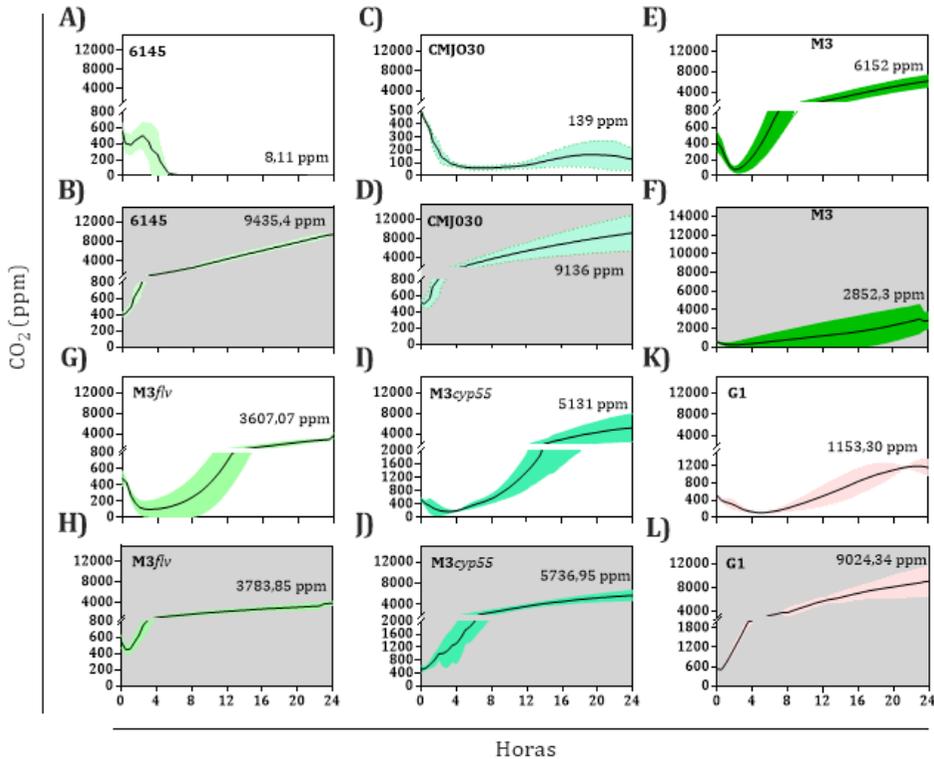
Una observación interesante fue que el  $NO_2^-$  modifica las emisiones de  $CO_2$  en los mutantes de NiR. Los datos para todas las estirpes se recogen en la Tabla 1.3 y se analizaron en detalle para algunas de ellas (Figura 1.10).

**Tabla 1.3. Emisiones de CO<sub>2</sub> en condiciones mixotróficas y heterotróficas en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM por diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.**

Emisiones de CO <sub>2</sub> en luz		
Estirpes	Fondo Genético	CO <sub>2</sub> (ppm)
M3	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> )	6151,74±1174,89
M3arc	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> ) arc	7626,78±60,46
M3flv	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> ) flv	3607,07±469,65
M3cyp55	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> ) cyp55	5130±2682,29
M4	( <i>ΔNIII1, NIA1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIA1</i> )	5188,67±527,34
G1	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2</i> )	1153,3±194,74
6145	WT	8,11±4,75
CMJO30	<i>nit1nit2</i>	138,98±86,56
Sin células		431,70±9,21

Emisiones de CO <sub>2</sub> en oscuridad		
Estirpes	Fondo Genético	CO <sub>2</sub> (ppm)
M3	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> )	2852,27±883,54
M3arc	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> ) arc	9169,14±2292,31
M3flv	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> ) flv	3783,85±378,07
M3cyp55	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2; ::NIT1, ::NRT2.1, ::NAR2</i> ) cyp55	5736,95±897,91
M4	( <i>ΔNIII1, NIA1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIA1</i> )	3658,55±553,67
G1	( <i>ΔNIII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2</i> )	9024,34±2660,84
6145	WT	9435,38±406,73
CMJO30	<i>nit1nit2</i>	9136,33±3712,46

Los datos de emisión de CO<sub>2</sub> (ppm) corresponden a los acumulados tras 24 h de inducción y representan la media ± desviación estándar de al menos tres experimentos. Para cada una de las estirpes se describe el fondo genético.



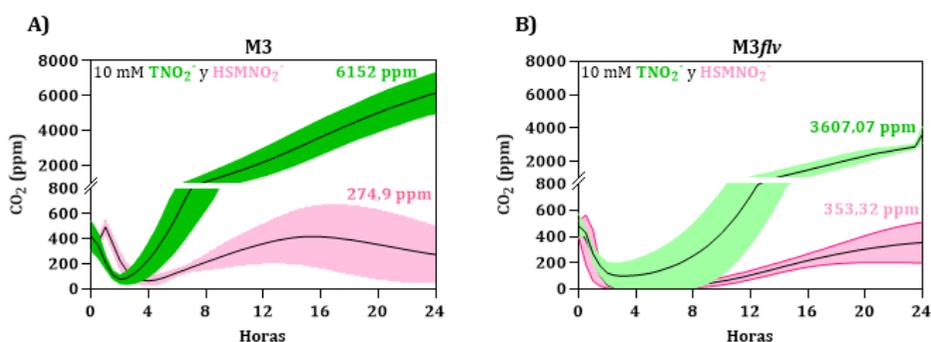
**Figura 1.10. El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> altera las emisiones de CO<sub>2</sub> en los mutantes de NiR.** Monitorización de las emisiones de CO<sub>2</sub> durante 24 h en los cultivos con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM. Las Figuras de fondo claro, experimento en luz. Las Figuras de fondo gris **B)**, **D)**, **F)**, **H)**, **J)** y **L)** experimento en oscuridad. En cada caso se indican las estirpes. **A)** y **B)** 6145c; **C)** y **D)** CMJ030; **E)** y **F)** M3; **G)** y **H)** M3flv; **I)** y **J)** M3cyp55; **K)** y **L)** G1. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

En las estirpes WT (6145c) y mutante *nit1nit2* (CMJ030) no hay emisión de CO<sub>2</sub> en luz (Figura 1.10A y C) (el CO<sub>2</sub> producido por la metabolización del acetato se fija por el ciclo de Calvin) pero sí en oscuridad (Figura 1.10B y D) (hasta  $\approx$ 9000 ppm en 24 h). Sin embargo, en todos los mutantes de NiR se observan emisiones de CO<sub>2</sub> en la luz, que llegan hasta 6152 ppm en la estirpe M3 a las 24 h (Figura 1.10E, G, I, y K), y también en la oscuridad (Figura 1.10F, H, J, y L), aunque en este caso las emisiones fueron menores a las obtenidas para las estirpes 6145c y CMJ030, con excepción de la estirpe G1 que se comporta de manera similar a las estirpes WT. Estos datos sugieren que el NO, generado a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, está alterando la fijación de CO<sub>2</sub> y su producción a partir de acetato.

En condiciones mixotróficas (luz y acetato), las emisiones de CO<sub>2</sub> serían el resultado de un balance entre la fijación de CO<sub>2</sub> (fotosíntesis y ciclo de Calvin-Benson-Bassham) y su producción en el ciclo del TCA (*TriCarboxylic Acid cycle*)

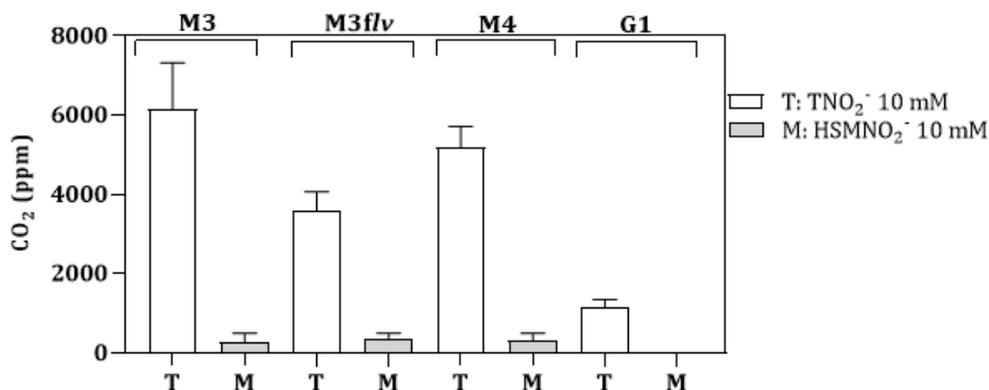
que estaría alimentado por el acetato como fuente exógena de carbono. Aunque también podría estar producida por la movilización de compuestos de carbono almacenados como almidón y lípidos y, en ciertas condiciones y en menor proporción, por la fotorrespiración (Johnson et al., 2013). Nuestros resultados muestran que el  $\text{NO}_2^-$  aumenta las emisiones de  $\text{CO}_2$  en los mutantes de NiR en condiciones de luz (M3 vs WT; Figura 1.10).

Con el objetivo de determinar la contribución del acetato en este proceso, se compararon las emisiones de  $\text{CO}_2$  de las estirpes M3 y M3*flv* en medios con  $\text{NO}_2^-$  en condiciones autotróficas y mixotróficas (Figura 1.11A). El  $\text{CO}_2$  inicial presente en la fase gaseosa de los cultivos ( $\text{CO}_2$  atmosférico) se consume en 2-4 h en ambas condiciones. A continuación, comienza la emisión de  $\text{CO}_2$  que alcanza  $\approx 6000$  ppm a las 24 h en condiciones mixotróficas, pero  $\approx 300$  ppm en autotróficas. Es decir, según estos datos se puede decir que  $\approx 95\%$  del  $\text{CO}_2$  que emite la estirpe M3 en esta condición vendría del acetato. Una situación similar se observa para la estirpe M3*flv* (Figura 1.11B)



**Figura 1.11. Emisiones de  $\text{CO}_2$  en las estirpes M3 y M3*flv* en condiciones mixotróficas y autotróficas.** Las emisiones de  $\text{CO}_2$  determinadas en condiciones mixotróficas ( $\text{TNO}_2^-$ , líneas verdes) y autotróficas ( $\text{HSMNO}_2^-$ , líneas rosas) tras 24 h de inducción en luz. **A)** Estirpes M3 y **B)** M3*flv*. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

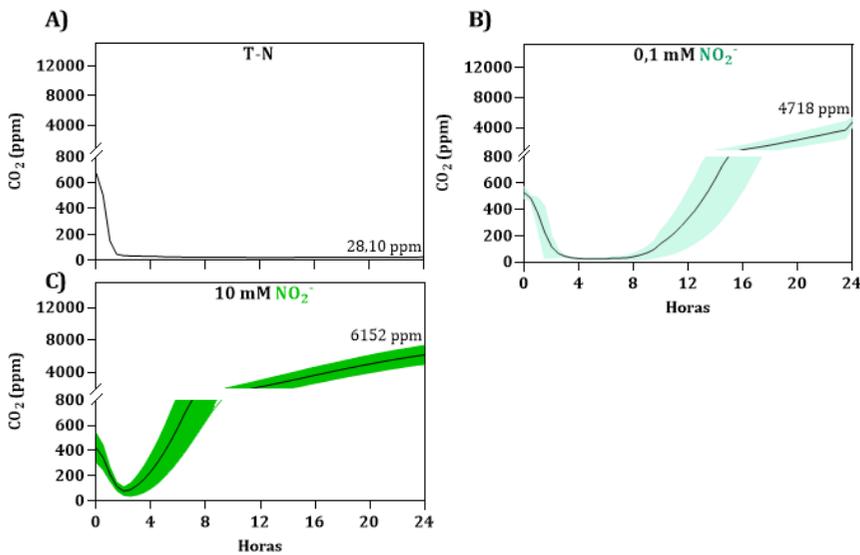
Para otras estirpes analizadas, M4, y G1, se obtuvo un comportamiento similar (Figura 1.12).



**Figura 1.12. Emisiones de CO<sub>2</sub> tras 24 h en diferentes estirpes de *Chlamydomonas* en condiciones mixotróficas y autotróficas.** Condición mixotrófica, con acetato y luz (TNO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y condición autotrófica, sin acetato y luz (HSMNO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Las barras de error representan ±SD,  $n \geq 3$ .

#### 1.4.2. Estudio del efecto del NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y del NO en las emisiones de CO<sub>2</sub>

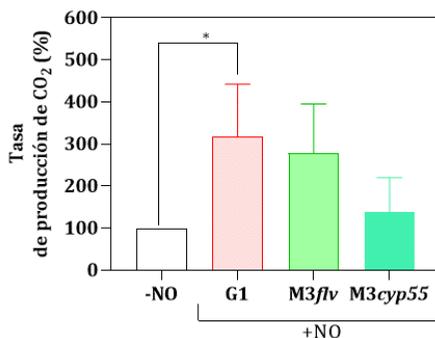
En condiciones mixotróficas, las alteraciones en las emisiones de CO<sub>2</sub> en los mutantes de NiR parecen ser consecuencia del NO generado a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Para comprobar esta hipótesis, se estudiaron las emisiones de CO<sub>2</sub> en la estirpe M3 en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Figura 1.13). En medio sin N, se observa una fase inicial en la que se consume el CO<sub>2</sub> presente en los cultivos y no se observa emisión posterior de CO<sub>2</sub>. En presencia de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, también se observa la fase de consumo del CO<sub>2</sub>, pero a continuación hay una segunda fase de producción de CO<sub>2</sub>. El inicio de esta fase de producción es más temprano a medida que se aumenta el NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. En presencia de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM, la fase de producción se detectaba a las 2 h y se alcanzan niveles de CO<sub>2</sub> de ≈6000 ppm. En NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0,1 mM, la fase de producción se detecta a las 8 h y se alcanzan niveles de CO<sub>2</sub> de ≈4000 ppm.



**Figura 1.13. Efecto del  $\text{NO}_2^-$  en las emisiones de  $\text{CO}_2$  en la estirpe M3.** Las condiciones experimentales son las de la Figura 1.3, **A)** condición de ausencia de N, **B)**  $\text{NO}_2^-$  0,1 mM, **C)**  $\text{NO}_2^-$  10 mM. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

Mientras que la fase inicial de consumo de  $\text{CO}_2$  ocurre en todas las estirpes (ver también Figura 1.10). La segunda fase de producción de  $\text{CO}_2$  es la que estaría diferencialmente afectada en los diferentes mutantes de NiR y coincide con la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  y por tanto con la producción/acumulación de NO en mayor o menor medida.

Se estudió el efecto del donador de NO (DEA-NONOate) en las estirpes G1, M3*flv* y M3*cyp55*. Tras 20 h de incubación en  $\text{NO}_2^-$  10 mM, se añadió el donador de NO y se determinó la tasa de emisión de  $\text{CO}_2$  antes y después del tratamiento. Como muestra la Figura 1.14, se observó un aumento de tres veces en la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  en G1 y M3*flv*, pero no en M3*cyp55*. Cabe recordar que todas estas estirpes emiten poco o muy poco  $\text{N}_2\text{O}$  y que las estirpes G1 y M3*flv* acumulaban menos NO. El resultado de la Figura 1.14 muestra que el efecto del donador de NO fue mayor en aquellas estirpes que acumulaban menos NO, indicando que las mayores emisiones de  $\text{CO}_2$  parecen relacionarse con la acumulación intracelular de NO.

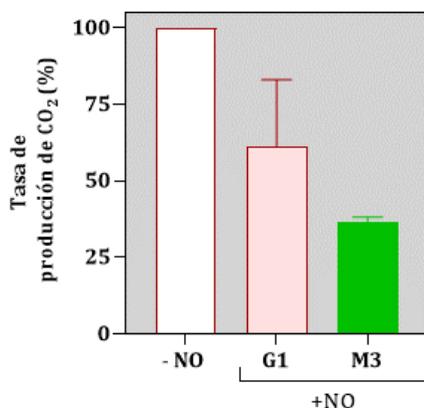


**Figura 1.14. Efecto del NO en las emisiones de CO<sub>2</sub> en condiciones mixotróficas.** Las estirpes G1, M3flv y M3cyp55 se incubaron durante 20 h con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM y con luz. La tasa de emisión de CO<sub>2</sub> se determinó antes y después de añadir del donador de NO (DEA-NONOate 40 μM). Las barras de error representan ±SD,  $n \geq 3$ . Se realizó una prueba *t* de Student's. \*  $p < 0,05$ .

### 1.4.3. Análisis de las emisiones de CO<sub>2</sub> en oscuridad

En condiciones heterotróficas (oscuridad y acetato), las emisiones de CO<sub>2</sub> provienen de la metabolización del acetato del medio y la movilización de compuestos de carbono almacenados. En este caso se observa que las mayores producciones de N<sub>2</sub>O y *por ende* de NO conllevan menores emisiones de CO<sub>2</sub> en los mutantes de NiR (Figura 1.10 y Tabla 1.3).

Esta situación requerirá futuros estudios para saber cómo el NO afecta a las emisiones de CO<sub>2</sub> en la oscuridad. Como resultado preliminar se muestra que el donador de NO produce una ligera inhibición en la emisión de CO<sub>2</sub> en la estirpe G1, tras 20 h de cultivo en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y oscuridad (Figura 1.15) y en la estirpe M3 en ausencia de N. En este caso, la estirpe M3 se incubó un tiempo corto (75 min) en deficiencia de N antes de añadir DEA-NONOate. Cuando añadimos el donador de NO, la producción de CO<sub>2</sub> de la estirpe M3 se redujo un ≈60%, descenso más pronunciado que el observado para la estirpe G1, en la que la producción de CO<sub>2</sub> disminuyó solo un ≈30% tras añadirle el donador de NO.



**Figura 1.15. Efecto del NO en las emisiones de CO<sub>2</sub> en condiciones heterotróficas.** La tasa de emisión de CO<sub>2</sub> se determinó antes y después de añadir el donador de NO (DEA-NONOate 40  $\mu$ M). La estirpe G1 fue preincubada durante 20 h en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10 mM. La estirpe M3 fue preincubada en deficiencia de N durante 75 minutos. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

En *Chlamydomonas* se ha descrito que muchas de las enzimas que participan en el metabolismo del acetato pueden sufrir modificaciones de S-nitrosilación en presencia de donadores de NO (Morisse et al., 2014). La enzima ICL (*IsoCitrato Lyase*), esencial para la asimilación de acetato mediante el ciclo del glioxilato, se inhibe en presencia de NO (Morisse et al., 2014). Además, otras enzimas que forman parte del TCA también parecen mostrar regulación por NO. Por lo tanto, es posible que mayores niveles de NO causen una inhibición de la asimilación del acetato y como consecuencia haya una menor emisión de CO<sub>2</sub>, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos con la estirpe M3 en presencia de donadores de NO (Figura 1.15). No obstante, tendríamos que medir los niveles de NO en la oscuridad en las estirpes M3 y en los dobles mutantes M3*flv* y M3*cyp55* para comprobar que los niveles de producción de CO<sub>2</sub> en condiciones heterotróficas se correlacionan inversamente con la acumulación de NO.

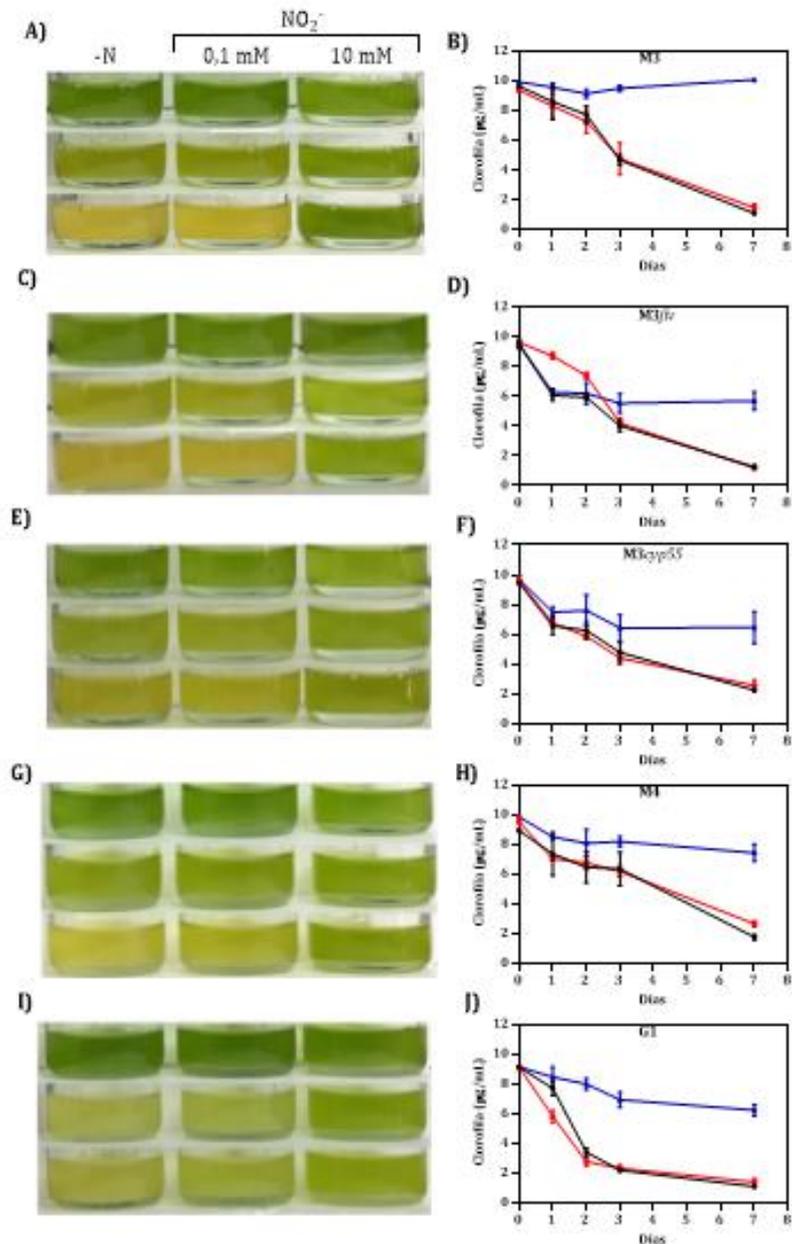
## 1.5. Estudio fenotípico de los mutantes de NiR

En *Chlamydomonas*, uno de los procesos que tienen lugar en respuesta a la deficiencia de N y condiciones mixotróficas es la clorosis. La falta de N, en presencia de luz y acetato, da lugar a una disminución de la actividad fotosintética y fijación de CO<sub>2</sub> y degradación de clorofila (Juergens et al., 2015; Schmollinger et al., 2014; Wei et al., 2014). En esta condición de estrés, el NO participa en el remodelado de proteínas del cloroplasto, mediante la degradación tanto del complejo b<sub>6f</sub> del tilacoide como de la enzima Rubisco

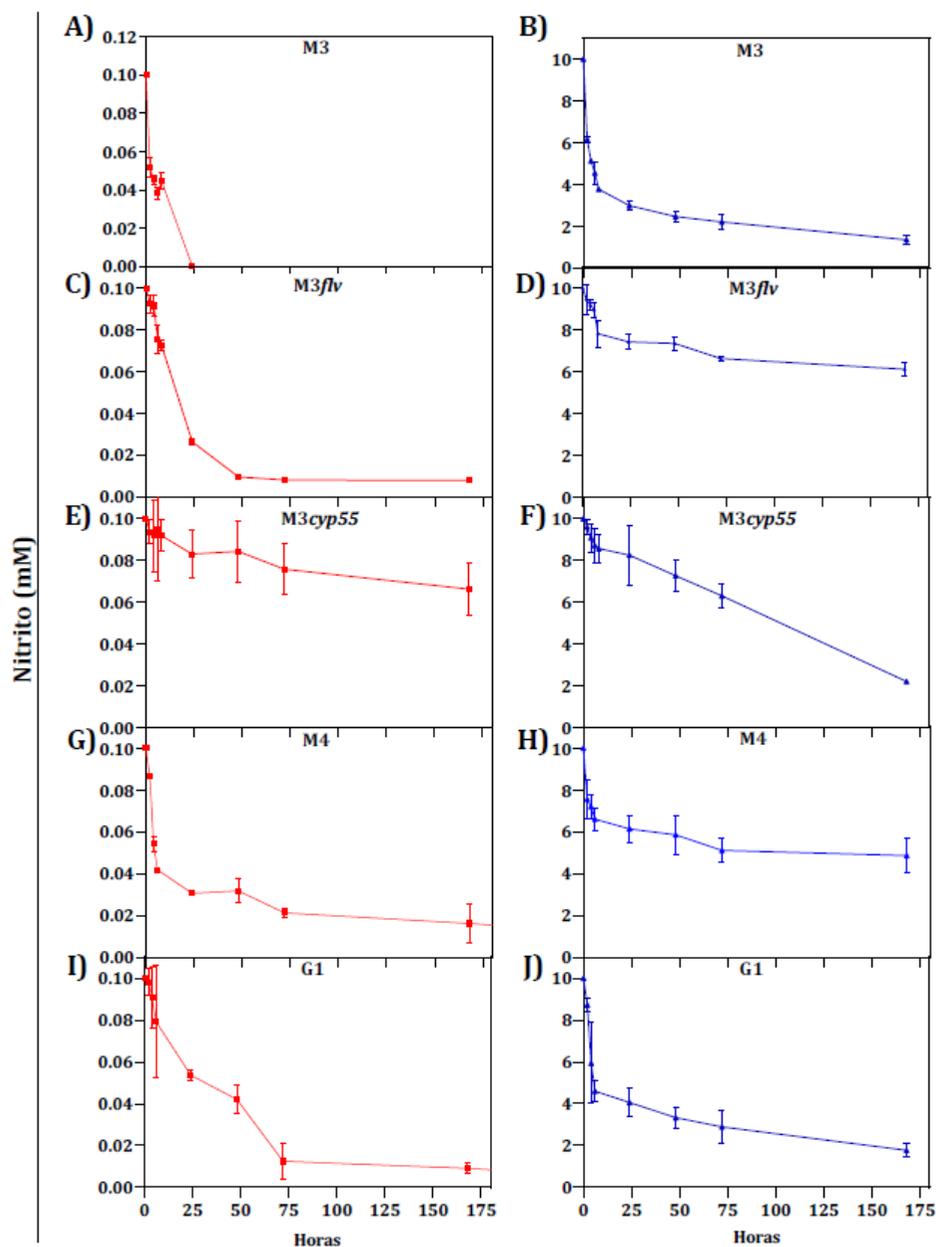
presente en el estroma. En esta degradación están involucradas las proteasas cloroplásticas FtsH y Clp (Wei et al., 2014). También se han estudiado los mecanismos moleculares que subyacen a la aclimatación de *Chlamydomonas* en respuesta a la exposición a NO (Kuo and Lee, 2021). En este apartado quisimos estudiar el comportamiento fenotípico de los mutantes de NiR en presencia de  $\text{NO}_2^-$ , una situación en la que se estarían generando altas concentraciones de NO en los cultivos herméticamente cerrados.

Los mutantes de NiR se crecieron en  $\text{NH}_4^+$  y a continuación se transfirieron a botellas herméticamente cerradas que contenían diferentes concentraciones de  $\text{NO}_2^-$ . A lo largo de 7 días se monitorizó en los cultivos el contenido de clorofila (Figura 1.16),  $\text{NO}_2^-$  (Figura 1.17), y  $\text{O}_2$  en la fase gaseosa (Figura 1.18). En cuanto al contenido en clorofila, la situación de falta de N provocaba una degradación de este pigmento en todos los mutantes, alcanzándose una degradación de un 50% a los 3 días y un  $\approx 90\%$  a los 7 días. La presencia de  $\text{NO}_2^-$  10 mM siempre protegía de esta degradación de clorofila. Sin embargo, en la estirpe M3 esta protección era total mientras que en el resto de mutantes de NiR (M3flv, M3cyp55, M4 y G1) la protección variaba entre el 60-80%. En cuanto al consumo de  $\text{NO}_2^-$ , todos los mutantes de NiR consumían/metabolizaban el  $\text{NO}_2^-$ . Si bien, comparando las estirpes M3, M3flv, M3cyp55 se observa que la falta de FLV disminuye el consumo/metabolización de  $\text{NO}_2^-$  en el rango  $\mu\text{M}$  y mM, pero la falta de CYP55 afecta en el rango  $\mu\text{M}$  pero no en el mM (Figura 1.17). Los niveles de  $\text{O}_2$  en la fase gaseosa de los cultivos se mantuvieron constantes a lo largo de los 7 días (Figura 1.18).

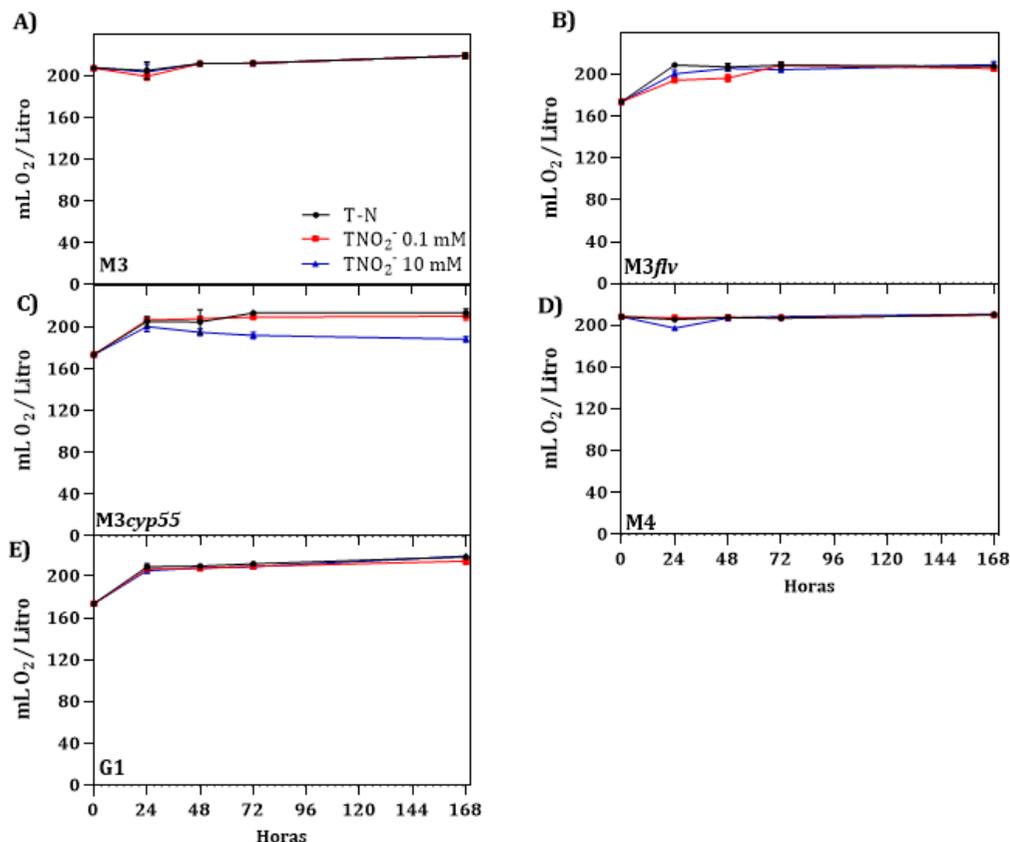
En resumen, los datos indican que el  $\text{NO}_2^-$ , que no se puede asimilar ni proporcionar una fuente de N para el crecimiento, está generando NO, el cual puede causar estrés oxidativo, pero a la vez está induciendo mecanismos de protección de la degradación de clorofila. Este NO generado podría estar oxigenándose hasta  $\text{NO}_3^-$  por la reacción de dioxigenación mediada por las THBs, de manera que el  $\text{NO}_3^-$  generado podría señalar y evitar la degradación de la clorofila (este efecto se estudia en más detalle en el Capítulo 2).



**Figura 1.16. Efecto protector del NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en la degradación de clorofila en los mutantes de NiR.** Precultivos de todas las estirpes en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se transfirieron a medios sin N o medios que contenían NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0,1 y 10 mM. La concentración inicial de clorofila de los cultivos era de 10 µg/mL. Durante 7 días, en presencia de luz y agitación. Se muestran los cultivos y la cuantificación de la clorofila para las estirpes M3 (A, B); M3flv (C, D), M3cyp55 (E, F); M4 (G, H); y G1 (I, J). Las barras de error representan ±SD, n ≥ 3.



**Figura 1.17. Consumo de  $\text{NO}_2^-$  por los mutantes de  $\text{NiR}$ .** Las condiciones experimentales son las de la Figura 1.16. En este caso se muestra las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  que quedan en los medios de cultivo a lo largo del tiempo. Las Figuras de la izquierda (en rojo) muestra el consumo desde 0,1 mM y las de la derecha (en azul) desde 10 mM. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .



**Figura 1.18. Determinación de los niveles de O<sub>2</sub>.** Las condiciones experimentales son las de la Figura 1.16. En este caso se muestra las concentraciones de O<sub>2</sub> en la fase gaseosa de cultivo a lo largo del tiempo en las estirpes indicadas. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

Para la integración/discusión de los resultados de las emisiones de N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> consideramos los siguientes aspectos:

**El NO como molécula señal** que regula multitud de procesos en *Chlamydomonas*, puede ser sintetizado mediante diferentes rutas (Astier et al., 2021; Wei et al., 2014) y a la vez existen mecanismos de eliminación del NO que permiten la adaptación a condiciones estresantes por altas concentraciones de NO (Kuo and Lee, 2021).

**Los mecanismos de protección a NO** que se activan cuando se administra NO (Kuo and Lee, 2021). Entre ellos se incluyen: 1) el aumento en la expresión de los genes *THB1*, *THB2*, *FLVb* y *CYP55B1*, 2) aumento en la concentración de glutatión oxidado (GSSG) y disminución del reducido (GSH), aunque los niveles

totales de glutatión no se ven afectados. Además, el estado redox del GSH se restaura 3 h después de que las células se hayan expuesto a NO (Kuo and Lee, 2021). Los mecanismos de respuesta y adaptación a NO pueden variar dependiendo del fondo genético de las estirpes de *Chlamydomonas*, así como de la condición que provoca la producción de NO. Por ejemplo, (Kuo and Lee, 2021) utilizan un mutante *nit1nit2* en respuesta a NO, pero esta respuesta puede aumentar en una estirpe NIT1NIT2 ya que los genes que codifican THB1, THB2 y CYP55 están positivamente regulados por  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 (Capítulo 3).

**El NO y  $\text{N}_2\text{O}$  serían bioproductos de la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ .** Dado que el  $\text{NO}_2^-$  es una fuente importante en la generación de NO y  $\text{N}_2\text{O}$  (Plouviez et al., 2017), sugerimos que la formación de estos bioproductos podría darse como consecuencia de una incompleta asimilación de  $\text{NO}_3^-$  en la que el  $\text{NO}_2^-$  se acumularía por una descompensación entre las actividades NR y NiR en una estirpe WT. Además, es interesante resaltar que las rutas de asimilación y desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  comparten enzimas comunes.

**La NR sería la principal enzima para la formación de NO, pero a la vez proporcionaría un mecanismo para su eliminación.** En nuestro modelo experimental, con mutantes de NiR, se demuestra que la NR y ARC son fundamentales para la producción de NO que posteriormente se eliminaría en forma de  $\text{N}_2\text{O}$ . Por otra parte, el NO puede convertirse en  $\text{NO}_3^-$  mediante NR/THB1 (**ciclo  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$** ) (Bellido-Pedraza et al., 2022) y posiblemente también por THB2 (Sanz-Luque et al., 2015b).

**CYP55 y FLV tienen un papel clave en la eliminación del NO a  $\text{N}_2\text{O}$**  tanto en luz como en oscuridad. En nuestro sistema, la ausencia de cualquiera de ellas, pero sobre todo la ausencia de CYP55 detiene el proceso tanto en luz como en oscuridad.

En estudios previos, se propone que CYP55, localizada en la mitocondria, mediaría la reducción de NO hasta  $\text{N}_2\text{O}$ , en oscuridad (Gérin et al., 2010; Plouviez et al., 2017). FLV, localizada en el cloroplasto, puede mediar tanto la reducción de  $\text{O}_2$  hasta  $\text{H}_2\text{O}$  como la reducción de NO para dar  $\text{N}_2\text{O}$ , presentando una mayor afinidad por el NO que por el  $\text{O}_2$  y se propone que es más activa en presencia de luz (Burlacot et al., 2020). La discrepancia con nuestros resultados se puede deber al fondo genético de las estirpes y la metodología utilizada. Por ejemplo, comparando nuestros resultados con los de (Plouviez et al., 2017) observamos diferencias en la estirpe WT y además, en el tratamiento de las células con cianuro. (Burlacot et al., 2020), llevan a cabo la reducción de NO a tiempos cortos. En nuestro trabajo usamos mutantes de NiR y una tecnología que permite monitorizar de modo continuo las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$ . Además, las

estirpes M3 y M4 están previamente confirmadas que producen mucho más  $N_2O$  en luz que en oscuridad y presencia de  $NO_2^-$  (Plouviez et al., 2017). Por tanto, proponemos que ambas FLV y CYP55 serían necesarias para mantener la integridad/funcionalidad de las mitocondrias y el cloroplasto frente a un posible daño causado por el NO. Profundizar en este mecanismo de regulación mitocondria-cloroplasto en el que FLV y CYP55 estarían involucrados requerirá estudios más detallados.

**Acoplamiento energético cloroplasto-mitocondria.** FLV es responsable del PCEF (*Pseudo Cyclic Electron Flow*) acoplado al PSI y que media la fotoreducción de  $O_2$  a  $H_2O$ . Recientemente se ha demostrado que el PCEF, dependiente de FLV, y el CEF (*Cyclic Electron Flow*), dependiente de PGRL1 (*Proton Gradient Regulation Like 1*), generan un gradiente de  $H^+$  (bajo pH luminal) que es esencial para el Mecanismo de Concentración de Carbono (CCM) (Burlacot et al., 2022). Se sugiere que este gradiente de  $H^+$  es usado por los transportadores de bicarbonato de la membrana del tilacoide (tipo bestrofina) convirtiéndolo en  $CO_2$  para su transporte al interior del tilacoide. La ausencia de ambas FLV y PGRL1 da lugar a una disminución significativa (7 veces) en la afinidad por el Ci (Carbono inorgánico) que afecta al crecimiento en bajo  $CO_2$ .

Otra ruta que involucra lanzaderas de energía entre el cloroplasto y la mitocondria es la denominada CMEF (*Chloroplast-to-Mitochondria Electron Flow*) que podría suplementar las necesidades de ATP para otros componentes del CCM como los transportadores de bicarbonato a nivel de membrana plasmática (HLA3) y del cloroplasto (LCIA/NAR1.2) (Bailleul et al., 2015; Dang et al., 2014). Burlacot y colaboradores sugieren que la acción combinada de CEF, PCEF y CMEF, dan lugar a un aumento en la relación ATP/NADPH que provee las necesidades energéticas para el CCM sin comprometer la fijación de  $CO_2$ . Por otra parte, se ha determinado la contribución de la mitocondria a la energización del CCM en estirpes WT, mediante el uso conjunto de dos inhibidores que bloquean la oxidasa alternativa mitocondrial (AOX) y el citocromo *bc1* (Burlacot et al., 2022). Los resultados indican que el bloqueo de la mitocondria afecta al CCM reduciendo la afinidad por Ci. La AOX1 es una oxidasa alternativa mitocondrial que está unida en la membrana a la ubiquinol oxidasa y cataliza la oxidación de ubiquinol y la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$ . En *Chlamydomonas*, AOX1 se regula positivamente por  $NO_3^-$  y NIT2 (Quesada et al., 2000) y también se induce en células tratadas con NO (Zalutskaya et al., 2017). Se propone que AOX1 puede funcionar en condiciones en las que la Citocromo c Oxidasa mitocondrial estaría inhibida por NO (Zalutskaya et al., 2017). Es decir, permitiría el funcionamiento parcial de la cadena respiratoria mitocondrial y la formación de ATP cuando la Citocromo c Oxidasa está bloqueada.

En el acoplamiento energético mitocondria-cloroplasto, FLV y CYP55, podrían ser fundamentales para la respuesta a NO y explicar los patrones de emisión de N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> por las estirpes usadas en este estudio. En condiciones mixotróficas cabrían los siguientes escenarios:

**Estirpe M3**, produce mucho NO, N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>. En este caso hay NR/ARC, FLV y CYP55. El balance energético ATP/NAD(P)H sería en principio adecuado (por la presencia de FLV y CYP55) para proveer de poder reductor al complejo NR/ARC y las NO reductasas, y ATP para el transporte de acetato, así como otros transportadores. El acetato alimentaría el TCA con la consiguiente producción de CO<sub>2</sub> y NADH que alimenta la cadena respiratoria y la producción de ATP. Sin embargo, la fijación del CO<sub>2</sub> producido estaría limitado (O<sub>2</sub> y NO serían dos sustratos que compiten por FLV). En otras palabras, el CCM que no estaría afectado en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Burlacot et al., 2022) sí podría estar afectado en nuestra condición de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO.

**Estirpe G1**, produce poco o nada NO, N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>. Esta estirpe carece de NR por lo que está limitada la producción de NO. El acoplamiento mitocondria-cloroplasto sería correcto, FLV y CYP55 son funcionales, el acetato alimentaría el TCA, pero el CO<sub>2</sub> generado se fijaría correctamente.

**Estirpe M3flv**, no produce NO ni N<sub>2</sub>O, pero emite CO<sub>2</sub>. En este caso parece que la NR estaría limitada para la producción de NO y esto estaría explicado por una baja actividad fotosintética y de generación de poder reductor para la actividad NR. El abastecimiento energético de la célula recaería en el acetato y TCA, pero insuficiente para la fijación de Ci.

**Estirpe M3cyp55**, produce NO y CO<sub>2</sub>, pero no N<sub>2</sub>O. De hecho, es la estirpe que está más afectada en la emisión de N<sub>2</sub>O. Este dato sugiere que CYP55 sería la NO reductasa más eficiente en *Chlamydomonas*. La falta de CYP55 también resultaría en un desacoplamiento mitocondria-cloroplasto y por tanto en la baja fijación de Ci.

**Degradación de clorofila.** Finalmente, los mutantes de NiR no crecen en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> aunque si lo metabolizan y producen NO. Paradójicamente, el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> protege de la degradación de la clorofila y crea una situación diferente a la situación de deficiencia de N. Este dato podría sugerir que otros mecanismos de eliminación de NO a través de GSH (GSH/GSNOR que generaría NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o THB2 (que generaría NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), o el propio NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (como análogo del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) podría mediar una repuesta positiva a través de NIT2 e independiente de su asimilación. Punto que se trata en los Capítulos 2 y 3.



## **CAPÍTULO 2. Regulación por $\text{NO}_3^-$ y $\text{NIT}_2$ sobre la asimilación del nitrógeno orgánico y otros procesos en *Chlamydomonas***

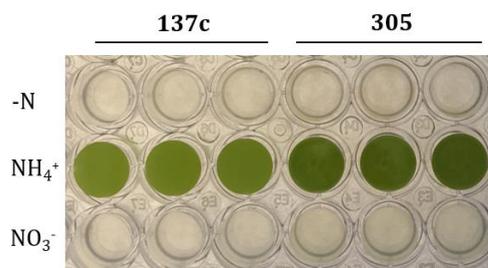
---



## CAPÍTULO 2. Regulación por $\text{NO}_3^-$ y NIT2 sobre la asimilación del nitrógeno orgánico y otros procesos en *Chlamydomonas*

El  $\text{NO}_3^-$ , además de un nutriente, es una molécula señal que regula su propia asimilación, así como otros procesos. En plantas, es bien conocido el papel del  $\text{NO}_3^-$  en el desarrollo de la raíz, germinación de semillas, cierre de estromas, tiempo de floración, ritmo circadiano, transporte de auxinas, etc. (Asim et al., 2020; Liu et al., 2020; Vidal et al., 2020). Este papel del  $\text{NO}_3^-$  como señal, que es independiente de su asimilación, es poco conocido en *Chlamydomonas* y en algas en general.

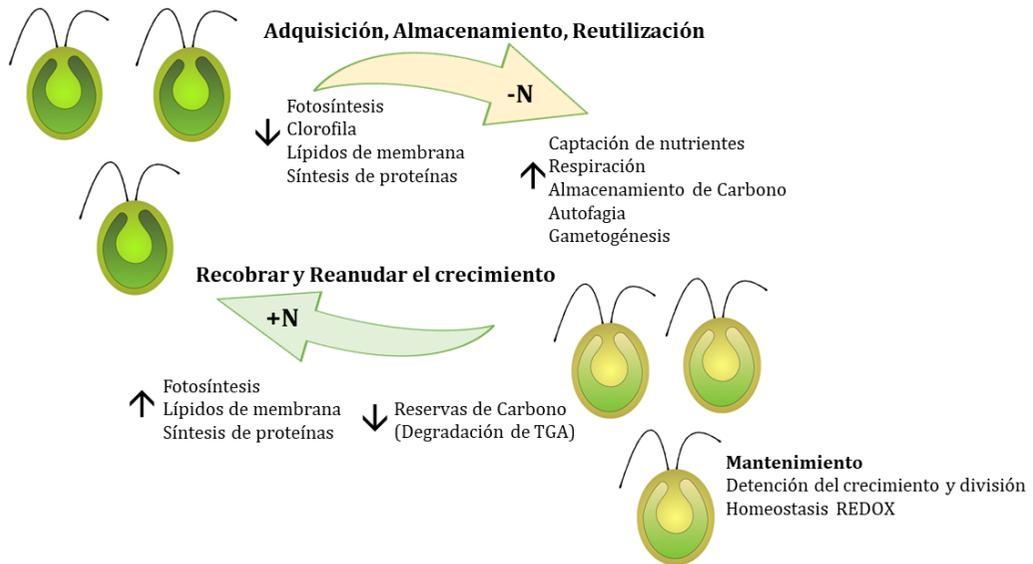
Con el objeto de profundizar sobre este aspecto en *Chlamydomonas*, hemos realizado un estudio comparativo de dos estirpes 305 y 137c. La estirpe 305 (*nit1NIT2*) es mutante de NR y por tanto no puede reducir ni asimilar  $\text{NO}_3^-$ , pero sería capaz de mediar las respuestas del  $\text{NO}_3^-$  a través de NIT2. La estirpe 137c (*nit1nit2*) no puede reducir  $\text{NO}_3^-$ , pero también estaría afectado en la señalización mediada por NIT2. Ninguna de estas estirpes puede crecer en  $\text{NO}_3^-$  como única fuente de N (Figura 2.1). Por tanto, en presencia de  $\text{NO}_3^-$  ambas estirpes estarían en una deficiencia de N como nutriente, pero una lo sentiría a través de NIT2 (305) y la otra no (137c).



**Figura 2.1. Fenotipo nit de las estirpes 305 y 137c de *Chlamydomonas*.** La foto muestra el crecimiento de ambas estirpes tras 3 días de cultivo en los medios indicados, T-N (sin nitrógeno),  $\text{TNH}_4^+$  (8 mM),  $\text{TNO}_3^-$  (2 mM).

Cuando *Chlamydomonas* está en deficiencia de N se producen una serie de cambios (Takeuchi and Benning, 2019) que se resumen en la Figura 2.2. En este Capítulo nos hemos centrado en estudiar el papel de la regulación por  $\text{NO}_3^-$

/NIT2 en los procesos de gametogénesis, degradación de clorofila, acumulación de pigmentos y reservas de C (almidón y lípidos).



**Figura 2.2. Cambios en *Chlamydomonas* tras la deficiencia de N y su posterior readministración.** Adaptado de (Takeuchi and Benning, 2019).

## 2.1. Estudios comparativos de las estirpes 305 (*nit1NIT2*) y 137c (*nit1nit2*)

### 2.1.1. $\text{NO}_3^-$ y NIT2 regulan negativamente la gametogénesis

Las células vegetativas (haploides) de *Chlamydomonas* se dividen asexualmente en condiciones ricas en nutrientes. Sin embargo, en ausencia de N y presencia de luz, *Chlamydomonas* se diferencia en gametos de diferente tipo ( $\text{mt}^+$  y  $\text{mt}^-$ ), los cuales están determinados genéticamente. Cuando dos gametos de distinto tipo se encuentran estos se fusionan dando lugar a células diploides funcionales que finalmente pierden los flagelos y forman un cigoto o cigospora. Estas cigosporas son estructuras altamente resistentes que permiten la supervivencia en condiciones ambientales adversas. Cuando se restablecen las condiciones favorables (presencia de nutrientes; principalmente N y luz), ocurre el proceso de germinación y cada cigospora daría lugar a 4 células vegetativas (ciclo sexual) (Goodenough et al., 2007; Sasso et al., 2018; Zou et al., 2017).

El efecto del  $\text{NO}_3^-$  como señal negativa *per se* sobre la gametogénesis ya se había propuesto hace más de 20 años (Pozuelo et al., 2000). En consecuencia, esto ocurre en los mutantes de NR 305 y D2 (ambos *nit1NIT2*). Además, la presencia de sistemas de alta afinidad de  $\text{NO}_3^-$ , presentes en 305 pero ausentes en D2, determinaba una inhibición total por  $\text{NO}_3^-$  de la gametogénesis.

Nuestros datos sugieren que esta inhibición mediada por  $\text{NO}_3^-$  sería dependiente de NIT2, ya que la estirpe *nit1nit2* (137c) queda liberada, al menos, parcialmente, de dicha inhibición,  $\approx 58\%$  de inhibición por  $\text{NO}_3^-$ , mientras que en las estirpes WT y 305 la inhibición es de  $\approx 99\%$  (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 en la gametogénesis.** Conteo de cigotos tras realizar los cruces indicados en las condiciones indicadas. M-N (Medio Mínimo deficiente en N). T-N (Medio TAP deficiente en N).

Número de cigotos		
Cruce	M-N	$\text{MNO}_3^-$ 4 mM
21gr (+) x 6145c (-)	415 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2
137c (+) x 137c (-)	1999 $\pm$ 1	750 $\pm$ 1
305 (-) x CW305 (+)	142 $\pm$ 68	1 $\pm$ 1
Cruce	T-N	$\text{TNO}_3^-$ 4 mM
21gr (+) x 6145c (-)	1225 $\pm$ 1	11 $\pm$ 5
137c (+) x 137c (-)	1797 $\pm$ 2	897 $\pm$ 2
305 (-) x CW305 (+)	360 $\pm$ 122	2 $\pm$ 0,6

6145c y 21gr son WT (*NIT1NIT2*), 137c (*nit1nit2*), 305 (*nit1NIT2*), cw305 (*nit1NIT2 cw*). + /-, sexo. CW (*Cell Wall* o pared celular). Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

### 2.1.2. Efecto del $\text{NO}_3^-$ y NIT2 sobre la clorofila, actividad fotosintética, acumulación de pigmentos, almidón y lípidos

Cuando los cultivos de *Chlamydomonas* son transferidos a medios sin N, las células aún son capaces de dividirse una vez durante las primeras 24 h (Spudich and Sager, 1980). Se sugiere que esto lo hacen usando el N almacenado en macromoléculas. Prácticamente no hay aumento neto de clorofila y la cantidad de proteína total en los cultivos aumenta levemente. Esto se traduce en que el contenido de clorofila y proteína por célula disminuya un 65% y 50%, respectivamente. Al mismo tiempo, se produce un aumento en la relación C/N

que es atribuible a una menor disponibilidad de N y a un aumento en la acumulación de C en forma de almidón y lípidos neutros (Msanne et al., 2012; Schmollinger et al., 2014; Siaux et al., 2011; Wang et al., 2009).

La disminución de la actividad fotosintética, en estas condiciones, es consecuencia de una regulación a nivel transcripcional y postranscripcional. Se ha descrito que en deficiencia de N hay una disminución rápida en la acumulación de los transcritos que codifican los complejos del aparato fotosintético, incluyendo genes implicados en la síntesis de pigmentos, y el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Blaby et al., 2013; Juergens et al., 2015; Miller et al., 2010; Schmollinger et al., 2014). Esta reducción en los niveles de ARNm también se observa a nivel de proteína, aunque en menor proporción, por lo que se propone que una regulación a nivel postraducciona podría ser tan importante como los cambios de expresión a tiempo corto tras la deficiencia de nutrientes (de Vitry et al., 1989; Pfalz et al., 2012; Turkina et al., 2006). Se ha propuesto que, tras la exposición a la falta de N, la regulación del PSI y PSII es diferente. Las proteínas y la actividad del PSII disminuyen más rápidamente que las del PSI (Plumley and Schmidt, 1989) y por tanto las células mantienen una alta capacidad de CEF. Sin embargo, Juergens y colaboradores (Juergens et al., 2015) han mostrado que, en el primer día de deficiencia de N, el flujo de electrones a través de los dos fotosistemas disminuye, pero las diferencias no son tan drásticas como las previamente señaladas.

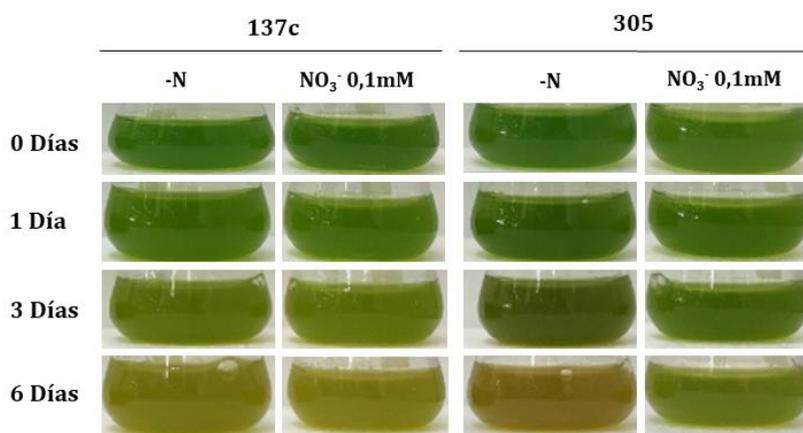
En este apartado, estudiamos las respuestas fisiológicas de las estirpes 305 y 137c cuando son incubadas en presencia de  $\text{NO}_3^-$ .

### **2.1.3. Efecto del $\text{NO}_3^-$ y NIT2 sobre la clorofila, actividad fotosintética, y pigmentos**

En la Figura 2.3 se muestra la evolución de los cultivos de las estirpes 305 y 137c en deficiencia de N y en  $\text{NO}_3^-$  0,1 mM, así como la cuantificación de los niveles de clorofila (Figura 2.4). Como era esperable, se observó una degradación de la clorofila durante los primeros 6 días cuando ambas estirpes fueron incubadas en deficiencia de N. En la estirpe 137c una degradación idéntica se observó también en presencia de  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, la presencia de  $\text{NO}_3^-$  tuvo un claro efecto protector en la estirpe 305 que retrasó la degradación de la clorofila.

En la estirpe 305 y en presencia de  $\text{NO}_3^-$ , se observó que los niveles de clorofila total aumentaron ligeramente durante el primer día y que se mantuvieron con una degradación mínima tras los 6 días del experimento;

mientras que en deficiencia de N los niveles disminuyeron un 80%. En cuanto la densidad celular de los cultivos (Figura 2.4B), se observa un aumento de células hasta los 3 días, para luego mantenerse, siendo este aumento 1,5 veces superior en  $\text{NO}_3^-$  que en deficiencia de N. Cuando se calcula la concentración de clorofila por célula (Figura 2.4C), se observa que ésta disminuye progresivamente con el tiempo en deficiencia de N (un 85% a los 6 días). Sin embargo, la reducción se entelentece en  $\text{NO}_3^-$  0,1 mM (un 42% a los 6 días). Como se muestra en las Figuras 2.4D-F, estos efectos del  $\text{NO}_3^-$  no se observan en la estirpe 137c. Estos datos sugieren que el  $\text{NO}_3^-$ , a través de NIT2, está actuando como señal y como consecuencia, está regulando la división celular y la concentración de clorofila.

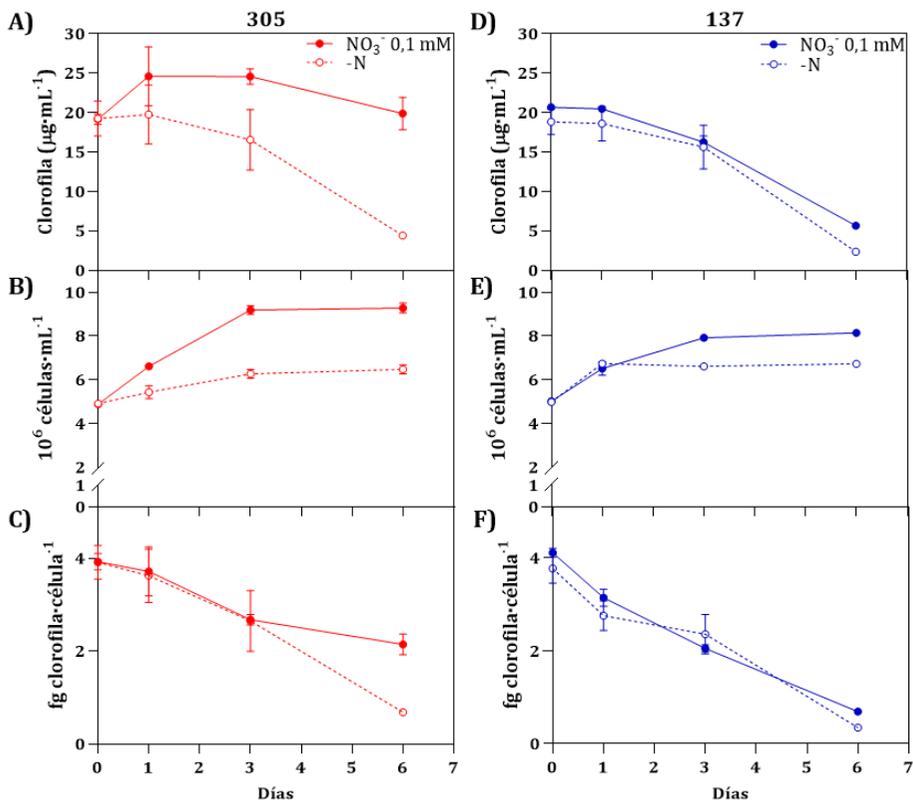


**Figura 2.3. Aspecto de los cultivos de las estirpes 305 y 137c tras la deficiencia de N y efecto del  $\text{NO}_3^-$ .** Los cultivos se mantuvieron durante 6 días en presencia de agitación y luz continua.

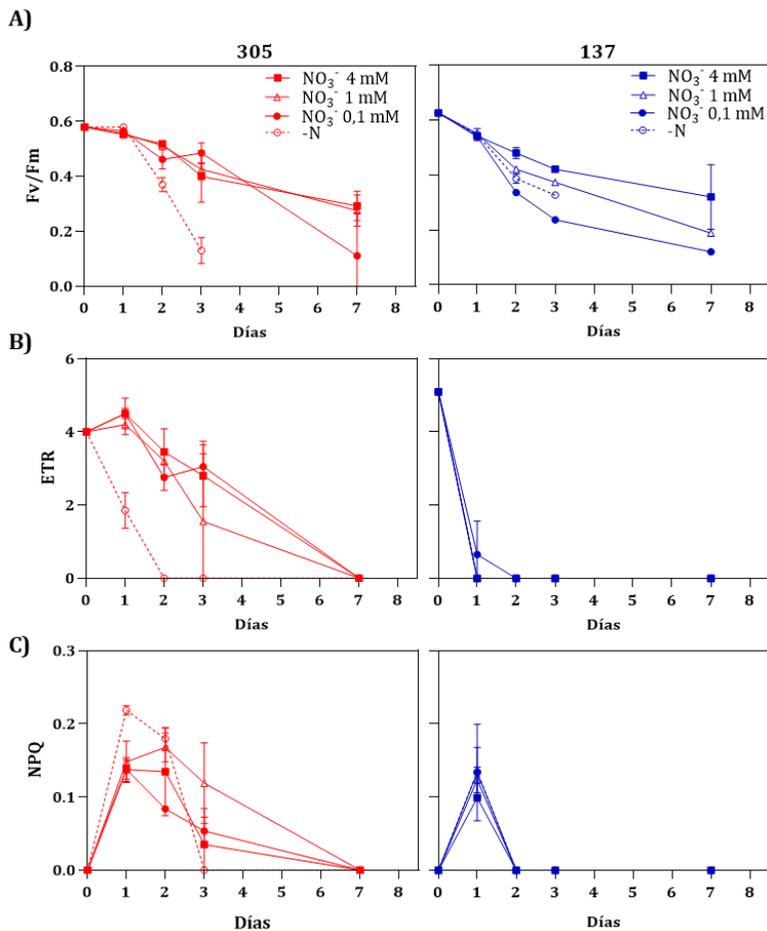
En las mismas condiciones de cultivo e iluminación, se determinaron el rendimiento fotoquímico máximo ( $F_v/F_m$ ) y la tasa de transporte de electrones en el fotosistema II (ETR) (Figura 2.5). El comportamiento de estos parámetros en la estirpe 137c fue similar en deficiencia de N y en presencia de  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, en la estirpe 305, diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  retrasaron la caída en la eficiencia fotosintética ( $F_v/F_m$  y ETR), indicando que la presencia de  $\text{NO}_3^-$  protege el aparato fotosintético y permite que este siga funcionando durante más tiempo que en condiciones de deficiencia de N. En condiciones de deficiencia de N, el flujo fotosintético era nulo a los 3 días, mientras que en presencia de  $\text{NO}_3^-$  solo se había reducido un  $\approx 50\%$ .

El cuanto al valor de NPQ (*quenching* no fotoquímico), se observa un pico a las 24 h para luego disminuir a los valores basales a los 3 días. En presencia de  $\text{NO}_3^-$

este aumento no es tan pronunciado y también disminuye a los 3 días (Figura 2.5C). En el caso de la estirpe 137c, el valor de NPQ también aumenta con un pico a las 24 h, pero no hay efecto del  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2.5C). Dado que NPQ hace referencia a la capacidad de disipar el exceso de energía en los complejos antenas en forma de calor y así ajustar el flujo de electrones ( $e^-$ ), nuestros datos parecen indicar que el  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 estarían mejorando la actividad fotosintética, disminuyendo la disipación de energía (NPQ) durante los primeros días y mejorando el flujo de electrones.



**Figura 2.4. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en el contenido de clorofila y densidad celular en las estirpes 305 y 137c.** Las estirpes se indujeron en los medios correspondientes. Se mantuvieron durante 6 días con luz y agitación constante. En rojo, la estirpe 305 y en azul la estirpe 137c. **A)** y **D)** clorofila ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); **B)** y **E)** millones de células· $\text{mL}^{-1}$ ; **C)** y **D)** fg clorofila·célula $^{-1}$ . Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

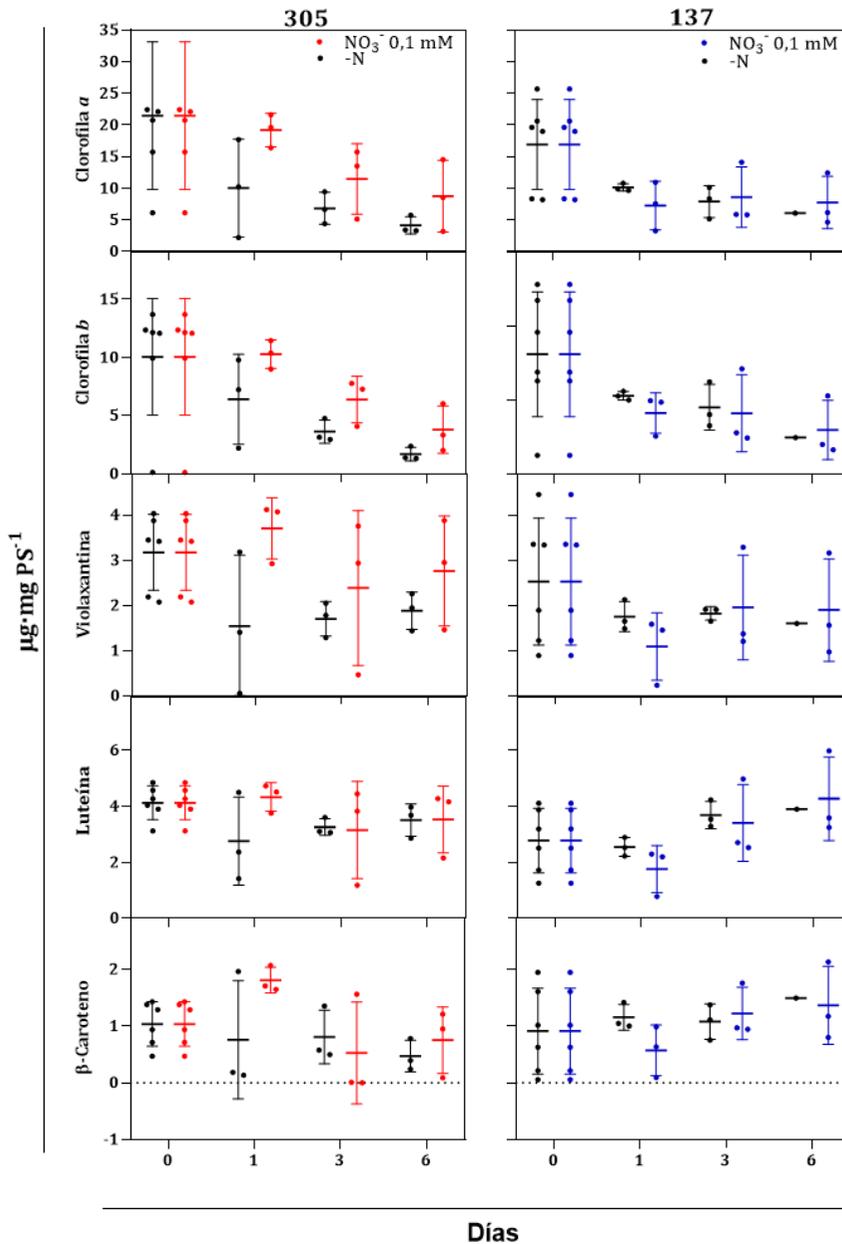


**Figura 2.5. Efecto de diferentes concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en parámetros fotosintéticos en las estirpes 305 y 137c. A) Fv/Fm, B) ETR, C) NPQ en la estirpe 305 (rojo) y 137c (azul). Las células se mantuvieron en luz y agitación continua durante 7 días. Las barras de error representan ±SD, n ≥ 3.**

A continuación, se estudió la acumulación de pigmentos y lípidos del tilacoide que actuarían como protectores/reguladores de la actividad del cloroplasto, así como la acumulación de compuestos de carbono como almidón y TAG, cuya síntesis constituiría un sumidero del exceso de energía en condiciones en las que el crecimiento está detenido.

La cuantificación de clorofila a y b, mediante HPLC, así como de otros pigmentos fotosintéticos se muestra en la Figura 2.6. En este caso, y referido en relación con peso seco (PS), también se observa el efecto positivo del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre los niveles de clorofila a y b en la estirpe 305. En cuanto a los otros pigmentos

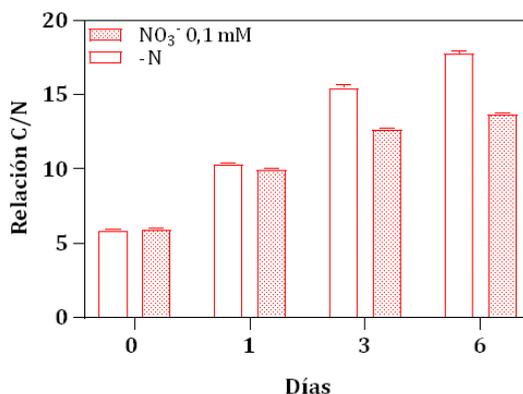
analizados, es difícil llegar a una conclusión clara, dado las desviaciones de los resultados. No obstante, parece que los niveles de violaxantina se mantienen más altos en presencia de  $\text{NO}_3^-$  en la estirpe 305.



**Figura 2.6. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la concentración de clorofila y compuestos carotenoides en las estirpes 305 y 137c.** Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para la Figura 2.4. Ausencia de N (negro para ambas estirpes). PS (Peso Seco). Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

### 2.1.4. Efecto del $\text{NO}_3^-$ sobre la relación C/N en la estirpe 305

Se determinó la relación C/N en la estirpe 305 en deficiencia de N y  $\text{NO}_3^-$  0,1 mM. La relación C/N inicial era de  $\approx 5\%$ , y aumentó progresivamente con el tiempo. Sin embargo, este aumento en  $\text{NO}_3^-$  fue un 25% inferior al observado en deficiencia de N (3 y 6 días). Este dato sugiere que la estirpe 305 acumula de forma diferente los compuestos de carbono en ausencia de N y  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2.7).



**Figura 2.7. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la relación C/N en la estirpe 305.** Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 2.4. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

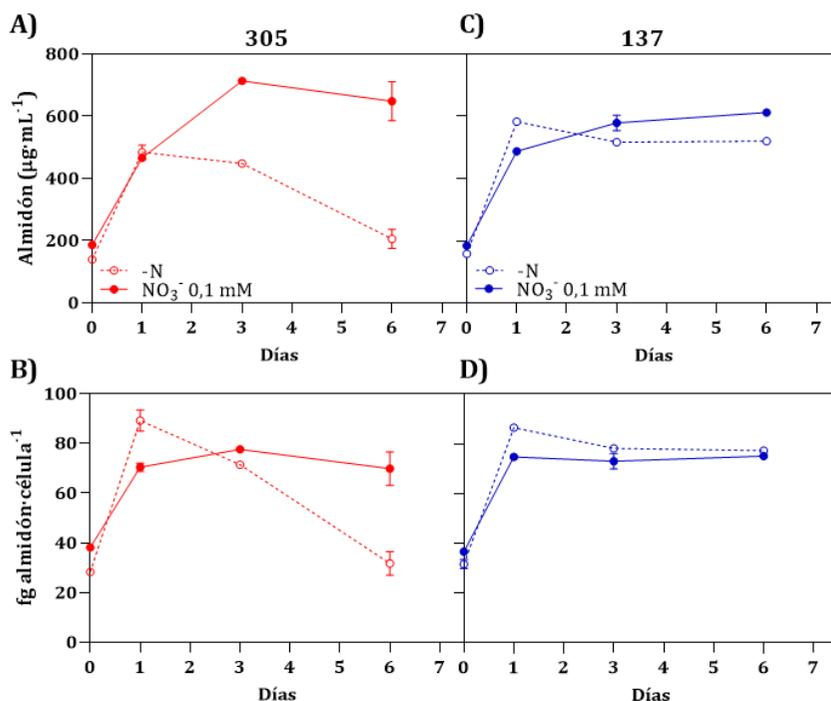
Remacle y colaboradores (Remacle et al., 2014) han mostrado que el  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 regulan la partición de carbono en condiciones mixotróficas. Estos autores comparan diferentes estirpes de *Chlamydomonas* entre las que se incluyen las estirpes 305 y 137c, en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$ . Sus datos muestran que la estirpe 305 acumula más malato, fumarato, almidón y ácidos grasos que la estirpe 137c en  $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$  (Remacle et al., 2014). Nosotros analizamos aquí la acumulación de almidón, TAG, y lípidos de membrana del tilacoide, comparando una situación de deficiencia de N frente a  $\text{NO}_3^-$  0,1 mM para entender el papel del  $\text{NO}_3^-$  como señal.

### 2.1.5. Efecto del $\text{NO}_3^-$ sobre la acumulación de almidón en las estirpes 305 y 137c

Se determinó el perfil de acumulación de almidón en las estirpes 305 y 137c a los tiempos 0, y después de 1, 3, y 6 días de incubación en los medios indicados (Figura 2.8). En todos los casos se observó un incremento significativo en la cantidad de almidón a las 24 h. Tras este incremento, la evolución de los niveles de almidón fue diferente en ausencia de N y en  $\text{NO}_3^-$  para la estirpe 305. En medio

ausente en N se observó una disminución en la acumulación, mientras que en presencia de  $\text{NO}_3^-$  los niveles se mantuvieron durante los 6 días que duró el experimento. En la estirpe 137c, los niveles de almidón se mantuvieron en ambas condiciones.

Estos datos sugieren que el  $\text{NO}_3^-$  estaría regulando el metabolismo del almidón en la estirpe 305, bien favoreciendo su síntesis o evitando su degradación.



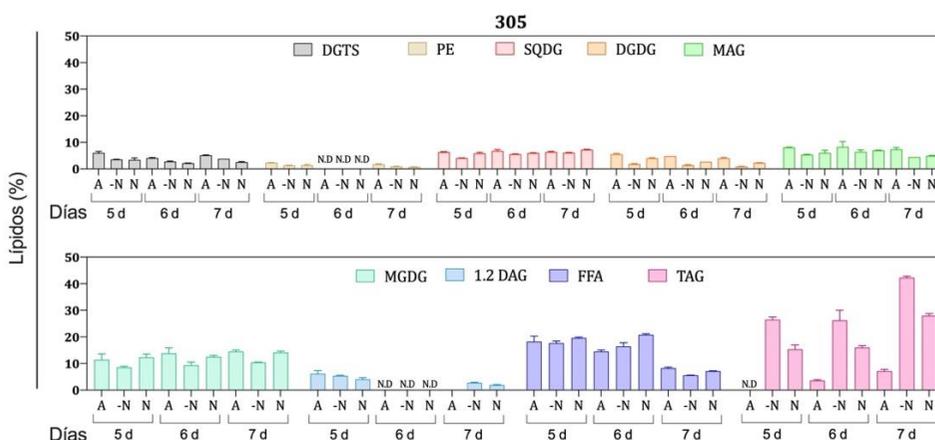
**Figura 2.8. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la acumulación de almidón en las estirpes 305 y 137c.** En rojo se indica la estirpe 305 y en azul la estirpe 137c. **A)** y **C)** almidón total ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); **B)** y **D)** almidón por célula ( $\text{fg almidón}\cdot\text{célula}^{-1}$ ). Las células se mantuvieron durante 6 días, con luz y agitación continua. Condiciones experimentales iguales que para la Figura 2.4. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

### 2.1.6. Efecto del $\text{NO}_3^-$ sobre la acumulación de lípidos en las estirpes 305 y 137c

*Chlamydomonas* acumula TAG cuando las células entran en fase estacionaria y en déficit de determinados nutrientes (Siaut et al., 2011; Urzica et al., 2013). También los acumula en respuesta a otras condiciones de estrés como alta luz, alta salinidad y altas temperaturas (Goold et al., 2016; Hemme et al., 2014;

Légeret et al., 2016; Siaut et al., 2011). La formación de TAG ocurre a partir de la acilación de DAG (*Diacylglycerides*) donde los ácidos grasos provienen o bien, de la síntesis *de novo*, o de ácidos grasos procedentes del recambio de lípidos de la membrana del tilacoide. En este sentido, se ha demostrado que la enzima plástica PGD1 (*Plastid Galactoglycerolipid Degradation 1*) estaría involucrada en la hidrólisis de lípidos de la membrana del tilacoide, liberando ácidos grasos que promoverían la síntesis de TAG. La ausencia de PDG1 causa una reducción del 50% en los niveles de TAG tras la deficiencia de N (Li et al., 2012). Además, la síntesis de TAG también podría ocurrir a partir de DAG generado desde MGDG (*MonoGalactosylDiacylglycerol*), aunque la enzima involucrada en esta ruta no se ha identificado (Légeret et al., 2016). Por tanto, en respuesta a diferentes tipos de estrés, no sólo se regularía la acumulación de TAG, sino que también habría un recambio/reorganización en lípidos de la membrana del tilacoide, lo que repercute en cambios estructurales del cloroplasto, pero también en la regulación de su función.

Para entender si el  $\text{NO}_3^-$  y/o NIT2 tenían alguna función reguladora en la síntesis/acumulación de lípidos, se determinó el perfil de estos en la estirpe 305 en respuesta a  $\text{NH}_4^+$ , deficiencia de N (-N) y  $\text{NO}_3^-$  después de 5, 6, y 7 días (Figura 2.9).

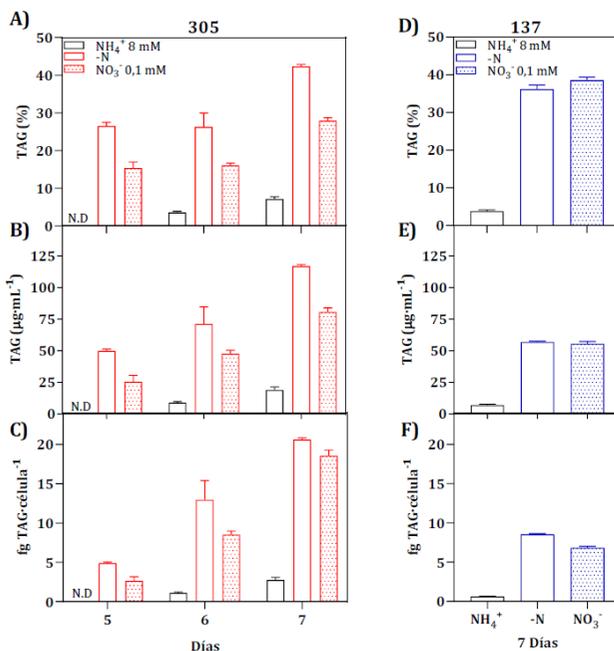


**Figura 2.9. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la acumulación de lípidos en la estirpe 305.** DGTS (*Diacylglycerol-N,N,N,N-TrimethylhomoSerine*), PE (*PhosphatidylEthanolamine*) SQDG (*SulfoQuinovosilDiacylglycerol*), DGDG (*DiGalactosylDiacylglycerol*), MGDG (*MonoGalactosylDiacylglycerol*), MAG (*MonoAcylGlycerol*), 1,2DAG (*1,2 Diacylglycerol*), FFA (*Free Fatty Acids*), TAG (*TriAcylGlycerol*). Datos representados como % de la suma de lípidos totales. N.D (No Detectable). Las células se mantuvieron durante 7 días, con luz y agitación continua. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

En estos datos hemos buscado por perfiles de regulación por  $\text{NO}_3^-$  y mantenidos en el tiempo de ensayo. Según se observa en la Figura 2.9, DGTG, PE, MAG, DAG y FFA no encajarían en este patrón de regulación. En cambio, TAG y los lípidos de membrana del tilacoide (MGDG, SQDG, DGDG) si parecen mostrar patrones de regulación por  $\text{NO}_3^-$  los cuales se detallan a continuación.

Para determinar si esta regulación esta mediada por NIT2, se compararon con los perfiles lipídicos en la estirpe 137c en las mismas condiciones, pero en este caso a los 7 días.

En cuanto a la acumulación de TAG, en la estirpe 305, se observa un aumento progresivo de la acumulación de TAG en medio sin N a los 5, 6 y 7 días. Un patrón que se conserva tras un análisis del porcentaje de los lípidos totales (Figura 2.10A), como  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 2.10B) y como  $\text{fg}/\text{célula}$  (Figura 2.10C). Sin embargo, en medio con  $\text{NO}_3^-$  0,1 mM, la acumulación de TAG era siempre menor a la obtenida en medio sin N. Dicho efecto del  $\text{NO}_3^-$  no se observa en la estirpe 137c (Figuras 2.10D-F). Además, la concentración de TAG acumulado por célula es inferior en la estirpe 137c que en la estirpe 305 (Figura 2.10F). Este patrón de acumulación de TAG sugiere que  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  serían responsables de la regulación negativa sobre la acumulación de TAG, en la estirpe 305.



**Figura 2.10. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la acumulación de TAG en las estirpes 305 y 137c.** En rojo se muestra la estirpe 305 (A-C) y en azul la estirpe 137c (D-F). Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 2.9. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

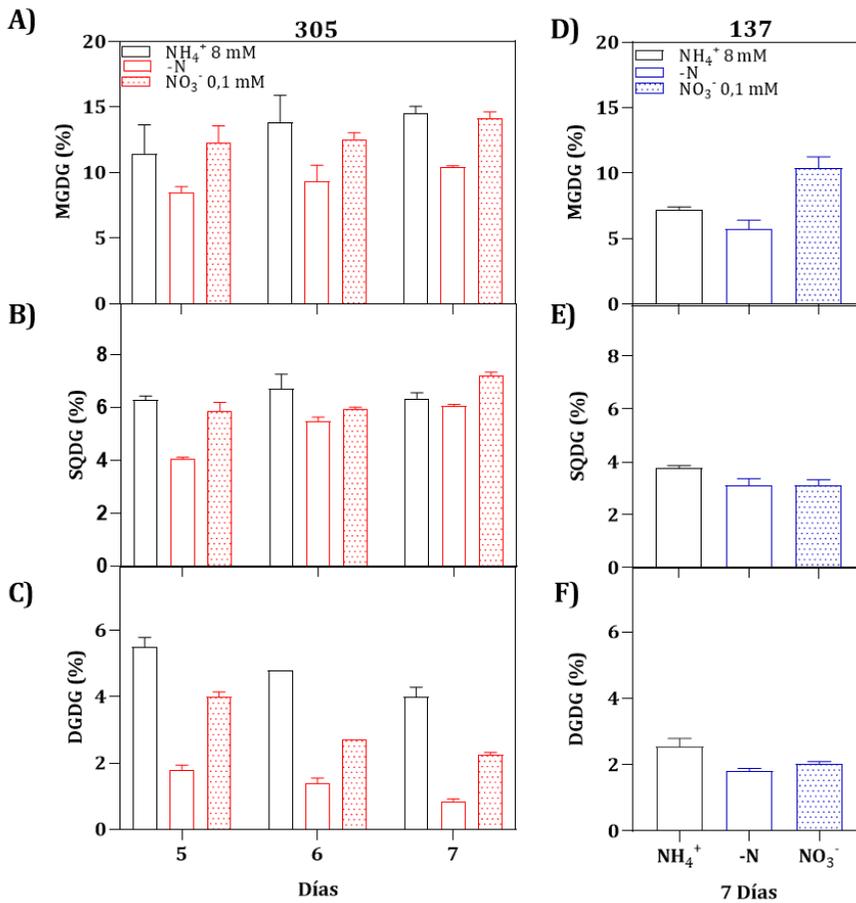
La síntesis de TAG puede ocurrir tanto desde ácidos grasos sintetizados *de novo* como desde ácidos grasos que provienen de la metabolización de lípidos de la membrana del tilacoide. Por lo tanto, quisimos estudiar el patrón de acumulación de los principales lípidos de membrana del tilacoide (MGDG, SQDG y DGDG) para ver si había una correlación con el patrón de acumulación observado para los TAG.

En la estirpe 305, los niveles de MGDG, galactolípido más abundante de la membrana del tilacoide, disminuyeron en deficiencia de N, pero se mantuvieron en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2.11A). Es decir, observamos un patrón que sería contrario al de acumulación de TAG, en el sentido de que la señal de  $\text{NO}_3^-$  permite mantener los niveles de MGDG. Este patrón se mantiene a lo largo del tiempo en la estirpe 305. Sin embargo, en la estirpe 137c, a los 7 días, no se observa un patrón de regulación que permita asegurar que el efecto del  $\text{NO}_3^-$  estaría mediado por NIT2 (Figura 2.11D).

La acumulación de SQDG no mostró un patrón de regulación claro en ninguna de las dos estirpes (Figura 2.11B y 2.11E).

Finalmente, la acumulación de DGDG, sí que mostró un patrón de regulación claro por  $\text{NO}_3^-$  y NIT2, acumulándose menos en ausencia de N y más en  $\text{NO}_3^-$  en la estirpe 305 (NIT2) pero no en la estirpe 137c (*nit2*), en las que el DGDG se acumuló igual en ambas condiciones. Los niveles de DGDG en la estirpe 305 se correlacionan de forma inversa con los niveles de TAG; a mayor acumulación de TAG menor acumulación de DGDG y viceversa (Figura 1.11C y F).

DGDG y MGDG son los lípidos predominantes que forman parte de la bicapa y no bicapa en las membranas fotosintéticas, respectivamente. Se propone que estos dos galactolípidos tienen un papel multifactorial en el desarrollo, de la planta. Participan en diferentes procesos como son la fotosíntesis, la adaptación a estrés, actúan como sustrato, inducen la síntesis de fitohormonas y mantienen la forma del cloroplasto. En *Arabidopsis*, el mutante *DGD1* que está afectado en la síntesis de DGDG. Un retraso en el crecimiento, una sobreproducción de ácido jasmónico, un cambio en la forma del cloroplasto; procesos que estarían ligados al aumento en la relación DGDG/MGDG. También tiene lugar una disminución en la clorofila (clorosis) y en la actividad fotosintética que parece ser una consecuencia de la disminución en DGDG (Yu et al., 2020).

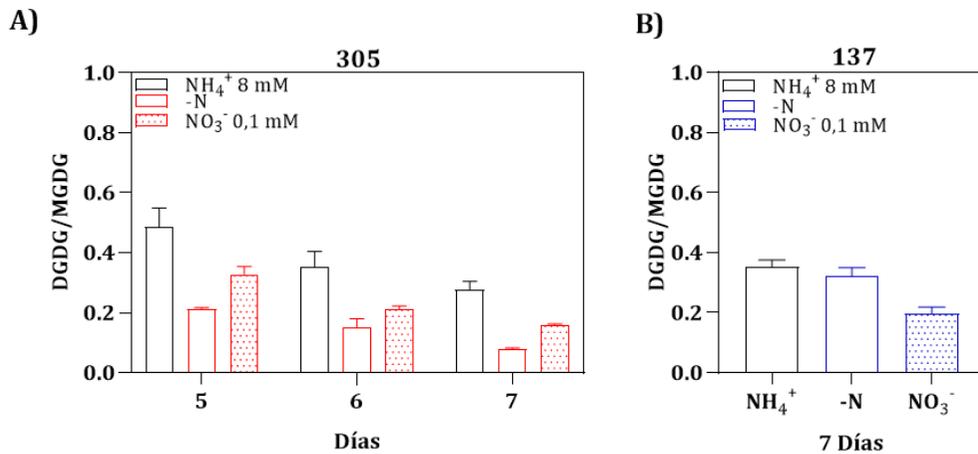


**Figura 2.11. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la acumulación de MGDG, SQDG y DGDG en las estirpes de 305 y 137c.** Estirpe 305 indicada en rojo (A-C), estirpe 137c en azul (D-F). Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 2.9. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

En *Chlamydomonas*, se ha demostrado que el silenciamiento de *MGD1*, realizado en una estirpe CC-124 (137c) y que como consecuencia estaría afectada en la síntesis de MGDG, aumenta la relación DGDG/MGDG un 14%. Se ha propuesto que este desbalance conlleva a un aumento de 5,4 veces en los niveles de TAG en respuesta a ausencia de N y a una disminución de la actividad fotosintética (Lee et al., 2022).

Según nuestros datos, la relación DGDG/MGDG (Figura 2.12) no parece relacionarse con una mayor acumulación de TAG. Así, en la estirpe 305 en  $\text{NH}_4^+$ , la acumulación de TAG es muy baja pero la relación DGDG/MGDG es alta. En deficiencia de N, DGDG/MGDG disminuye con el tiempo, pero los TAG aumentan.

En cambio, sí encajarían con los datos de *Arabidopsis*, en el sentido de que la disminución de DGDG en ausencia de N (y por tanto la disminución de la relación DGDG/MGDG) se relacionaría con la degradación de clorofila y una disminución de la actividad fotosintética. En cambio, altos niveles de DGDG en  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$  (relación DGDG/MGDG alta) se relacionaría con alta actividad fotosintética.



**Figura 2.12. Cociente DGDG/MGDG en las estirpes 305 y 137c en respuesta a  $\text{NH}_4^+$ , deficiencia de N (-N) y  $\text{NO}_3^-$ .** Estirpe 305 indicada en rojo (A), estirpe 137c en azul (B). Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 2.9. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

En resumen, nuestros datos sugieren que el  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 están protegiendo la actividad fotosintética en la estirpe 305, manteniendo no solo los niveles de clorofila y de carotenoides sino también los niveles de DGDG. Una mayor actividad fotosintética favorecería la fijación de  $\text{CO}_2$  y la síntesis de almidón en vez de TAG, tal y como se observa para la estirpe 305 en  $\text{NO}_3^-$ .

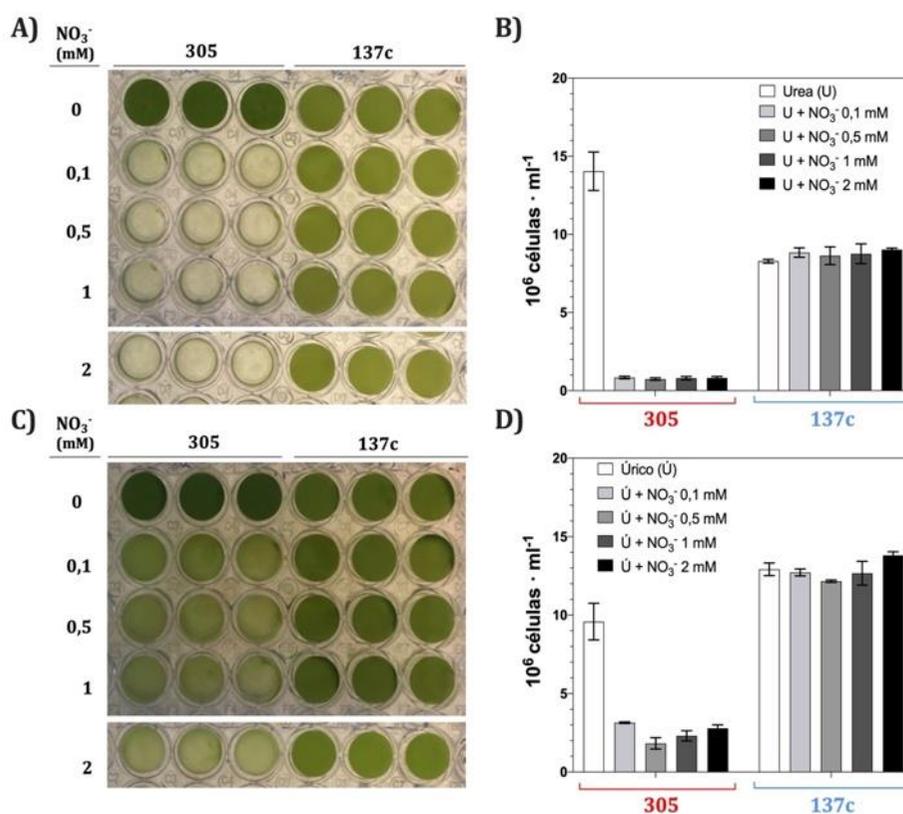
## 2.2. Efecto del $\text{NO}_3^-$ y NIT2 sobre el crecimiento de fuentes orgánicas de nitrógeno

La estirpe 305 puede crecer en aminoácidos, sin embargo, la presencia de  $\text{NO}_3^-$  inhibe su crecimiento en esta fuente de N. Este efecto negativo estaría mediado por NIT2. En efecto,  $\text{NO}_3^-$ /NIT2 regulan negativamente la expresión de *LAO1*, que codifica la enzima necesaria para la desaminación oxidativa de la mayoría de los aminoácidos produciendo  $\text{NH}_4^+$  y el correspondiente cetoácido

(Calatrava et al., 2019, 2018). En este trabajo hemos estudiado la regulación por  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NIT}_2^-$  de la asimilación de otras fuentes orgánicas de N como urea y úrico.

### 2.2.1. Inhibición por $\text{NO}_3^-$ en la asimilación de urea y úrico

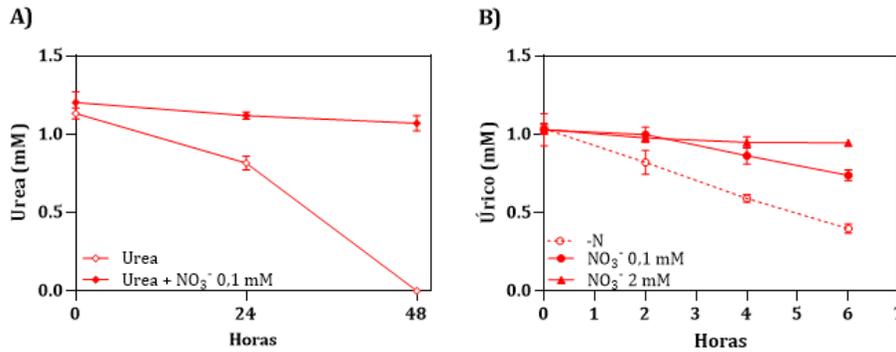
Como se puede observar en la Figura 2.13, la presencia de  $\text{NO}_3^-$  (incluso a concentraciones tan bajas como 0,1 mM) inhibe el crecimiento en urea y úrico en la estirpe 305, pero no afecta en la estirpe 137c.



**Figura 2.13. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en el crecimiento en urea y úrico en las estirpes 305 y 137c.** Cultivos tras 3 días de crecimiento en urea 2 mM (A) y úrico 2 mM (C) en ausencia y presencia de las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  indicadas. En B) y D) se muestra la densidad celular de los cultivos en las estirpes 305 y 137c. La cantidad de células al comienzo del experimento fue 1 millón de células  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . Las barras de error representan  $\pm \text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

Esta inhibición por  $\text{NO}_3^-$  se comprueba con la medida de consumo de urea y úrico en la estirpe 305 (Figura 2.14). Como podemos observar cuando en el

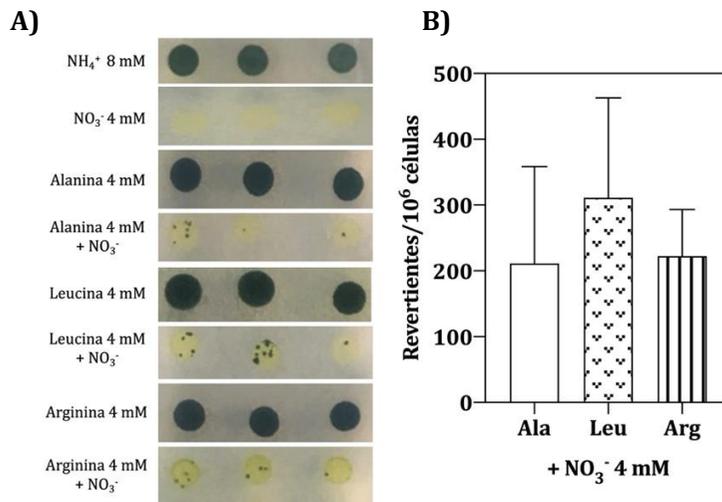
medio hay urea y  $\text{NO}_3^-$ , los niveles de urea permanecen constantes durante 24 h (Figura 2.14 A). En el caso del úrico (Figura 2.14 B), su consumo disminuye a medida que aumentamos la concentración de  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 2.14. Inhibición por  $\text{NO}_3^-$  en el consumo de urea y úrico en la estirpe 305. A)** consumo de urea, y **B)** consumo de ácido úrico. La concentración inicial de urea y úrico fue 1 mM. La urea se midió a 0, 24 y 48 h. El úrico se midió a 0, 2, 4 y 6 h. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

## 2.2.2. Reversión de la estirpe 305 para el crecimiento en fuentes de N orgánico

En la estirpe 305, cuando se crecía en medio sólido con  $\text{NO}_3^-$  y diferentes tipos de aminoácidos, se observaba la reversión espontánea del fenotipo y la aparición de colonias (revertientes) que eran capaces de crecer en estas condiciones (Figura 2.15). La tasa de reversión fue similar en presencia de los diferentes aminoácidos analizados ( $\approx 300$  revertientes/ $10^6$  células) (Figura 2.15).



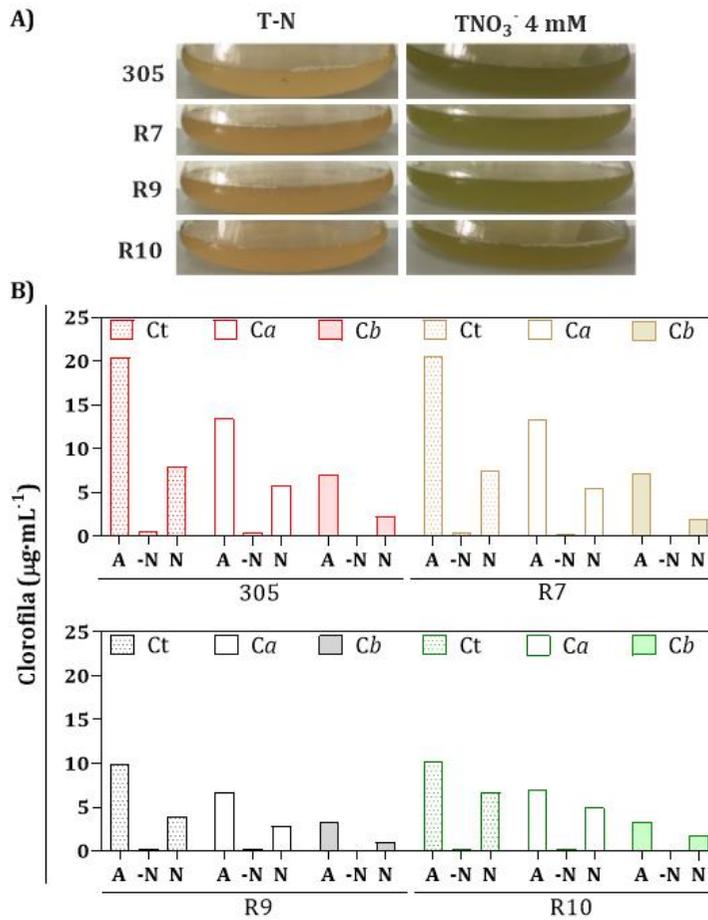
**Figura 2.15. Reversión de la estirpe 305 en aminoácidos más  $\text{NO}_3^-$ .** Detalle de la reversión en aminoácidos más  $\text{NO}_3^-$  y tasa de reversión. El  $\text{NO}_3^-$  en todas las condiciones era 4 mM. **A)** Foto tomada a los 7 días de crecimiento. **B)** Cuantificación de los revertientes/ $10^6$  células. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

Este hecho también ocurre para otras fuentes de N orgánico (urea y úrico). Los revertientes obtenidos en fuentes orgánicas de N son estables y muestran actividad cruzada. En un TFM (Sara Aguado, TFM 2021) se estudió este proceso de reversión incluyendo, además de la estirpe 305, el mutante de NiR M3 que muestra el mismo comportamiento. Se aislaron 10 revertientes de cada estirpe (305 y M3) en las condiciones (leucina +  $\text{NO}_3^-$ , urea +  $\text{NO}_3^-$  y úrico +  $\text{NO}_3^-$ ). Analizamos si los revertientes aislados en una condición (por ejemplo, leucina +  $\text{NO}_3^-$ ), crecían también en las otras condiciones (por ejemplo, urea +  $\text{NO}_3^-$  y úrico +  $\text{NO}_3^-$ ) y viceversa. Los resultados confirmaban este hecho y permiten sugerir que la(s) reorganización(es) génica(s) que hayan podido tener lugar afectaría a un factor común implicado en la regulación negativa por  $\text{NO}_3^-$ /NIT2 para la asimilación de fuentes orgánicas de N. Además, se comprobó que el fenotipo era estable. Así, los revertientes que se aislaron inicialmente y que fueron mantenidos durante más de 3 años, tanto en condiciones de presión selectivas (4 mM leucina + 4 mM  $\text{NO}_3^-$ ) como no selectivas (8 mM  $\text{NH}_4^+$ ), mantuvieron el fenotipo.

### 2.3. Estudio de revertientes que han perdido la señal negativa de $\text{NO}_3^-$

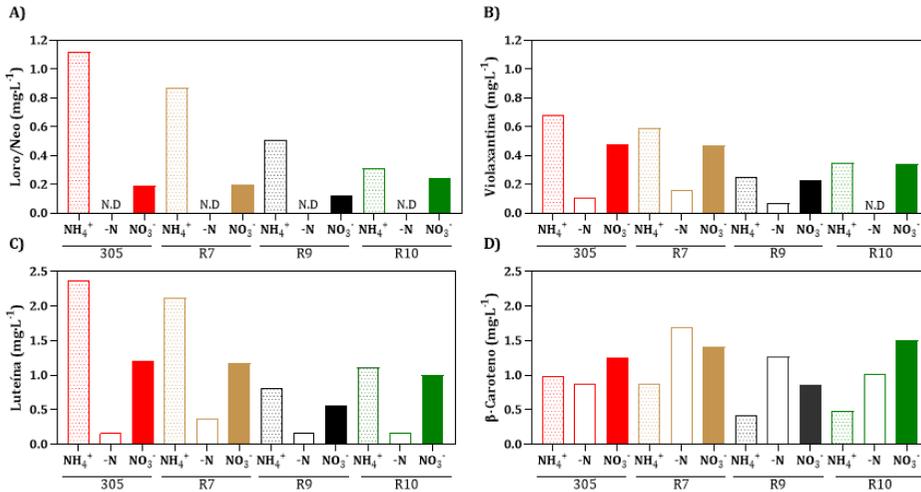
A continuación, se procedió a la caracterización de algunos de los revertientes obtenidos en 4 mM leucina + 4 mM  $\text{NO}_3^-$  (R7, R9 y R10). Al igual que

la estirpe parental 305, estas estirpes mantenían la protección frente a la degradación de clorofila en medios con  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2.16).



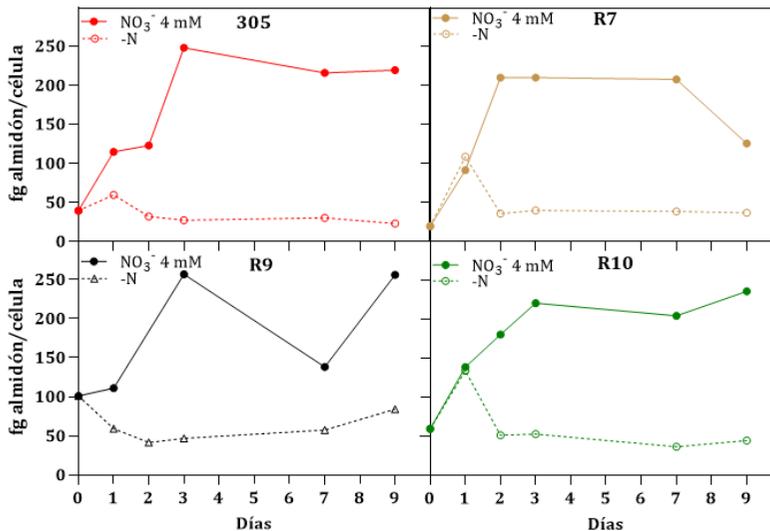
**Figura 2.16. Los revertientes R7, R9 y R10 mantienen la protección por  $\text{NO}_3^-$  para la degradación de clorofila. A)** Aspecto de los cultivos tras 9 días en medios sin N y con  $\text{NO}_3^-$  4 mM. **B)** Contenido en clorofila en los cultivos de la estirpe 305 y los revertientes en  $\text{NH}_4^+$  (A), deficiencia de N (-N) y  $\text{NO}_3^-$  (N). Ct (Clorofila total), Ca (Clorofila a) y Cb (Clorofila b).

En cuanto a otros pigmentos fotosintéticos (Figura 2.17), también se observa que tanto en la estirpe 305 como en los revertientes, los niveles de loroxantina/neoxantina, violaxantina y luteína son superiores en  $\text{NO}_3^-$  con respecto a deficiencia de N.



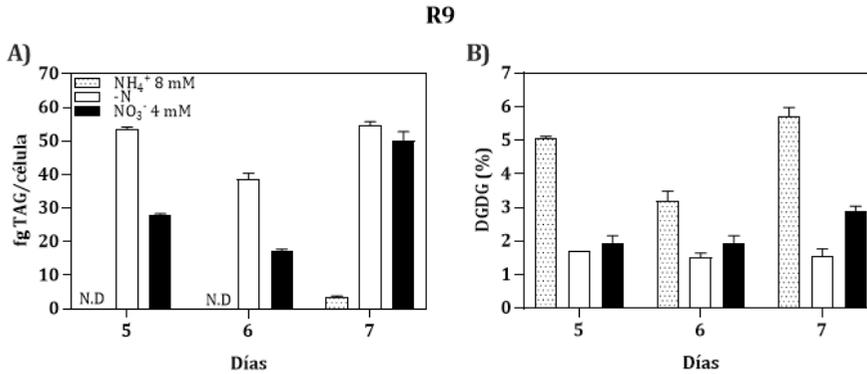
**Figura 2.17. Contenido en carotenoides en la estirpe 305 y los revertientes en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, deficiencia de N (-N) y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.** Los datos se corresponden al contenido de los carotenoides tras 9 días en medios con NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, -N y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 4 mM. N.D (No Detectable). **A)** Loroxantina/Neaxantina, **B)** Violaxantina, **C)** Luteína y **D)** β-Caroteno. Resultados obtenidos en HPLC.

En cuanto a la acumulación de almidón, todos los revertientes mostraban el mismo patrón que la estirpe de procedencia, acumulando más almidón en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que en ausencia de N (Figura 2.18).



**Figura 2.18. Acumulación de almidón de los revertientes en respuesta a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.** Comparación de la acumulación de almidón entre la estirpe parental (305) y los revertientes (R7, R9 y R10) durante 9 días. Las células se mantuvieron en luz y agitación continua.

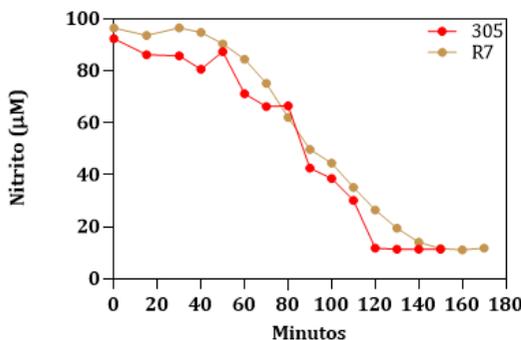
El perfil de acumulación de lípidos se determinó sólo en el revertiente R9. Tanto para los TAG como DGDG mostraban el mismo patrón que la estirpe de procedencia 305 (Figura 2.19).



**Figura 2.19. Acumulación de TAG y DGDG en la estirpe R9 en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, deficiencia de N (-N) y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.** Medidas obtenidas utilizando en HPTLC. N.D. (No Detectable). Las condiciones experimentales son las mismas que para la Figura 2.9. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

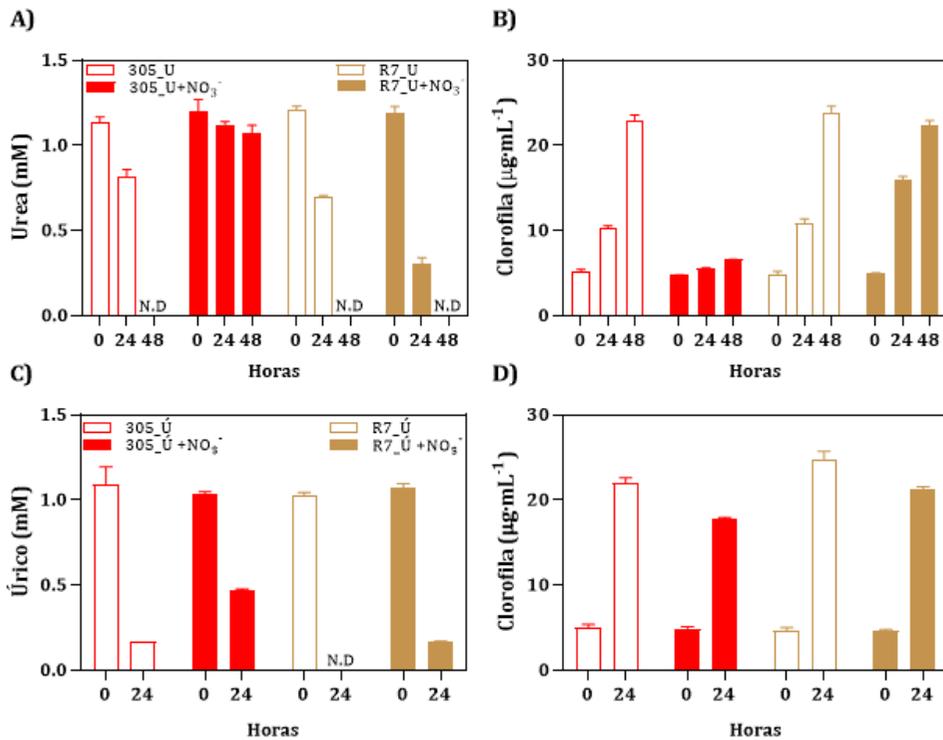
### 2.3.1. Consumo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, urea y úrico en la estirpe R7

De los revertientes aislados nos centramos en la estirpe R7 para los estudios posteriores. En el caso del consumo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, R7 muestra el mismo comportamiento que la estirpe de procedencia 305 (Figura 2.20). Es decir, cuando ambas estirpes se transfieren desde NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0,1 mM, y se determina la actividad de consumo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, se observa una primera fase de inducción ( $\approx$ 40 minutos) tras la cual el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> empieza a consumirse y finalmente se agota ( $\approx$ 120 minutos). Este resultado indica que la inducción de la actividad que involucraría al sistema I de transporte (NRT2.1/NAR2) así como la actividad NiR (ambos regulados por NIT2) serían funcionales (Galván et al., 1991; Higuera et al., 2014).



**Figura 2.20. Consumo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en la estirpe 305 y el revertiente R7.** Las estirpes se crecieron en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y se transfirieron a medios que contenía NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 100  $\mu$ M. A los tiempos indicados se cuantificó el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> remanente en el medio.

En cuanto al consumo de urea y de úrico (Figura 2.21), se confirma que el revertiente R7 no sufre la inhibición de la asimilación de estas fuentes de N en presencia de  $\text{NO}_3^-$ . Esto permite a la estirpe R7 consumir y crecer con urea (U) o úrico (Ú) en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2.21).



**Figura 2.21. Consumo urea y úrico en el revertiente R7.** Se muestra las concentraciones de urea (A) y úrico (C) que queda en los medios de cultivo a lo largo del ensayo. B) urea y D) úrico, muestra el contenido en clorofila en estas fuentes de N. Las células se mantuvieron en luz y agitación continua. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

### 2.3.2. Efecto del $\text{NO}_3^-$ sobre la gametogénesis en la estirpe R7

También se estudió la gametogénesis en la estirpe R7 en presencia de  $\text{NO}_3^-$ . La eficiencia para formar gametos se realizó incubando cada una de las estirpes durante 12 h en luz en medios que contenían  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , o carecían de N. Tras la realización de los cruces de estirpes  $\text{mt}^+ \times \text{mt}^-$ , se cuantificó el número de zigotos obtenido en cada condición. La ausencia de zigotos en medios con  $\text{NH}_4^+$  indica que ha funcionado la represión por  $\text{NH}_4^+$  sobre la gametogénesis. El medio carente de N sería el control positivo que indica que las estirpes han formado

gametos. Si hay o no represión por  $\text{NO}_3^-$  sobre la gametogénesis se analiza cuando se cruzan las estirpes 137c (que forma gametos en  $\text{NO}_3^-$ ) con R7. La ausencia de cigotos en  $\text{NO}_3^-$  para el cruce R7 x 137c, indica que este revertiente se comporta como la estirpe parental 305. Es decir, no se ha perdido la señal negativa de  $\text{NO}_3^-$  sobre la gametogénesis.

**Tabla 2.2. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  en la gametogénesis en el revertiente R7.** Conteo de cigotos.

Cruce	Número de cigotos		
	T-N	$\text{NH}_4^+$ 8 mM	$\text{NO}_3^-$ 4 mM
R7(-) x 137c (+)	183	N.D	N.D
305(-) x 137c (+)	135	N.D	N.D

Cada una de las estirpes se incubaron durante 12 h en luz en las condiciones de N indicadas. El número de cigotos hace referencia al cuantificado en las placas por  $\text{cm}^2$  tras el barrido de la placa completa. (N.D) No Detectable.

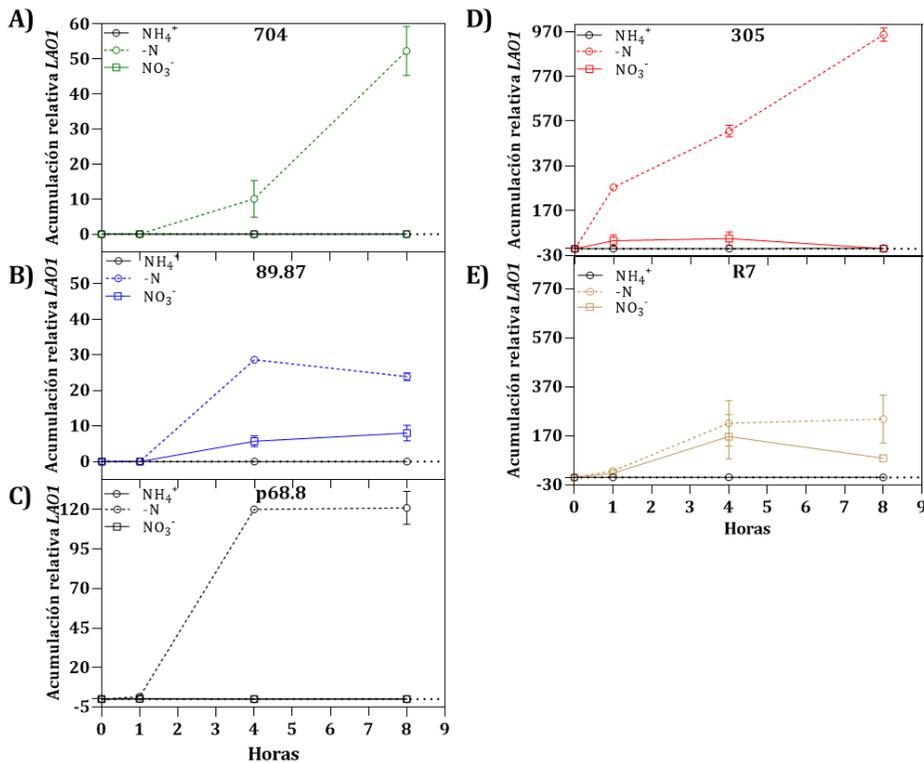
### 2.3.3. Análisis de los patrones de expresión de genes para la asimilación de Nitrógeno

Finalmente se estudió el patrón de expresión de los genes *LAO1*, *NIA1* (NR) y *NRT2.1* (HAN/NiT) en las estirpes 305 y R7, así como en las estirpes 704 (WT), el mutante insercional 89.87 (mutante *nit2* derivado de 704), y la estirpe complementada con *NIT2* (p68.8).

En la Figura 2.22 se muestra la expresión de *LAO1*. En la estirpe WT (704), la expresión de *LAO1* aumenta progresivamente con el tiempo, en -ausencia de N, pero está totalmente reprimida en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ . En el mutante *nit2* y en deficiencia de N, el nivel de expresión de *LAO1* es más bajo, pero se ha perdido parcialmente la represión por  $\text{NO}_3^-$  y no por  $\text{NH}_4^+$ . Esta represión por  $\text{NO}_3^-$  se recupera cuando se complementa con *NIT2* (estirpe p68.8). Este dato indica que *NIT2* regula *LAO1*, directa o indirectamente.

Cuando se comparan las estirpes 305 y R7 se observa el mismo patrón que cuando se comparan las estirpes 704 y 89.87. En la estirpe R7 se ha perdido parcialmente la represión por  $\text{NO}_3^-$  pero no por  $\text{NH}_4^+$ . Esto sugiere que R7 estaría afectado en la señalización mediada por *NIT2*. Sin embargo, no parece ser un

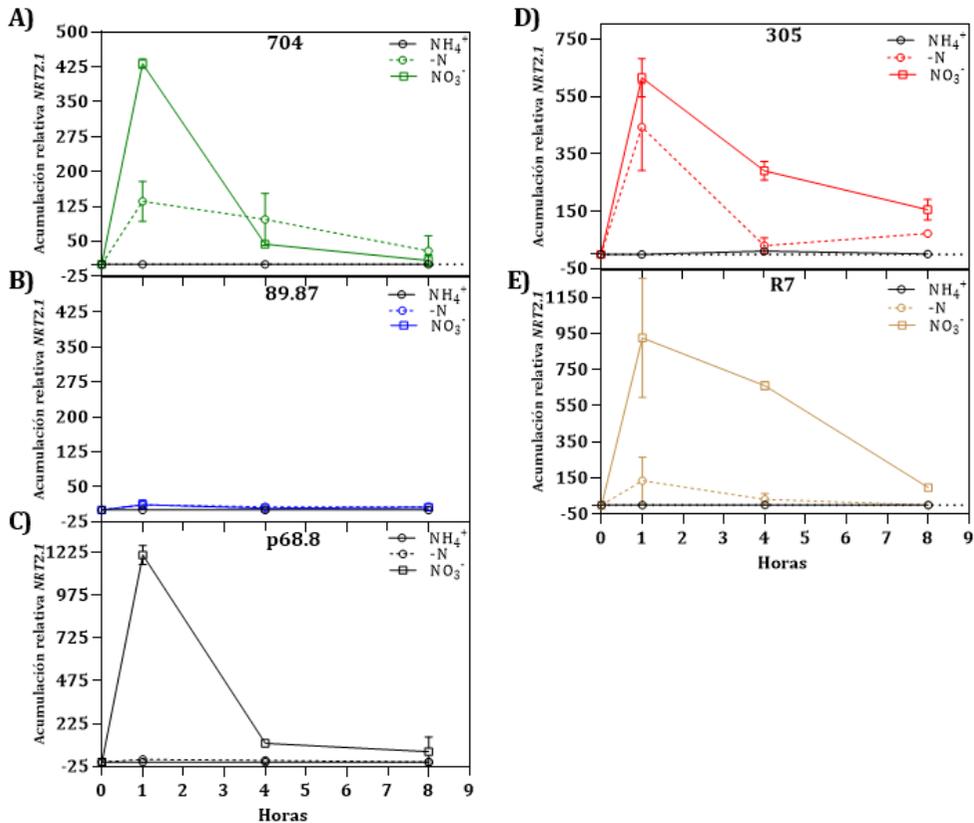
mutante *nit2* ya que la inducción de la actividad de consumo de  $\text{NO}_2^-$  (que involucraría a *NRT2.1* y *NIII1*) no se muestra afectada (Figura 2.20)



**Figura 2.22. Patrones de expresión de LAO1 en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Se muestra la expresión relativa de LAO1 con respecto al gen de referencia ubiquitina ligasa (ver Materiales y Métodos). Cada una de las estirpes se crecieron en  $\text{NH}_4^+$  y luego se transfirieron a medios con  $\text{NH}_4^+$ , carente de N o  $\text{NO}_3^-$  4 mM. **A)** 704, **B)** 89.87, **C)** p68.8, **D)** 305 y **E)** R7. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

Para el caso de *NRT2.1*, el patrón de expresión de *NRT2.1* en la estirpe 704 (WT) encaja con: represión en  $\text{NH}_4^+$ , desrepresión en ausencia de N y un pico de máxima expresión en  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2.23) (Higuera sobrino et al., 2014). En el mutante *nit2* (89.87) se pierde esa activación por  $\text{NO}_3^-$ , y se recupera tras la complementación con *NIT2* (p68.8). Así pues, *NRT2.1* está controlado por *NIT2* (Camargo et al., 2007; Higuera et al., 2014). Pero, además, este sistema de transporte *NRT2.1* está muy relacionado junto con *NIT2* en la señalización por  $\text{NO}_3^-$  (Llamas et al., 2002; Rexach et al., 2002). En la estirpe 305, se conserva la represión por  $\text{NH}_4^+$  y la activación por  $\text{NO}_3^-$ . En la situación de ausencia de N se obtienen altos niveles de expresión, la razón de ello es que esta estirpe al carecer

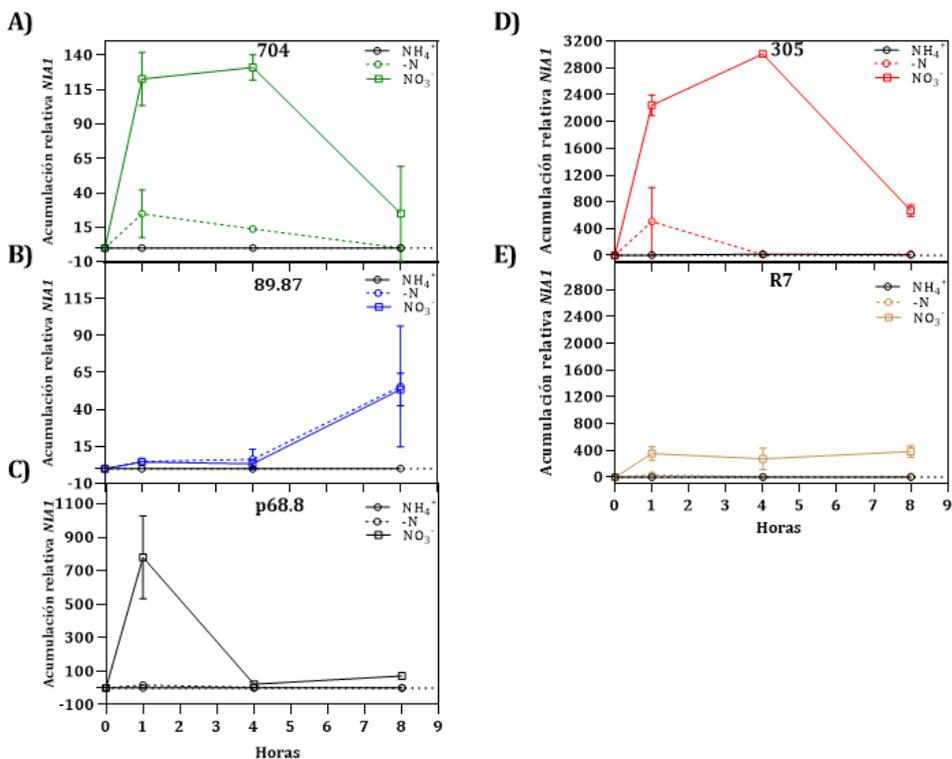
de actividad NR, es muy sensible a las trazas de  $\text{NO}_3^-$  presentes en medios carentes de N (Llamas et al., 2002; Pozuelo et al., 2000; Rexach et al., 2002; Galván et al., 1992). En la estirpe R7 hay una sobreexpresión de *NRT2.1* en comparación con la estirpe 305. Este dato vuelve a apoyar que R7 no estaría afectado en *NIT2*.



**Figura 2.23. Patrones de expresión de *NRT2.1* en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Las condiciones de ensayo fueron las mismas que para la Figura 2.22. Las barras de error representan  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

Finalmente, *NIA1* mostró un patrón similar al de *NRT2.1* ya que ambos se regulan por *NIT2*. En la estirpe WT (704), este gen que estaba reprimido en  $\text{NH}_4^+$ , exhibió su máxima activación en  $\text{NO}_3^-$ , y una desrepresión en ausencia de N (Figura 2.24) (Higuera et al., 2014). La inducción de *NIA1* por  $\text{NO}_3^-$  no se observó en el mutante *nit2* (89.87) y se recuperó tras la complementación con *NIT2* (estirpe p68.8).

La estirpe 305 es un mutante de NR afectado en la actividad diaforasa pero no en la actividad terminal (Fernández and Cárdenas, 1982; Fernandez and Matagne, 1984), es decir, expresa el gen pero no es funcional para la reducción de  $\text{NO}_3^-$ . Esto da lugar a que la estirpe 305, así como otros mutantes que carecen de actividad NR como son los mutantes de cofactor de molibdeno o los mutantes de delección de NR, sobresientan la señal de  $\text{NO}_3^-$  (Galván et al., 1992; Llamas et al., 2002; Pozuelo et al., 2000; Rexach et al., 2002). Cuando se comparan los patrones de expresión de *NIA1* en las estirpes 305 y R7, en ambos hay represión por  $\text{NH}_4^+$ . Sin embargo, la activación por  $\text{NO}_3^-$  disminuye significativamente en el revertiente R7. Los datos obtenidos con los revertientes indicarían que estos no serían mutantes *nit2*, pero sí podrían estar afectados en la ruta de señalización de NIT2.



**Figura 2.24. Patrones de expresión de *NIA1* en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Las condiciones de ensayo fueron las mismas que para la Figura 2.22. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

En resumen, los datos aportados en este Capítulo indican que el  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 participan en la regulación de distintos procesos en *Chlamydomonas*. La estirpe

305 es como si quedara atrapada en esta señal de  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  y responde quedando en un estado vegetativo que le permitiría:

Dividirse más, no diferenciarse en gametos, mantener unos niveles de clorofila y una actividad fotosintética apropiada, y a la vez sintetizar más almidón, pero menos TAG. El mantenimiento de los DGDG, compuestos carotenoides y clorofila apoyan al efecto de  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  en la protección del aparato fotosintético.

Al quedarse atrapada en esta situación de  $\text{NO}_3^-$ , la estirpe 305 está impedida para asimilar fuentes orgánicas de N. La pérdida de un componente de señalización, aún por identificar, permite revertir específicamente la regulación negativa por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  para la asimilación de N orgánico.



## **CAPÍTULO 3. Estudio de rutas metabólicas, promotores y factores de transcripción que se regulan por nitrógeno**

---



## CAPÍTULO 3. Estudio de rutas metabólicas, promotores y factores de transcripción que se regulan por nitrógeno

---

NIT2 es el gen maestro para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  en *Chlamydomonas*. Además, los resultados mostrados en los Capítulos 1 y 2 muestran que el  $\text{NO}_3^-$  puede funcionar como una señal mediada por NIT2, e independiente de su asimilación, ya que regula otros procesos en *Chlamydomonas*. Esta señal protege frente a la degradación de clorofila, favorece la acumulación de almidón, inhibe la asimilación de N orgánico y la gametogénesis. Asimismo, NIT2 también es importante para la desasimilación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$ . En el caso del metabolismo de lípidos, la señal de  $\text{NO}_3^-$  mediada por NIT2 también tiene un papel regulador.

Con el objeto de identificar genes que controlen estos procesos y las rutas reguladoras mediadas por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  se procedió a:

- Analizar los patrones de expresión de genes en la estirpe WT (704) y el mutante *nit2* (89.87).
- Analizar los Factores de Transcripción (TFs) y Reguladores Transcripcionales (TRs) regulados en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  y NIT2.
- Estudiar de los promotores de los genes regulados para identificar motivos de unión a TFs.

### 3.1. Patrones de expresión de genes en la estirpe WT y el mutante *nit2*

Los datos que se analizan se corresponden a la transcriptómica realizada con las estirpes WT (704) y el mutante *nit2* (89.87) cuando se transfieren desde  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  y en dos condiciones: A) TAP (condición mixotrófica-acetato y luz) y B) MM (condición autotróficas-alto  $\text{CO}_2$  y luz). El análisis cuantitativo de los transcritos, mediante RNAseq, se realizó después de una hora de inducción en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (Calatrava V, 2018).

A continuación, se muestran los genes clasificados por rutas metabólicas y se discute el posible significado biológico de los resultados.

### 3.1.1. Síntesis y degradación de clorofila

La degradación de clorofila es una de las respuestas típicas que tiene lugar cuando las células se encuentran en deficiencia de N en condiciones mixotróficas, pero no en condiciones autotróficas (Wei et al., 2014; Shai et al., 2016). Nuestros datos muestran que cuando las células se transfieren desde  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  en condiciones mixotróficas, el mutante *nit2* disminuye la expresión de la mayoría de los genes para la biosíntesis de clorofila, pero, además, aumenta la expresión de *NYC1/SDR21* y *CLH1* que participan en la degradación (Anexo III Tabla 1). La estirpe WT responde disminuyendo la expresión de algunos de los genes para la síntesis de clorofila como son *GSA1*, *PBGD1*, *CPX1*, *CHLD*, *GUN4* y *UPD1/UROD1* (color rojo en la Tabla 1) pero los genes para la degradación no alteran sus niveles expresión (color blanco en la Tabla 1). Este dato indica que la estirpe WT responde apropiadamente desde una situación en la que está asimilando  $\text{NH}_4^+$  a otra en la que tienen que poner en marcha la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ , disminuye la síntesis, pero no la degradación de clorofila.

### 3.1.2. Síntesis de carotenos

En condiciones mixotróficas, no se observan cambios en la expresión de genes para la biosíntesis de caroteno en el WT, aunque algunos de ellos sí disminuyen en el mutante *nit2* (*CMS*, *DXR*, *GGPS*, *GGR*, *HDS*, *CYP97C1*, *CYP97A3*, *CYP97A3* y *CHYB*) (Anexo III Tabla 2).

### 3.1.3. Metabolismo del almidón

En cuanto al metabolismo del almidón, no se observa un patrón claro de regulación por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  que apoye los resultados obtenidos con la estirpe 305 en el Capítulo 2. En el mutante *nit2* aumenta la expresión de genes de la biosíntesis (*GPM2*, *STA3* y *SSS5*) y disminuye *INV2* (involucrado en la degradación) lo que está de acuerdo con la acumulación de almidón en deficiencia de N (Anexo III Tabla 3).

### 3.1.4. Síntesis de TAG

Es un hecho bien conocido que *Chlamydomonas* acumula TAG en respuesta a deficiencia de N. Esto es el resultado del reciclado de lípidos de membrana y de la síntesis de TAG por acilación del DAG (Boyle et al., 2012; Gargouri et al., 2015; Li-Beisson et al., 2021).

En este estudio nos hemos centrado en el análisis del patrón de expresión de los genes que participan en la síntesis de TAG, así como de los implicados en el metabolismo de los lípidos de la membrana del tilacoide (Anexo III Tabla 4).

En este caso encontramos curiosas diferencias entre ambas estirpes WT y el mutante *nit2* (89.87). En el mutante *nit2* (89.87) se observa un aumento en la expresión de *DGAT1* (*DiacylGlycerol Acyltransferase Type 1*), *DGTT1* (*DiacylGlycerol acylTransferase Type 2*), *PDAT1* (*Phospholipid Diacylglycerol Acyltransferase Type 1* que formaría DGTS) y *MLDP1* (*Major Lipid Droplet Protein*), todo ello indica un aumento en la síntesis de TAG que alimentaría/aumentaría las LDs (*Lipids Droplets*/gota de grasa). Sin embargo, disminuye *DGAT3* (*DiacylGlycerol Acyltransferase Type 3*), *BTA1* (*diacylglycerol-N, N, N trimethyl homoserine*), responsable de la síntesis de DGTS, que es el principal lípido de membrana alrededor de las LP en *Chlamydomonas* (Li-Beisson et al., 2021). En el mutante *nit2* también disminuye *MGD1* (*MonoGalactosylDiacylglycerol synthase*) lo que sugeriría menor contenido de MGDG.

En la estirpe WT no se observan cambios en la expresión de genes la síntesis de TAG. Sin embargo, hay un aumento en la expresión de *DGD1* (*DiGalactosil Diacylglycerol synthase 1*) y *PGD1* (*Plastid Galactoglycerolipid Degradation 1*) que sería dependiente de NIT2. La activación de *PGD1* dependiente de NIT2 apoya los datos obtenidos en el Capítulo 2 donde los niveles de *DGDG* están mantenidos en la estirpe 305. En resumen, parece que la ausencia o presencia de NIT2 determina un metabolismo diferencial de los TAG y los lípidos del tilacoide.

### 3.1.5. Gametogénesis

La expresión de genes para el desarrollo de la gametogénesis, tanto en condiciones mixotróficas como autoxóficas, permitía indentificar a *NSG13* (Nitrogen-Starved Gametogenesis (NSG) gene 13) como un posible candidato para determinar el avance o no de la gametogénesis. *NSG13* aumenta su expresión en ambas estirpes y en ambas condiciones (señalado en verde en la Tabla 5). Sin embargo, la expresión es mayor en el mutante *nit2* que en el WT cuando se transfieren a  $\text{NO}_3^-$ . Esto hace suponer una regulación negativa por  $\text{NO}_3^-$ /NIT2. Es decir, si hay  $\text{NO}_3^-$  y NIT2 se bloquearía el avance de la gametogénesis (algo que ocurre en la estirpe 305, aun siendo incapaz de asimilar  $\text{NO}_3^-$ ) (Capítulo 2). Esta regulación negativa, a nivel transcripcional, se detalla más adelante en la asimilación del N orgánico. *NSG13* codificaría una proteína con 3 dominios transmembrana y 4 repeticiones tipo armadillo, que se expresa exclusivamente

durante la gametogénesis (Abe et al., 2004), pero cuya función se desconoce (Anexo III Tabla 5).

### 3.1.6. Metabolismo del NO

Con respecto a los genes implicados en el metabolismo de NO (Anexo III Tabla 6), la expresión de *GSNOR2*, *HCP2*, *ARC* y *FLVs* no muestran regulación por  $\text{NO}_3^-$ . *THB1*, *THB2* y *NIRK* sí se activan por  $\text{NO}_3^-$  y es dependiente de *NIT2*, tanto en medio MM como TAP (señalado en verde en la Tabla 6). Este patrón también se observa para *CYP55*, pero únicamente en medio TAP.

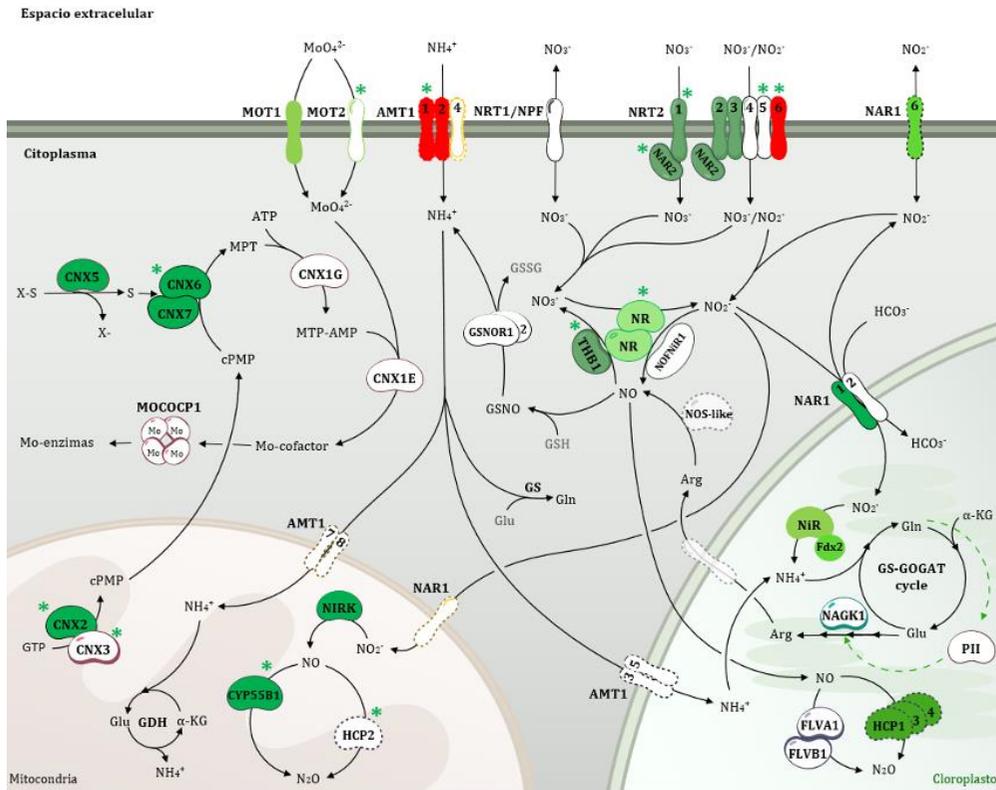
### 3.1.7. Asimilación de nitrógeno

En Anexo III Tablas 7 y 8 se muestran los patrones de expresión de los genes relacionados con el metabolismo de N en condiciones mixotróficas (Anexo III Tabla 7) y autotróficas (Anexo III Tabla 8). Además, en las Figuras 3.1 y 3.2 se muestran los esquemas para las rutas de asimilación de N inorgánico y orgánico, respectivamente. En estos esquemas se resaltan aquellos genes que muestran una regulación positiva por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  y los que tendrían una regulación negativa por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$ .

La mayoría de los genes que codifican proteínas claves de la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ , muestran un patrón de **regulación positiva por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$** , y tanto en medio MM como TAP. Entre ellos los que codifican la NR y NiR (*NIT1*, *NII1*), los transportadores (*NRT2.1*, *NAR2*, *NRT2.2*, *NRT2.3*, *NAR1.1*, *NAR1.6*, etc.) y genes en la biosíntesis del cofactor de molibdeno (*MOT1*, *CNX2*, *CNX6*, etc.). Este patrón es fácilmente identificable porque el  $\log_2\text{Fold Change} > 1$  en WTN/WTA (código verde) y WTN>*nit2N* (código verde) (Anexo III, Tablas 7 y 8).

Cuando se analizó el patrón de expresión de los genes para la asimilación de N orgánico, y en particular aquellos que intervienen en la captación de N, nos encontramos con un patrón característico. Son genes que se inducen al pasar las células de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  en ambas estirpes ( $\log_2\text{Fold Change} > 1$  en WTN/WTA y *nit2N/nit2A*) pero presentan una inducción significativamente mayor en el mutante *nit2* que en el WT ( $\log_2\text{Fold Change} < 1$  WTN>*nit2N*). La explicación para ello es que, el paso desde un medio con  $\text{NH}_4^+$  o a otro con  $\text{NO}_3^-$  genera una condición de deficiencia de N (desde la retirada del  $\text{NH}_4^+$  hasta que se inducen los sistemas de transporte y de reducción de  $\text{NO}_3^-$ ). Esta situación sería transitoria en la estirpe WT y permanente en el mutante *nit2*. Por lo tanto, a pesar de su inducción en  $\text{NO}_3^-$ , hemos definido estos genes como **regulados**

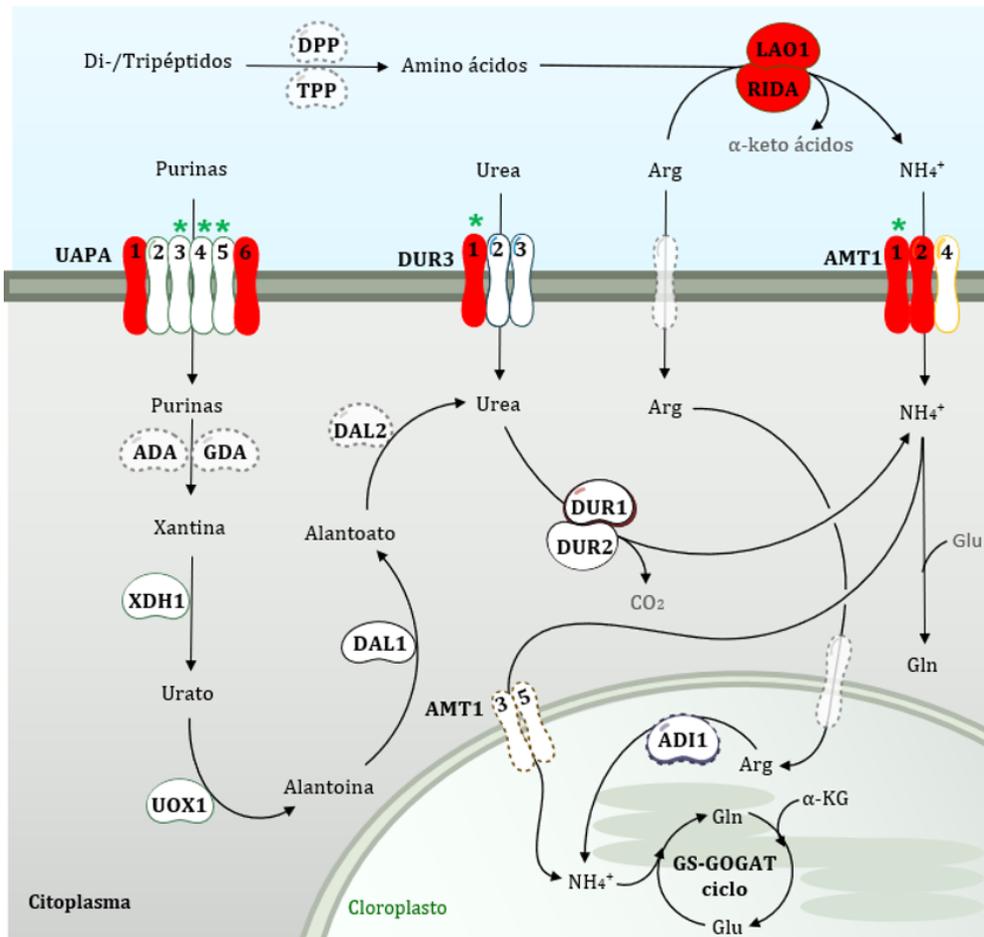
**negativamente por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NIT2.** Esta regulación negativa por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NIT2 es la que se observó en el Capítulo 2 para la asimilación del N orgánico y se hizo extensiva para otras rutas. Este patrón de regulación negativa es fácilmente identificable en las tablas mediante el código de colores verde-rojo-verde (verde para la columna WTN/WTA, rojo para WTN>nit2N, y verde para nit2N/nit2A) (Anexo III Tablas 7 y 8).



**Figura 3.1. Regulación por NIT2 de los genes implicados en la asimilación de N inorgánico.** Se muestra la ruta para la asimilación de N inorgánico. Se destaca en color verde aquellos genes/proteínas que se regulan positivamente por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NIT2 y en rojo los que muestran una regulación negativa. Figura adaptada de Calatrava et al., 2023b. Con (\*) se indican que los correspondientes genes tendrían motivos de unión a NIT2 en su promotor.

En condiciones mixotróficas, se observa una regulación negativa por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NIT2 que afecta a la expresión de genes para la asimilación de aminoácidos (*LAO1*, *RIDA*), transportadores de purina (*UAPA1* y *UAPA6*), urea carboxilasa (*DUR1*) así como los transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de alta afinidad (*AMT1.1*) y el transportador de CO<sub>2</sub> (*RHP2*), y la enzima cloroplástica glutamato sintetasa

(*GLN3*). Estos datos concuerdan y explican los obtenidos en el Capítulo 2 donde se muestra que el  $\text{NO}_3^-$  inhibe la asimilación de aminoácidos, urea y úrico en un proceso que es dependiente de la presencia de NIT2. Esta regulación jerárquica, en la que el  $\text{NH}_4^+$  inhibe la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  y ambos,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , reprimen los genes de la asimilación de N orgánico constituye la “pirámide nutricional” del N en *Chlamydomonas* (Calatrava et al., 2023b). El  $\text{NO}_3^-$ , situado en el centro de la pirámide, inhibiría a través de NIT2 la asimilación de N orgánico.

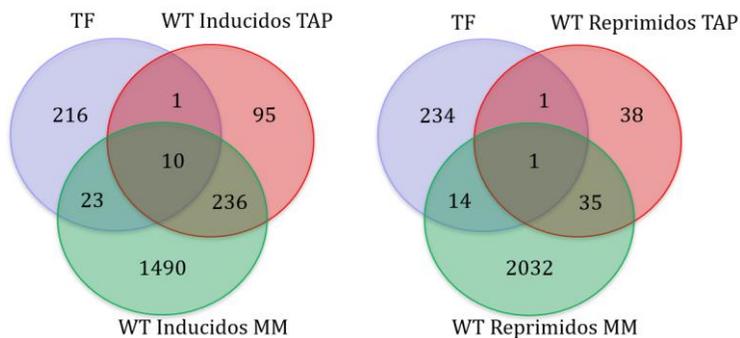


**Figura 3.2. Regulación por NIT2 de los genes implicados en la asimilación de N orgánico.** Se muestran las rutas para la asimilación de aminoácidos, urea y purinas. Se destaca en color rojo aquellos genes/proteínas que se regulan positivamente por  $\text{NO}_3^-$ /NIT2. Figura adaptada de Calatrava et al., 2023b. Con (\*) se indican que los correspondientes genes tendrían motivos de unión a NIT2 en su promotor.

Como se ha descrito en el Capítulo 2, una estirpe *nit1NIT2* (305) presenta una señal negativa persistente mediada por  $\text{NO}_3^-$  que impide la asimilación de N orgánico. Esta es una situación que genera una inestabilidad genética que lleva a la generación de mutantes espontáneos (revertientes) capaces de asimilar el N orgánico. Los datos del Capítulo 2 sugieren que estos revertientes no estarían afectados en *NIT2* pero sí en su ruta de señalización. Una posibilidad para identificar el factor implicado sería llevar a cabo la secuenciación de los genomas de estas estirpes, buscando posibles transposones o modificaciones que puedan alterar la expresión del gen responsable del fenotipo.

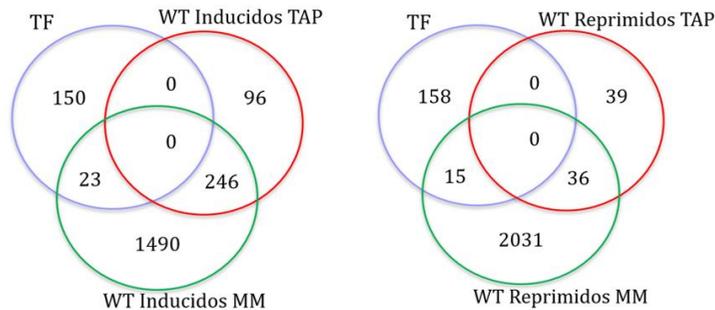
### 3.2. Análisis de TFs (Factores de Transcripción) y TRs (Reguladores Transcripcionales) regulados en respuesta a $\text{NO}_3^-$ y NIT2

Se analizó la respuesta a  $\text{NO}_3^-$ , tanto en condiciones mixotróficas o autotróficas, de 250 factores de transcripción (TF) y 173 reguladores transcripcionales (TR) en la estirpe WT. La Figura 3.3 muestra aquellos TF y TR diferencialmente regulados con un  $\text{Log}_2$  Fold Change  $>1$  y  $<-1$ . Dentro de los TF que aumentan su expresión, 10 TF lo hacían en ambas condiciones, 1 TF fue específico de TAP y 23 TF respondieron únicamente en MM (Figura 3.3). En el caso de los TF que disminuyen su expresión, sólo 1 TF (*ROC40*) es común para los medios TAP y MM, 1 TF es específico de TAP y 14 TF son específicos de MM (Figura 3.3)



**Figura 3.3. Diagrama de Venn de factores transcripcionales expresados diferencialmente en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  de la estirpe WT (704).** Los 250 factores de transcripción se corresponden con los identificados en (Gargouri et al., 2015). Para los TF diferencialmente regulados en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  se consideró un  $\text{log}_2\text{Fold Change}>1$  para los genes regulados positivamente, y  $<-1$  para los regulados negativamente y un p-value (adj)  $<0,05$ .

En el caso de los genes que codifican TR, 23 aumentaban su expresión y 15 la disminuían. Interesantemente, todos respondieron de forma exclusiva en MM (Figura 3.4).



**Figura 3.4. Diagrama de Venn de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  de la estirpe WT (704).** Los TR analizados corresponden a los identificados en (Gargouri et al., 2015). Para los genes diferencialmente regulados en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  se consideró un  $\log_2$  Fold Change  $>1$  para los genes regulados positivamente y  $<-1$  para los regulados negativamente y un p-value (adj)  $<0,05$ .

En Anexo III Tabla 9, se muestran los patrones de expresión de los TFs, incluyendo dos que no cumplen estrictamente los criterios de  $\log_2$  Fold Change, pero cuya secuencia de unión al ADN está conservada en el promotor de *NIT2*. De los 10 TF regulados positivamente tanto en TAP como MM, sólo uno, *NSG17* (Cre14.g620850) aumenta su expresión de una forma dependiente de *NIT2*, en ambas condiciones. *bHLH9* (Cre04.g216200) y un bZIP (Cre12.g510350) son posibles candidatos para ser regulados negativamente por *NIT2*.

En cuanto a los TF que disminuyen su expresión en la estirpe WT cuando se transfiere a  $\text{NO}_3^-$  sólo 1 es común para ambas condiciones; mixotrófica y autotrófica, y se trata de *ROC40* (Anexo III Tabla 9).

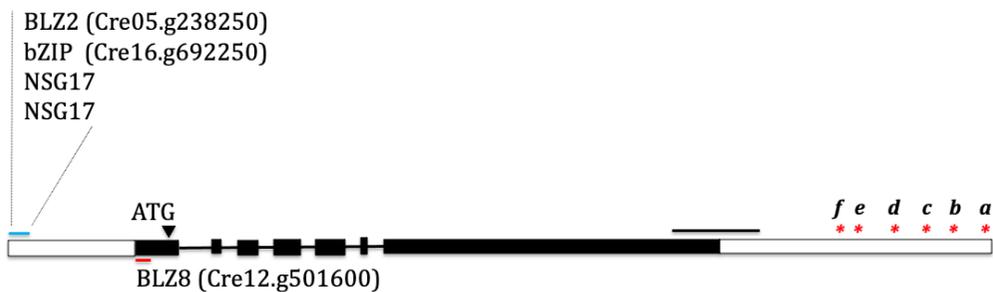
### 3.3. Estudios de los promotores de los genes regulados para identificar motivos de unión a TFs

Para el análisis de motivos de unión de TF a los promotores se consideraron 1000 pb antes del inicio de transcripción y se realizó la búsqueda de motivos de unión usando la base de datos PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org>)

### 3.3.1 Análisis del promotor de NIT2

El promotor de *NIT2* muestra motivos de unión a los TFs de tipo bZIP Cre16.g692250, Cre05.g238250 (bZIP/BLZ2) y Cre12.g501600 (bLZ8), y al TF de tipo bHLH Cre14.g620850 (NSG17) (Figura 3.5). Excepto bLZ8, cuyo sitio de unión estaría cerca del inicio del ATG de inicio, los demás se encuentran en la misma región de 26 pb pero alejados del ATG de inicio ( $\approx$ -1Kb).

A)



B)

TATGCAGTACCATAGGGCAGCGCTCCATGTGTGTGCGCCGTGGGCGCTGTGTGCCCTACAGACACGTCACC  
CACGTGCCGCGCAGCAGGTGCTGTTCTGTCAGTACGTGGCTAGCCTGTGCGAAGTCCGCATGCGCGCAGTTG  
ATGC.....GGTGAAGGCCGCTAGGAACCCGCTGTCGGGCGACGCGCAGCGAGGCGTCCACCGGC  
GGGCGGGCGTCTCCTAAAGCAAGCTGGCATATGAATACAGGGATGGCTTACAACAACGGCGGGGAGCTTA

C)

ID	Proteína	Start	Stop	Cadena	Score	p-value	q-value	Secuencia de unión al ADN
Cre14.g620850	bHLH (NSG17)	74	88	+	16,05	0,00	0,00	CACGTGCCGCGCAGC
Cre12.g501600	bZIP (bLZ8)	1276	1289	-	15,65	0,00	0,00	ATGCCAGCTTGCTT
Cre05.g238250	bZIP (bLZ2)	62	76	-	14,50	0,00	0,02	GTGGGTGACGTGTCT
Cre16.g692250	bZIP	62	76	+	12,25	0,00	0,08	AGACACGTCACCCAC
Cre14.g620850	bHLH (NSG17)	65	79	-	10,37	0,00	0,12	CACGTGGGTGACGTG

**Figura 3.5. Esquema del análisis del promotor de NIT2.** A) Esquema de *NIT2* donde se indica la organización de exones, intrones, señales de inicio y final de la traducción, señales de poliadenilación (a-f) y la localización de motivos para la unión de TFs. Línea roja (sitio de unión para BLZ8), línea azul localización para los sitios de unión de BLZ2, NSG17 y Cre16.g692250. B) Secuencia del promotor desde -1290 hasta -1140 y desde -90 hasta el ATG de inicio indicado en negrita. La secuencia que contiene los sitios de unión de los diferentes TFs se resaltan en azul (BLZ2, NSG17 y Cre16.g692250) y rojo (BLZ8) C) Detalles de los motivos.

NIT2 (TF de la familia RWP-RK) es el regulador maestro para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  en *Chlamydomonas*. Los mutantes *nit2* son incapaces de crecer en  $\text{NO}_3^-$ , lo que se conoce como fenotipo *nit-* (Schnell and Lefebvre, 1993; Camargo et al., 2007). A nivel transcripcional, *NIT2* muestra baja expresión en  $\text{NH}_4^+$ , se induce en deficiencia de N, pero es en  $\text{NO}_3^-$  cuando se sabe que muestra su actividad y aumenta la expresión de genes para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Camargo et al., 2007; Higuera et al., 2014). Además, *NIT2* contiene múltiples sitios de poliadenilación, produciéndose transcritos de *NIT2* que muestran el mismo ORF (Open Reading Frame) pero con 3'UTR de diferentes longitudes. NZF1 (Nitrate Zinc Finger 1) es un factor que favorece la formación de la forma más larga del transcrito de *NIT2*, y la eficiencia de la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ . Posiblemente porque favorece la estabilidad del mRNA de *NIT2*, su transporte al citoplasma, aumentando su traducción y la cantidad de proteína NIT2 (Higuera et al., 2014). Su expresión podría estar regulada por tres miembros de la familia bZIP y un miembro de la familia bHLH, de acuerdo con los motivos de unión de TFs identificados en su promotor (Figura 3.5).

Los TFs de tipo bZIP (*basic leucine ZIPper*) constituyen una familia muy conservada, ampliamente distribuida en eucariotas y bien caracterizada en plantas donde regulan una gran cantidad de procesos biológicos y de respuesta a estrés (Dröge-Laser et al., 2018; Yoon et al., 2020). En *Chlamydomonas*, Fischer y colaboradores identificaron SOR1 (*Singlet Oxygen Resistant 1*) como un posible bZIP (Cre07.g321550) relacionado con la tolerancia del alga a altas concentraciones de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y por tanto mejorando la tolerancia a estrés oxidativo (Fischer et al., 2012). Posteriormente, Ji y colaboradores analizaron 17 bZIP presentes en el genoma de *Chlamydomonas* en relación con las respuestas a estrés salino y la acumulación de lípidos (Ji et al., 2018). Sobre la base del perfil de expresión de estos bZIP, se propuso que 6 de estos TF podrían estar involucrados en la respuesta a sal y acumulación de lípidos. Estos seis bZIPs son Cre12.g501600 (bLZ8), Cre12.g55730 y Cre16.g675700, que se regulan positivamente en respuesta a sal; mientras que Cre07.g321550, Cre07.g344668 y Cre13.g590350 se regulan negativamente (Ji et al., 2018). Además, Yamaoka y colaboradores identificaron un *bZIP1/BLZ2* (Cre05.g238250) como un factor que regula el remodelado de lípidos y contribuye a la respuesta del retículo endoplásmico (RE) a estrés en *Chlamydomonas* (Yamaoka et al., 2019). En respuesta a tunicamicina (un inductor de estrés en el RE), el mRNA de *bZIP1/BLZ2* se procesa de forma diferente con la consecuente pérdida de un fragmento de 32 nucleótidos que está mediado por CrIRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*). Esto da lugar a la pérdida del dominio transmembrana de *bZIP1/BLZ2* y su translocación desde el RE al

núcleo. Más recientemente, Choi y colaboradores. identificaron que bLZ8 (Cre12.g501600) se induce en respuesta a estrés oxidativo y regula la expresión de genes involucrados en el Mecanismo de Concentración de Carbono (CCM), como las anhidrasas carbónicas 7 y 8 (*CAH7* y *CAH8*) y el transportador de bicarbonato HLA3 (*High-Light Activated 3*) (Choi et al., 2022). Para ello, bLZ8 dimeriza junto con Cre17.g746547 (bZIP2). Además, la sobreexpresión de bLZ8 se asocia con la actividad del cloroplasto como la biosíntesis de pigmentos, derivados de carbohidratos, metabolismo de tetrapirrol, fotosíntesis, etc. También recientemente, Bai y colaboradores demostraron que la disrupción de *bZIP2* (Cre01.g051174) disminuye la acumulación de TAG y permite al alga sintetizar más carotenos y clorofila (Bai et al., 2021).

Además de la respuesta a estrés, algunos bZIP responden a N (López García De Lomana et al., 2015; Schmollinger et al., 2014). Por ejemplo, bLZ8 (Cre12.g501600) disminuye en respuesta a la deficiencia de N dando una respuesta temprana (15 minutos).

En Anexo III Tabla 10, se muestran los patrones de expresión de 21 TF de tipo bZIP de *Chlamydomonas* en respuesta a  $\text{NO}_3^-$ ; tanto de la estirpe WT como del mutante *nit2*. El cambio de expresión para algunos de estos bZIPs varía desde -2,4 a 2,2  $\log_2$ Fold Change y se resume del siguiente modo:

- Cre05.g238250 (bZIP1/bLZ2) y Cre13.g590350 (bZIP) aumentan su expresión (1,9 veces) en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  y requiere NIT2, pero sólo en medio TAP.
- Cre12.g501600 (bLZ8) y Cre17.g746547 (bZIP2) disminuyen su expresión y de manera independiente de NIT2.
- Cre06.g310500, Cre07.g344668, y Cre12.g557300 aumentan su expresión y requieren NIT2, pero sólo en medio MM.
- Cre16.g671200 aumenta su expresión, pero no requiere NIT2, y esto ocurre solo en medio MM.
- Cre12.g510350 se catalogaría como como regulado negativamente por  $\text{NO}_3^-$  y NIT2, tanto en TAP como en MM.

*NSG17* (*Nitrogen-Starved Gametogenesis -NSG- gene 17*) codifica un TF de la familia bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) inicialmente identificado como un factor relacionado con el proceso de gametogénesis (Abe et al., 2004), el cual se da en células de *Chlamydomonas* expuestas a la deficiencia de N. La falta de N induce la expresión de *NSG17*, similar a la que se observa para *NIA1* y el *NRT2.1*. Recientemente, se ha demostrado que *NSG17* es un represor para la

gametogénesis, de manera que en presencia de  $\text{NH}_4^+$  el mutante *nsg17* puede formar gametos. También, los gametos formados en deficiencia de N no pueden volver a diferenciarse a células vegetativas, cuando se les añade  $\text{NH}_4^+$  (Jia et al., 2022). Este mutante *nsg17* también se conoce como NRI1 (*Nitrogen Repletion Insensitive 1*) y NSG17 se ha propuesto como un represor de la gametogénesis, pero también de la asimilación de N orgánico.

En *Chlamydomonas*, la familia bHLH está formada por 10 miembros que se distribuyen en subfamilias: una específica de clorofitas (8 miembros), otra que incluye bHLH de plantas que participan en respuesta a Fe (Cre05.g241636) y la tercera donde se incluye NSG17 y estarían las proteínas BIM de plantas (*Bes Interacting Myc-Like proteins*). Los miembros de esta subfamilia contienen un dominio C-terminal de unos 100 aminoácidos que interacciona con BES1 (*Bri1-Emsuppressor*) (Jia et al., 2022; Yin et al., 2005). Esta descripción sugiere que NSG17 podría interactuar con otra proteína(s) y regular su actividad (Jia et al., 2022).

En Anexo III Tabla 11, se muestra el patrón de expresión de la familia bHLH de *Chlamydomonas* en respuesta a  $\text{NO}_3^-$  y NIT2. Cuatro de los genes que codifican los 10 bHLH son activados en  $\text{NO}_3^-$ , pero sólo *NSG17* es dependiente de NIT2 y este patrón ocurre tanto en el medio TAP como MM, como se indicó anteriormente.

### 3.3.2. Estudios de los promotores de los genes regulados para identificar motivos de unión a TFs.

Con la idea de identificar rutas y mecanismos de regulación entre los genes cuya expresión responde a N, se realizó una búsqueda de motivos de unión de TFs en los promotores de dichos genes. Entre ellos se incluyen: 1) los propios TFs regulados por  $\text{NO}_3^-$  (en Anexo III Tabla 12). En Anexo III Tabla 13 se muestran los motivos de unión a TFs identificados en los promotores de genes que pertenecen al núcleo de genes activados positivamente por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$ ; los que pertenecen al núcleo de genes inhibidos por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$ ; otros genes de la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ ; y genes de la asimilación de N orgánico.

En *Arabidopsis* se han generado modelos de regulación dinámicos en respuesta a N, basados en los patrones de expresión de TFs y la presencia de motivos de unión a TFs (GRNs, *Gene Regulatory Networks*) (Brooks et al., 2019). Recientemente, estas predicciones se han aplicado a *NLP7*, el gen clave para la señalización por  $\text{NO}_3^-$  y homólogo a NIT2 (Brooks et al., 2021). En este caso, la

plataforma ConnetTC predice que el 68% de los genes regulados por NLP7 lo harían de manera indirecta a través de 8 TF.

Cuando analizamos el núcleo de genes regulados positivamente por  $\text{NO}_3^-$ /NIT2, observamos que el  $\approx 25\%$  (12 de 47) presentan motivo de unión para NIT2, lo que sugiere una directa regulación por NIT2, un dato que encaja con lo observado en *Arabidopsis*. En nuestras condiciones ensayadas, el único TF que muestra una regulación dependiente de NIT2 es *NSG17* pero este carece de motivo de unión a NIT2.

### 3.3.3. Hipótesis de modelo de regulación transcripcional por $\text{NO}_3^-$ y NIT2

Proponer un modelo de regulación transcripcional por NIT2 en *Chlamydomonas*, sobre la base de la presencia de motivos de TFs es arriesgado y puede estar sesgado por varias razones: 1) Los datos de transcriptómica disponible, muchos de ellos en respuesta a la deficiencia de N, se han realizado en un fondo genético *nit1nit2* (Gargouri et al., 2015; Miller et al., 2010; Park et al., 2015; Schmollinger et al., 2014). 2) No se tienen en cuenta modificaciones post traduccionales como la fosforilación, la unión de otro regulador o modelos más complejos de regulación. Con respecto a esto último, cabe resaltar a la proteína CHT7 (*Compromised Hydrolysis of Triacylglycerols 7*, Cre11.g481800) de *Chlamydomonas* que tiene un papel durante la deficiencia de N y después en la re-administración del mismo. CHT7 participa en el control de la quiescencia y la división celular (Takeuchi et al., 2020; Tsai et al., 2018, 2014; Lin et al., 2022). Durante la deficiencia de N, *Chlamydomonas* pone en marcha un programa de regulación transcripcional por el que disminuye la expresión de genes que codifican proteínas que participan en la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas, y la división celular, al mismo tiempo que aumenta la expresión de genes que participan en la síntesis de TAG y almidón (Gargouri et al., 2015; Miller et al., 2010; Park et al., 2015; Schmollinger et al., 2014). Este control transcripcional es importante para que las células entren en una fase ordenada de quiescencia y luego sobrevivan a ese periodo, reversible, tras la re-administración de N (Tsai et al., 2018). En el mutante *cht7* resulta afectada la expresión de un amplio rango de genes. Con relación al metabolismo del N, el mutante *cht7* disminuye la expresión de *NIII1*, *NRT2.1*, *NRT2.2*, *NAR2*, *THB1*, *THB2* o *FDX2*, incluso los reguladores *NIT2*, *bHLH3* y *NRR* en respuesta a la deficiencia de N (Takeuchi et al., 2020; Tsai et al., 2018). CHT7 se propone como una proteína de andamiaje que recluta a otros TFs y esto es necesario para reprimir

la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, y la apropiada entrada y salida de la quiescencia en respuesta a la disponibilidad de N (Lin et al., 2022; Takeuchi et al., 2020; Tsai et al., 2018).

En el promotor de *NIT2* (Figura 3.5) se identifican sitios de unión para tres TFs de tipo bZIPs (BLZ8, BLZ2 y Cre16.g692250) y uno de tipo bHLH (NSG17). Estos sitios de unión contienen el motivo G-box (CACGTG), que se propone como necesario para la unión de TFs tanto de tipo bHLH como bZIP en una gran variedad de organismos desde levaduras a humanos. Estos TFs de tipo bHLHs y bZIPs pueden formar homodímeros o heterodímeros, y se ha descrito que estos TFs pueden actuar antagonicamente compitiendo por el mismo sitio de unión (Ezer et al., 2017), lo que aumenta las posibilidades de regulación.

En este contexto, y teniendo en cuenta los patrones de expresión de genes en una estirpe WT cuando se transfiere desde  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , así como la presencia de motivos de unión a TFs, proponemos el siguiente modelo que consta de diferentes etapas y reguladores claves:

1) **BLZ8 como un represor de *NIT2***. En diferentes análisis transcriptómicos realizados en *Chlamydomonas*, cuando se transfiere desde  $\text{NH}_4^+$  a medio sin N, *BLZ8* es un gen de respuesta temprana que disminuye su expresión ( $\approx 15$  minutos) (López García De Lomana et al., 2015; Schmollinger et al., 2014). Nuestros datos (Figura 3.6) también muestran una disminución *BLZ8* en la transición de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , lo que sugiere que las células pasan por un periodo de deficiencia de N hasta que pueden asimilar el  $\text{NO}_3^-$ . Esto, junto con el hecho de que *NIT2* presenta un dominio de unión de BLZ8 en su promotor, nos lleva a sugerir que BLZ8 podría ser un represor de *NIT2*. Puesto que otros genes de la asimilación de N contienen motivos de unión a BLZ8, este podría estar funcionando de la misma manera. Por tanto, la disminución BLZ8 permitiría niveles basales de expresión de ciertos genes. Motivos de unión a BLZ8 lo encontramos en genes para la asimilación de N orgánico (por ejemplo, *LAO1*, *UAPA1* y 6, etc.) y la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (por ejemplo, *NRT2.1* y *NAR2*). En este primer estado transitorio, las células pueden percibir la fuente nitrogenada disponible en el medio. En presencia de  $\text{NO}_3^-$ , su entrada al interior celular activaría *NIT2* y éste regularía positiva o negativamente otros procesos, directa o indirectamente.

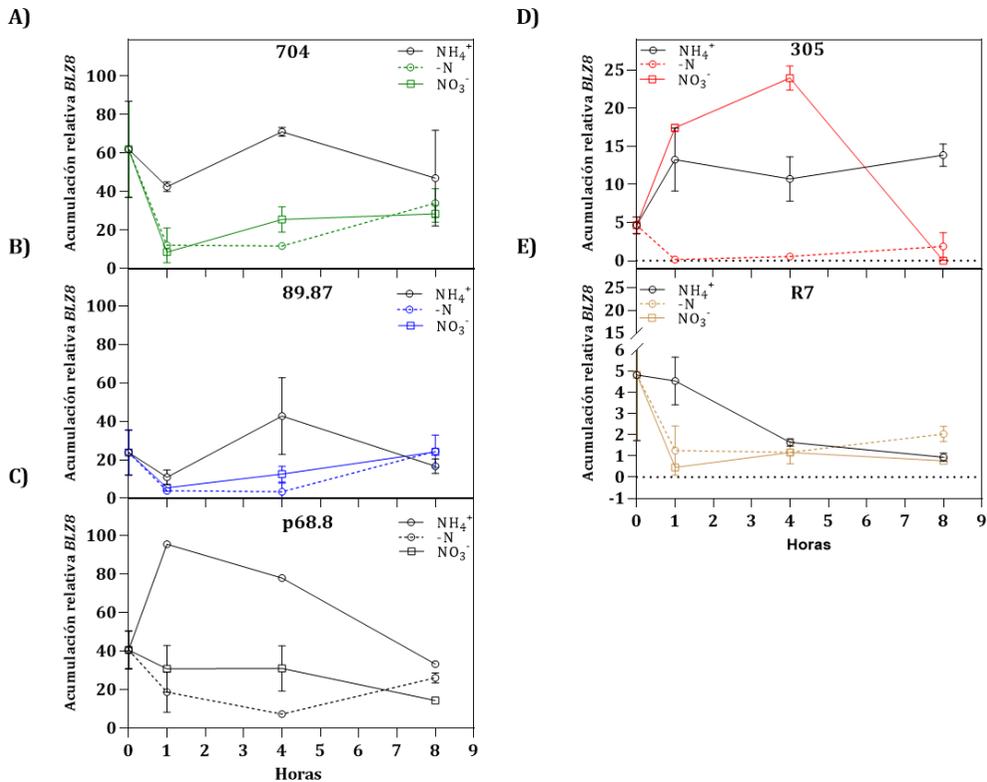
2) **NSG17 como mediador indirecto de *NIT2***. Dos de los procesos que se reprimen en presencia de N inorgánico ( $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$ ) son la asimilación de N orgánico y la gametogénesis. Genes relacionados con el inicio de estos procesos podrían comenzar a inducirse en la transición  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , hasta que el  $\text{NO}_3^-$

empieza a ser sentido/asimilado y vuelven a reprimirse. La cuestión está en qué genes/TFs serían clave para ello. Nuestros análisis indican que 5 de los 9 genes que se regulan negativamente por  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  (tanto en TAP como MM), tienen motivos de unión a NSG17 y sólo uno (*AMT1.1*) tendría motivo de unión a NIT2. Dentro de este grupo de genes cabe destacar la presencia de un TF bZIP (Cre12.g510350) cuya función se desconoce.

Recientemente, NSG17 se ha propuesto como un represor de la asimilación de N orgánico y de la gametogénesis y se ha sugerido un modelo de regulación (Jia et al., 2022). Sin embargo, este modelo parece incompleto ya que se ha realizado sobre los datos transcriptómicos de un mutante *nit1nit2* en  $\text{NH}_4^+$ . Pero además, 1) los niveles de transcrito de NSG17 aumentan cuando no hay  $\text{NH}_4^+$  (Abe et al., 2004) y 2) este aumento depende de NIT2, según nuestros resultados (Figura 3.8). También, parece existir una inter-regulación entre NIT2 y NSG17, sobre la base que el promotor de *NIT2* presenta un motivo de unión a NSG17, lo que sugiere una regulación directa, pero NIT2 parece regular la expresión de *NSG17* de manera indirecta. Por tanto, si NSG17 es un represor en  $\text{NH}_4^+$  independiente de NIT2, ¿cuál es su función dependiente de NIT2?

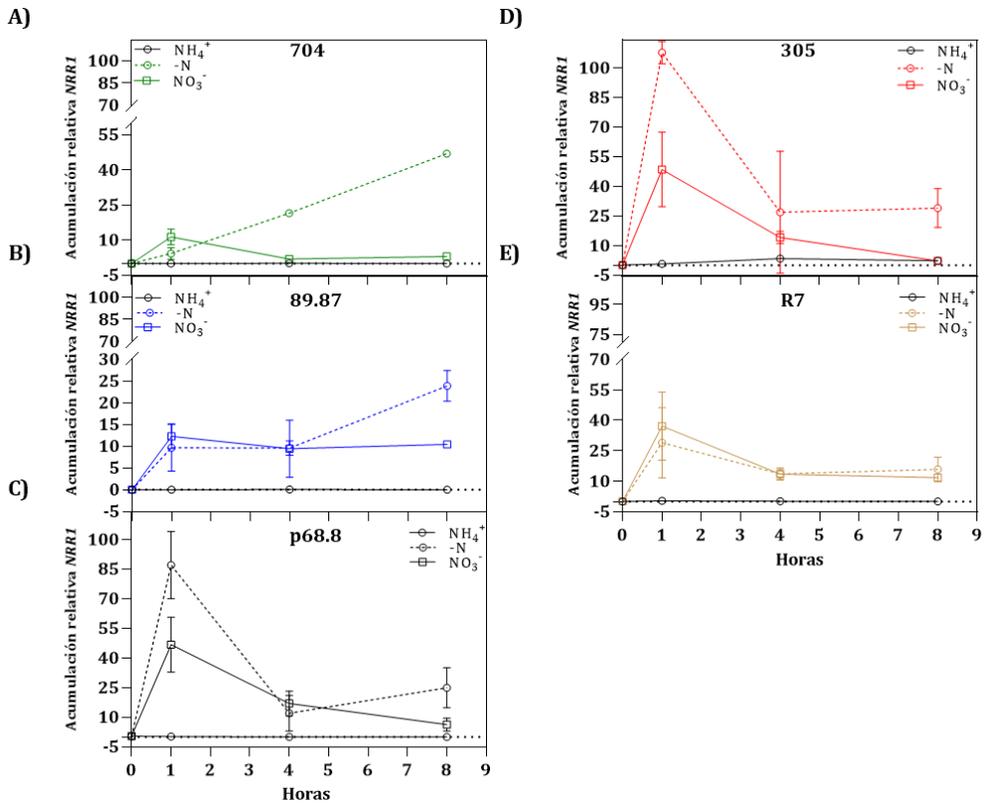
**3) BLZ8, NSG17, NRR1 y bHLH3 son TFs que varían su expresión en respuesta a N en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Para tratar de responder a la pregunta anterior se estudiaron los patrones de expresión en el tiempo de estos TFs en las estirpes WT (*NITNIT2*), 89.87 (*NIT1nit2*), p68.8 (*NIT1nit2::NIT2*), 305 (*nit1NIT2*), y R7 a la que proponemos como *nit1NIT2x*, donde *x* representaría el factor que media la señal negativa de  $\text{NO}_3^-$  para la asimilación de N orgánico y que se ha perdido en el revertiente R7.

*BLZ8* tendría un patrón de expresión que encajaría con un represor de N. Todas las estirpes disminuyen sus niveles de transcrito cuando se transfieren desde  $\text{NH}_4^+$  a medio sin N. También, en todas las estirpes disminuyen sus niveles de transcrito de forma transitoria para luego recuperarse, cuando se transfieren desde  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_4^+$ . Entre las estirpes 305 y R7 sí se observan diferencias en su respuesta, cuando estas estirpes se transfieren desde  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ ; en la estirpe 305 hay una sobreexpresión, pero no en R7 (Figura 3.6).



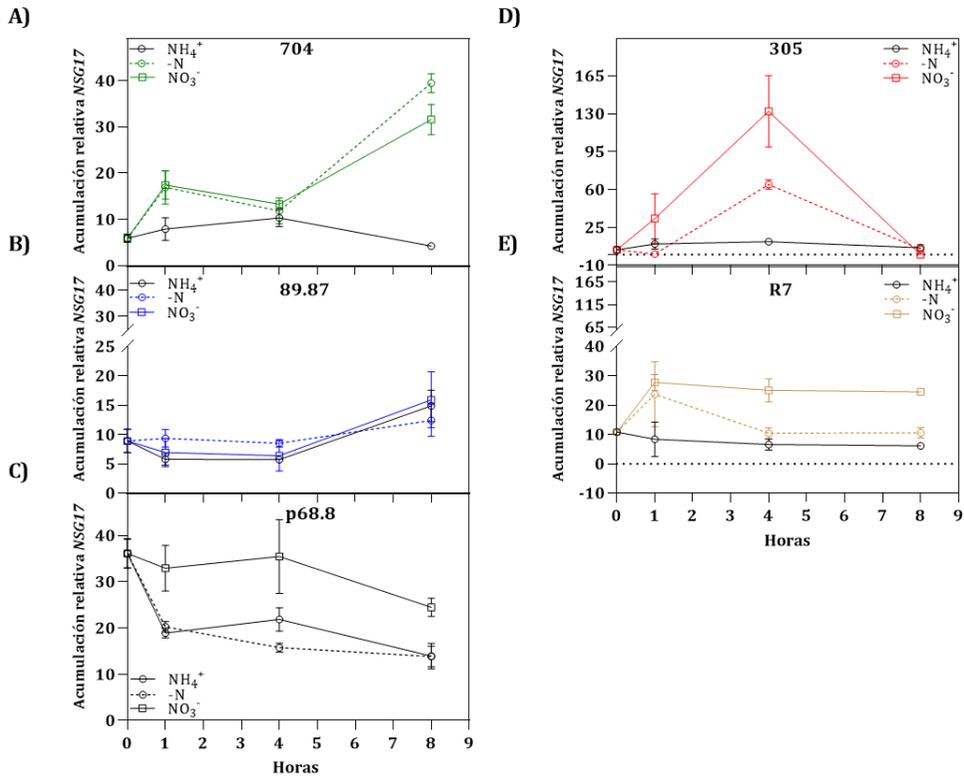
**Figura 3.6. Patrones de expresión de *BLZ8* en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** La cuantificación por RT-PCR se realizó sobre cDNA aislado de las correspondientes estirpes tras la incubación en medios con  $\text{NH}_4^+$  8 mM,  $\text{NO}_3^-$  4 mM o carentes de N. El tiempo 0 corresponde a cultivo inicial antes de la transferencia a los otros medios. Se muestra la expresión relativa con respecto al gen de referencia ubiquitina ligasa (ver Materiales y Métodos). **A)** 704, **B)** 89.87, **C)** p68.8, **D)** 305 y **E)** R7. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

*NRR1* es un gen que se reprime por  $\text{NH}_4^+$  en todas las estirpes analizadas. En la estirpe WT muestra una expresión progresiva en deficiencia de N. Cuando se comparan las demás estirpes, 305, p68.8 y R7 muestran una sobreexpresión de *NRR1* en ausencia de N que se pierde en 89.87 y R7 (Figura 3.7).



**Figura 3.7. Patrones de expresión de *NRR1* en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura 3.6. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

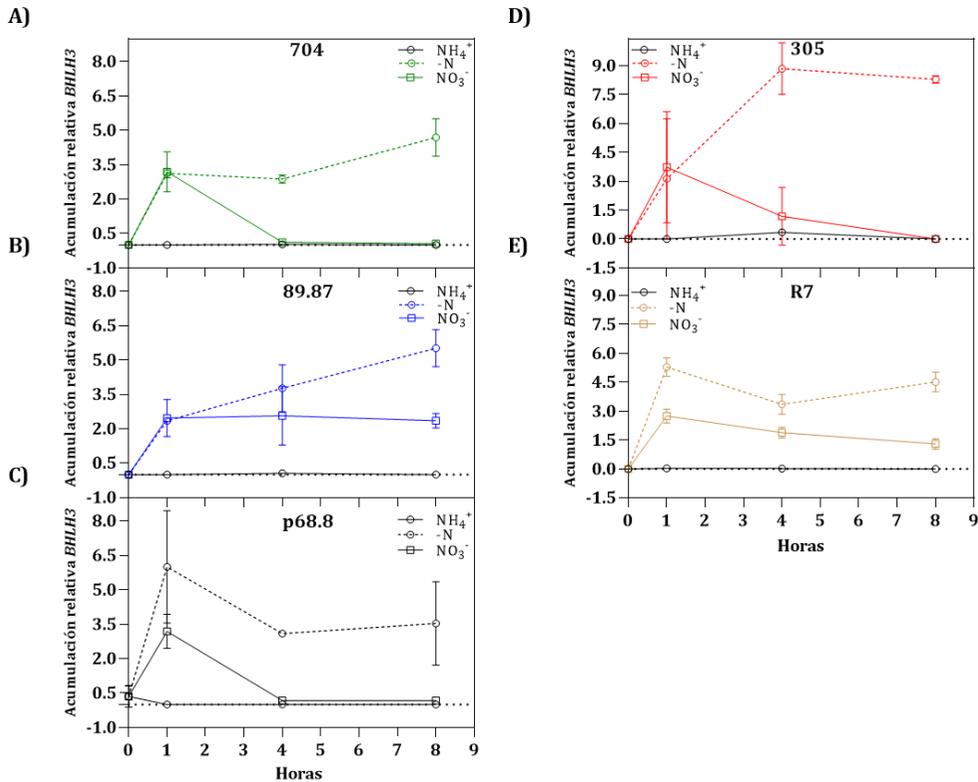
En cuanto a *NSG17*, hay represión por  $\text{NH}_4^+$  en todas las estirpes. En WT hay un aumento progresivo con el tiempo, tanto en deficiencia de N como  $\text{NO}_3^-$ , que se pierde en el mutante 89.87. Cuando se comparan 305 con R7, en ambas hay mayor expresión de *NSG17* en  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3.8).



**Figura 3.8. Patrones de expresión de *NSG17* en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura 3.6. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

Finalmente, *bHLH3* también es un gen que se reprime por  $\text{NH}_4^+$  en todas las estirpes. Además, todas las estirpes muestran mayores niveles de expresión en deficiencia de N que en  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, en  $\text{NO}_3^-$  *bHLH3* muestra un pico de expresión transitoria en WT, p68.8 y 305 pero ese pico se mantiene en 89.87 y R7 (Figura 3.9).

Es interesante resaltar que el promotor de *bHLH3* presenta motivos de unión a NIT2 y NSG17 y por tanto se podría proponer como un mediador directo de ambos. Si *bHLH3*, junto con NSG17 regula la asimilación de N orgánico, como represor o activador, estaría por determinar.



**Figura 3.9. Patrones de expresión de *bHLH3* en respuesta a nitrógeno en diferentes estirpes de *Chlamydomonas*.** Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura 3.6. Las barras de error representan  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

4) **TFs relacionados con la acumulación lípidos.** La deficiencia de N se usa como un procedimiento general para inducir la acumulación de TAG en algas. La búsqueda de un “master regulator” o “lipid trigger” ha sido un reto en este campo de investigación y debido a su aplicación con fines biotecnológicos. De entre los posibles TFs que regulan la acumulación de lípidos y que se regulan por N solo algunos de ellos han sido experimentalmente validados (Tabla 3.1).

Uno de los primeros constituyó una patente para aumentar la acumulación de TAG en algas (Yohn, Mendez, Behnke, & Brand, 2011). En este caso, se propuso a un regulador (Cre14.g624800) cuya sobreexpresión daba lugar a una sobreacumulación de lípidos y viceversa, su silenciamiento mediante RNAi disminuía el contenido en TAG.

Las técnicas de RNAseq han permitido identificar enzimas y reguladores que activan las rutas para la síntesis de TAG tras la deficiencia de N. Uno de los primeros genes identificados fue NRR1 (*Nitrogen Response Regulator 1*), que

regulaba la expresión de genes de la síntesis de lípidos (ejemplo *DGAT1*). El correspondiente mutante *nnr1* acumulaba un 50% menos de TAG en respuesta a la falta de N, específicamente.

Posteriormente, se han identificado otros TFs que tienen un papel en la acumulación de TAG. *ROC40* (*Rhythm Of Chloroplast 40*) que codifica un TF tipo MYB (Goncalves et al., 2016). PSR1 es un regulador central para el almacenamiento de carbono y energía en respuesta a deficiencia de P. La sobreexpresión de PSR1 no sólo conlleva a la acumulación de TAG sino también de almidón (Bajhaiya et al., 2016).

El uso de la genética inversa ha permitido identificar un mutante deficiente en un TF tipo MYB al que se ha denominado LRR1 (*Lipid Remodeling Regulator 1*). El correspondiente mutante muestra una disminución en la acumulación de TAG y SQDG tras la deficiencia de P (Hidayati et al., 2019). CHT7 también fue identificado mediante genética inversa, en este caso tras la búsqueda de genes implicados en la entrada y salida del periodo de quiescencia en *Chlamydomonas*. El mutante *cht7* está retrasado para salir del periodo de quiescencia y degradar TAG (Tsai et al., 2014).

La respuesta a estrés es otra estrategia empleada para identificar elementos reguladores en la síntesis de lípidos (salinidad, temperatura o drogas como la tunicamicina). Esto ha permitido identificar recientemente a bZIP1 (BLZ2) (Yamaoka et al., 2019). bZIP1(BLZ2) regula el metabolismo a través de la activación directa de DGTS y la síntesis de ácido linolénico.

Nuestros datos del Capítulo 2 muestran que  $\text{NO}_3^-/\text{NIT2}$  regula la acumulación de lípidos, pero también los datos de transcriptómica indican que NIT2 regula algunos de los genes recogidos en la Tabla 3.1. NIT2 activa la expresión del regulador Cre14.g624800, además, este gen está dentro del núcleo de genes que se activan tanto en condiciones mixotróficas como autotróficas y presenta motivos de unión a NIT2 y NSG17, lo que sugiere una activación directa. También regula positivamente a *BLZ2* (en TAP) y *PSR1* (en MM) y negativamente *ROC40* (en MM).

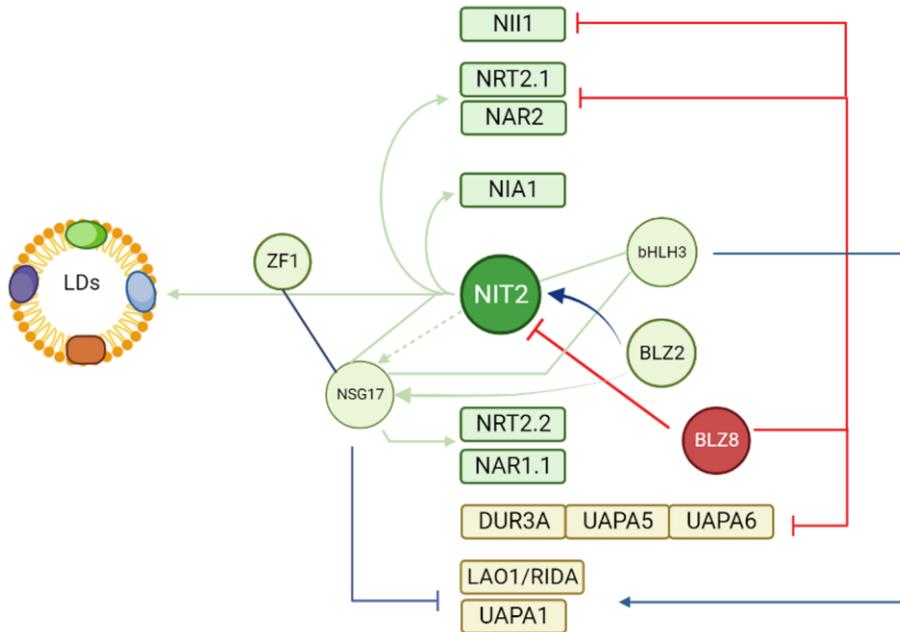
El modelo de regulación en bucle que se propone para NIT2 abre posibilidades a futuras investigaciones para entender cómo se regulan rutas metabólicas en *Chlamydomonas* y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Es decir, ¿es mejor sobreexpresar/silenciar un determinado TF en una estirpe WT para que acumule lípidos o tipo de lípido?, o, ¿es mejor utilizar un mutante *nit2* para sacarlo de este bucle de regulación?

**Tabla 3.1 Factores de transcripción que regulan la acumulación de lípidos en *Chlamydomonas***

Gen / ID	Nombre/Anotación	Referencias
<i>NRR1</i> Cre16.g673250	Nitrogen Response Regulator1	(Boyle et al.,2012)
<i>ZF1</i> Cre14.g624800	A stress-related regulator	<a href="https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011097261">https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011097261</a>
<i>PSR1</i> Cre12.g495100	Phosphate Starvation Response 1	(Bajhaiya et al., 2016)
<i>BZIP1 (BLZ2)</i> Cre05.g23820	Basic leucine ZIPper 1 (bZIP1) transcription factor	(Yamaoka et al., 2019)
ROC40 Cre06.g275350	Rhythm Of Chloroplast 40/MYBrelated transcription factor	(Goncalves et al., 2016)
LRL1 Cre03.g197100	Lipid Remodeling Regulator 1: an R2R3-MYB type TF	(Hidayati et al., 2019)
<i>CGL19</i> Cre12.g52110	Dof-type transcription factor	(Ibañez-Salazar et al., 2014)
CHT7 Cre11.g481800	Compromised Hydrolysis of TAG7/a CXC domain DNA binding protein	(Tsai et al., 2014)

Finalmente, en la Figura 3.10 se resume un modelo de regulación para la asimilación de N en *Chlamydomonas*. Cuando una estirpe WT se transfiere de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  habría una primera fase de deficiencia de N en la que disminuiría la expresión del represor BLZ8 y permitiría ciertos niveles de expresión de *NRT2.1*, *NAR2*, *NI11* y el propio *NIT2* (dentro de genes claves para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ ) y *DUR3A*, *UAPA5*, *UAPA6* (para el *scavenger* de N orgánico). La entrada de  $\text{NO}_3^-$  al interior celular estaría ahora favorecida por la actividad del sistema I de transporte *NRT2.1/NAR2* que es de alta afinidad y biespecífico de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  y considerado también como un sensor de  $\text{NO}_3^-$  (Llamas et al., 2002; Rexach et al., 2002) El aumento intracelular de  $\text{NO}_3^-$  llevaría a un segundo nivel en que *NIT2* es más activo y llevaría a mayores niveles de expresión de los genes antes citados para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (*NI11*, *NRT2.1*, *NAR2*) pero ahora además de *NIT1*, *NRT2.2* y *NAR1.1*. El hecho que *bHLH3* presente motivos de unión de *NIT2* y *NSG17* y además una expresión transitoria en  $\text{NO}_3^-$  y que es dependiente de *NIT2*, hace de *bHLH3* un buen candidato para regular la asimilación de N orgánico. También *NSG17* podría estar mediando acciones indirectas de *NIT2* y hasta ahora el único propuesto como represor de la gametogénesis y asimilación de N orgánico (Jia et al., 2022). Es interesante destacar el bucle de regulación de los

genes regulados por N como NIT2, NSG17, bHLH3, bLZ2 y BLZ8. En el esquema también se muestran aquellos TF que son regulados por NIT2 y que se han mostrado que tienen una regulación en el metabolismo de lípidos.



**Figura 3.10. Modelo de regulación para la asimilación de N en *Chlamydomonas* y acumulación de lípidos.** En círculos se indica los TFs y en cuadrados las enzimas o transportadores que participan en el metabolismo del N. Las líneas continuas indican una regulación directa, es decir la presencia de motivos de unión para ese TF. Las líneas discontinuas indican una regulación indirecta. En rojo se muestra la inhibición, en verde la activación y en azul, podría ser activación o inhibición.

## **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**

---



# CONCLUSIONES

---

1. Los mutantes *nii1* no crecen en  $\text{NO}_3^-$  ni en  $\text{NO}_2^-$ , pero pueden reducirlos hasta  $\text{N}_2\text{O}$  y constituyen una buena herramienta para los estudios de desasimilación hasta  $\text{N}_2\text{O}$  en el alga *Chlamydomonas*.
2. El complejo NR-ARC reduce  $\text{NO}_2^-$  a NO en el citoplasma, y constituye la principal fuente de sustrato para la producción de  $\text{N}_2\text{O}$ , tanto en luz como en oscuridad.
3. La reducción desde NO hasta  $\text{N}_2\text{O}$  se lleva a cabo por dos NO-reductasas, FLV en el cloroplasto y CYP55 en la mitocondria. Ambas son necesarias para emitir altas cantidades de  $\text{N}_2\text{O}$  tanto en la luz como en la oscuridad.
4. En una estirpe WT, la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  es baja debido a que la asimilación de  $\text{NO}_2^-$  funciona correctamente y el  $\text{NO}_2^-$  apenas se acumula. Sin embargo, la deficiencia de NIT2, lleva a una menor producción, ya que este factor de transcripción controla tanto la entrada de  $\text{NO}_2^-$  a la célula, como la acumulación de la NR y CYP55.
5. El NO, generado a partir de  $\text{NO}_2^-$  en las estirpes que carecen de la NiR, parece afectar la fijación de  $\text{CO}_2$  aumentando las emisiones de este gas.
6. Dado que tanto FLV como CYP55 son necesarias para las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , en luz y oscuridad, se propone que mitocondria (CYP55) y cloroplasto (FLV) deben tener un acoplamiento para mantener estas emisiones.
7. El  $\text{NO}_3^-$  como una señal independiente de su asimilación y mediada por NIT2 estaría regulando los siguientes procesos en *Chlamydomonas*:
  - Inhibe la diferenciación de células vegetativas a gametos.
  - Protege de la actividad fotosintética manteniendo no solo los niveles de clorofila y de carotenoides sino también los niveles de DGDG.
  - Protege la actividad fotosintética, favoreciendo la fijación de  $\text{CO}_2$  y la síntesis de almidón en vez de TAG.
  - Inhibe la asimilación de fuentes orgánicas de nitrógeno (aminoácidos, urea, úrico).
8. La inhibición por  $\text{NO}_3^-$  sobre la asimilación de nitrógeno orgánico estaría mediada por un componente, aún por identificar, que estaría regulado por NIT2.
9. El análisis de datos transcriptómicos de diferentes estirpes en presencia de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , ha permitido identificar a NSG17 como un factor de transcripción regulado por NIT2, así como proponer un modelo de regulación que involucra los factores de transcripción NIT2, NSG17, bHLH3, bLZ2 y BLZ8.



# CONCLUSIONS

---

1. The *nii1* mutants do not grow on  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  but can reduce them to  $\text{N}_2\text{O}$  and are a good tool to study  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  dissimilation to  $\text{N}_2\text{O}$  in the alga *Chlamydomonas*.

2. The NR-ARC complex reduces  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{NO}$  in the cytoplasm and is the main source of substrate for  $\text{N}_2\text{O}$  production in both light and dark conditions.

3. The reduction from  $\text{NO}$  to  $\text{N}_2\text{O}$  is carried out by two  $\text{NO}$ -reductases, FLV in the chloroplast and CYP55 in the mitochondrion. Both are required to synthesize and release high amounts of  $\text{N}_2\text{O}$  in both light and dark.

4. In a WT strain,  $\text{N}_2\text{O}$  production is low because  $\text{NO}_2^-$  assimilation functions properly and  $\text{NO}_2^-$  barely accumulates. However, NIT2 deficiency leads to lower production, as this transcription factor controls both the entry of  $\text{NO}_2^-$  into the cell and the accumulation of NR and CYP55.

5.  $\text{NO}$ , generated from  $\text{NO}_2^-$  in strains lacking NiR, appears to affect  $\text{CO}_2$  fixation by increasing  $\text{CO}_2$  emissions.

6. Since both FLV and CYP55 are required for  $\text{N}_2\text{O}$  emissions, in light and dark, it is proposed that mitochondria (CYP55) and chloroplasts (FLV) must be coupled to maintain these emissions.

7. Besides its role as nutrient,  $\text{NO}_3^-$  also acts as a cellular signal that regulates, in a NIT2-dependent way, numerous processes in *Chlamydomonas*. Here we have shown that nitrate:

- Inhibits the differentiation of vegetative cells into gametes.
- Protects photosynthetic activity by maintaining not only chlorophyll and carotenoid levels but also DGDG levels.
- Protects photosynthetic activity, favouring  $\text{CO}_2$  fixation and starch synthesis instead of TAG.
- Inhibits the assimilation of organic nitrogen sources (amino acids, urea, uric acid).

8. The inhibition of organic nitrogen assimilation by  $\text{NO}_3^-$  would be mediated by a component, yet to be identified, which would be regulated by NIT2.

9. The analysis of transcriptomic data from different strains in the presence of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  has allowed us to identify NSG17 as a transcription factor

regulated by NIT2, as well as to propose a regulatory model involving the transcription factors NIT2, NSG17, bHLH3, bLZ2 and BLZ8.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Material biológico. Estirpes de *Chlamydomonas*

Las estirpes de *Chlamydomonas* utilizadas para llevar a cabo esta tesis doctoral se muestran a continuación (Tabla MM.1)

Tabla MM.1. Estirpes de *Chlamydomonas*.

Estirpe	Genotipo para la asimilación de nitrógeno	Fenotipo para la asimilación de nitrógeno	Ref
704	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>-</sup> pNIA1:ARS <sup>+</sup>	WT	1
89.87	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> pNIA1:ARS <sup>+</sup> nit2 <sup>-</sup>	Nit <sup>-</sup>	2
p68.8	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> pNIA1:ARS <sup>+</sup> nit2 <sup>-</sup> pMN68	Nit <sup>+</sup>	
6145c	mt <sup>+</sup> WT	WT	3
CMJ030	nit1nit2	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	4
21gr	mt <sup>+</sup> WT	WT	5
137c (+)	mt <sup>+</sup> nia1 nit2	Nit <sup>-</sup>	5
137c (-)	mt <sup>-</sup> nia1 nit2	Nit <sup>-</sup>	5
305 (-)	mt <sup>-</sup> nia1	Nit <sup>-</sup>	3
cw15305 (+)	cw mt <sup>+</sup> nia1	Nit <sup>-</sup>	*
R5	mt <sup>-</sup> nia1	Nit <sup>-</sup>	*
R7	mt <sup>-</sup> nia1	Nit <sup>-</sup>	*
R9	mt <sup>-</sup> nia1	Nit <sup>-</sup>	*
R10	mt <sup>-</sup> nia1	Nit <sup>-</sup>	*
LMJ.RY0402.2 55418	nit1 nit2 arc	Nit <sup>-</sup>	*
LMJ.RY0402.0 52321	nit1 nit2 flv	Nit <sup>-</sup>	6
LMJ.RY0402.1 77695	nit1 nit2 cyp55	Nit <sup>-</sup>	6
M3	mt <sup>+</sup> Δ (NII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIT1,:::(NRT2.1,NAR2)	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	4/7
M3arc	Δ (NII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIT1, ::(NRT2.1,NAR2),arc	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	4
M3flv	Δ (NII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIT1, ::(NRT2.1,NAR2),flv	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	*
M3cyp55	Δ (NII1, NIT1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIT1, ::(NRT2.1,NAR2),cyp55	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	*
M4	Δ(NII1, NIA1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)::NIA1	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	7
G1	Δ(NII1, NIA1, NRT2.2, NRT2.1, NAR2)	Nit <sup>-</sup> Nii <sup>-</sup>	4

Nit, crecimiento en NO<sub>3</sub>; Nii, crecimiento en NO<sub>2</sub>; \*, publicado en esta tesis; cw, cell wall o pared celular. [1](Loppes et al., 1999)[2] (Camargo et al., 2007), [3] (Fernández and Matagne, 1986) [4] (Bellido-Pedraza et al., 2022) [5] (Pröschold et al., 2005) [6] (Burlacot et al., 2020) [7] (Navarro et al., 2000).

Las estirpes se mantuvieron en placas Petri con medio TAP amonio (TA) con agar al 1,6% (2.2.1) y eran refrescadas aproximadamente cada 2 meses.

## 2. Medios de cultivo de *Chlamydomonas*

### 2.1. Soluciones stocks para preparar los medios de cultivo

Para preparar los diferentes medios de cultivo, usamos las siguientes soluciones *stocks* descritas en (Harris, 2009):

**Solución TRIS (2M):** 242 g/L TRIS.

**Solución A:** 5 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

**Solución A-N:** 5 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

**Solución B:** 115 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 46 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

**Solución de Elementos Traza:** 50 g EDTA (libre de ácido), 11,4 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 22 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,1 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,214 g  $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Para preparar 1 L de trazas, el EDTA se disuelve en 250 mL de agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ). Seguidamente, 550 mL de agua se calientan hasta 100 °C y se le añaden las sales en el orden citado. Una vez disueltas, las dos soluciones se mezclan y cuando la temperatura oscilaba entre los 80-90 °C se ajusta el pH con KOH hasta 6,8. Se enrasa hasta 1 L y se deposita en una botella de vidrio ámbar. En dicha botella, en oscuridad y a temperatura ambiente, la solución se deja reposar durante dos días antes de su utilización.

### 2.2. Medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP)

El medio TAP estándar contiene amonio (TA) y se prepara usando:

**Solución Tris:** 10 mL/L

**Solución A:** 10 mL/L

**Solución B:** 1 mL/L

**Solución de Elementos Traza:** 1 mL/L

**Ácido acético glacial** (Panreac): 0,95 mL/L

El medio TAP sin nitrógeno (T-N) se preparó de la misma forma que el medio TA pero cambiando la solución A por la A-N. Este medio sin nitrógeno es la base para preparar medios con otras fuentes de N orgánico e inorgánico como aminoácidos,  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$ , los cuales se añaden después de que el medio se haya esterilizado en el autoclave.

### 2.3. Medio Mínimo (MM)

El Medio Mínimo estándar contiene amonio (MA) y se prepara usando:

**Solución A:** 10 mL/L

**Solución B:** 1 mL/L

**Solución de Elementos Traza:** 1 mL/L

El medio MM sin nitrógeno (M-N), se prepara de la misma manera que el MA pero añadiendo la solución A-N en lugar de la solución A. Al igual que se ha descrito para el medio TAP, este medio se utiliza cuando se requieren usar diferentes fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico como aminoácidos,  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$ , las cuales se añadieron después de la esterilización del M-N. Los experimentos en medio mínimo fueron burbujeados con una mezcla de aire y  $\text{CO}_2$  al 5%.

### 2.4. Medio de Sueoka (HSM)

Para preparar el medio Sueoka se utilizaron las siguientes soluciones *stocks* descritas a continuación:

El HSM estándar contiene amonio y se prepara usando:

**Solución A:** 5 mL/L

**Tampón fosfato:** 5 mL/L

**Solución de Elementos Traza:** 1 mL/L

Para preparar la Solución A utilizamos por litro: 100 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Para preparar el tampón fosfato utilizábamos 288 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 144 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La solución de elementos trazas que utilizamos es la misma que se ha citado anteriormente.

Cuando preparamos el medio Sueoka sin nitrógeno (-N) se utilizó la misma solución A pero sin  $\text{NH}_4^+\text{Cl}^-$ .

Todos los medios descritos se esterilizaron en el autoclave. Para el caso de medios con ácido úrico, este se añadió al medio antes de la esterilización por autoclave. Sin embargo, para la preparación de medios con  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , aminoácidos y urea, estos fueron esterilizados por filtración (filtros con tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{M}$ ) y añadidos tras la esterilización del medio. Todos los aminoácidos, el ácido úrico y la urea fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH (Madrid, España). Para la preparación de medios de cultivo sólidos se añadió bacto™ agar 1,6% (p/v).

## 2.5. Condiciones de cultivo

Antes de comenzar los experimentos, las estirpes de *Chlamydomonas* mantenidas en medio sólido (TA) se inocularon en matraces de vidrio de 100 mL añadiendo 50 mL de medio TA líquido, con luz ( $\approx 80 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y agitación continua a 23 °C durante dos días. Estos pre-inóculos se utilizaron para inocular los medios con los que se llevarían a cabo los experimentos. Para determinar la cantidad de cultivo a usar en los experimentos se midió bien la absorbancia a 750 nm ( $A_{750}$ ), el número de células por mL, o la cantidad de clorofila. Una vez tomada la cantidad de cultivo necesaria se centrifugó durante 2 minutos a 3,000  $\times g$ . El pellet se resuspendió en medio sin nitrógeno y se repitió este paso 2 veces para retirar completamente el nitrógeno. El pellet se resuspendió en medio sin nitrógeno y se añadió a los medios con las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico especificadas en cada caso.

Para llevar a cabo los test de crecimiento en **medio sólido**, se preparó el medio de cultivo sin N con agar, se autoclavó y cuando estaba a una temperatura aproximada de 50-60 °C se le añadieron los aminoácidos a la concentración requerida. Para realizar el test de gota, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de un cultivo de células que había sido lavado en medio sin N. Las placas se incubaron en luz continua ( $\approx 80 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y una temperatura de 23 °C durante 7 días.

## 3. Cuantificación del crecimiento de los cultivos de *Chlamydomonas*

### 3.1. Determinación de absorbancia

La densidad celular de los cultivos de *Chlamydomonas* se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 750 nm ( $A_{750}$ ), la cual correlaciona bien con la densidad celular del cultivo cuando este tiene entre  $2,5 \cdot 10^5$  y  $5 \cdot 10^6$  células/mL (Kou et al., 2013)

### 3.2. Cuantificación de células de *Chlamydomonas*

Para cuantificar el número de células/mL, utilizamos dos tipos de contadores: el Microcell-counter Sysmex F-500, en el que 50-100  $\mu\text{L}$  de cultivo se mezclan con 10 mL de un tampón salino comercial (CellPack 834-0011-6) para el conteo, y el contador automático Countess™ 3 de Invitrogen, que permite cuantificar el número de células usando volúmenes de 10-15  $\mu\text{L}$  de cultivo.

### 3.3. Cuantificación de la clorofila

Para la cuantificación de la clorofila total se centrifugó 1 mL de cultivo durante 1 minuto a 13,000 x *g*. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 mL de etanol absoluto. Las muestras se centrifugaron durante 1,5 minutos y la clorofila presente en el sobrenadante se cuantificó en el espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a las longitudes de onda 665 y 649 para medir la clorofila total de acuerdo con la fórmula propuesta por (Arnon, 1949):

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/dL}) = (6,1 \cdot A_{665}) + (20,4 \cdot A_{649})$$

### 4. Cruces genéticos *Chlamydomonas*

Para llevar a cabo los cruces genéticos, utilizamos el método descrito por Jiang and Stern, 2009. Estirpes con diferentes “mating type” (mt<sup>+</sup> y mt<sup>-</sup>) se crecieron en TA. Una vez en fase exponencial, fueron transferidas a un medio sin N y expuestas a una alta intensidad lumínica durante 16 h. Después de esto, se mezclaron 1 mL de cada uno de los cultivos y se mantuvieron a alta luz durante 2 h. La aparición de un velo en la superficie evidencia que las células se han cruzado muy eficientemente. De esta mezcla de 2 mL que contiene los cigotos formados por la fusión de dos células vegetativas se transfirieron 500  $\mu\text{L}$  a placas de MA con agar al 4% donde se incubaron bajo luz continua durante 18 h. Pasado este tiempo, las placas se incubaron en la oscuridad para la maduración de los cigotos. Pasados seis días, las placas se trataron con vapores de cloroformo (Emsure<sup>®</sup>) para eliminar las células vegetativas. Posteriormente, se cortó un pequeño bloque de agar que contuviese alrededor de 80 cigotos y estos pequeños bloques se transfirieron a una nueva placa con 1,6% de agar y medio TA. En la parte superior de este bloque, se añadió 100  $\mu\text{L}$  de TA líquido para favorecer la germinación. Las placas son incubadas en la cámara de cultivo durante 16 h en presencia de luz. Para esparcir las células vegetativas por toda la placa se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de medio líquido y las células se repartieron por la placa con un asa de siembra. Seguidamente, las placas se incubaron en la cámara de cultivo durante una semana en condiciones estándar.

## 5. Ensayos bioquímicos

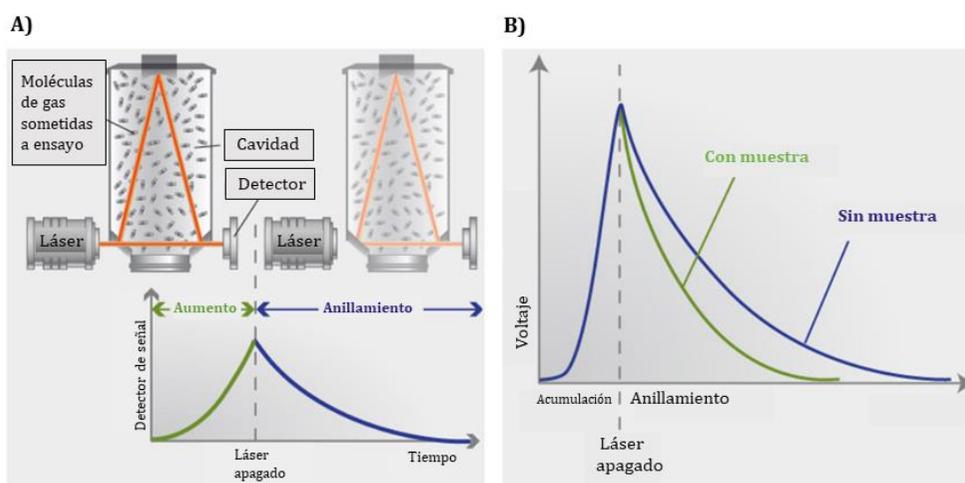
### 5.1. Determinación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

La concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el sobrenadante se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el mismo método que (Giustarini et al., 2008).

Para la preparación del reactivo de trabajo se mezcló el mismo volumen de 10 g/L de sulfanilamida (SIGMA, S9251), disuelto en 2,4 N HCl (Panreac\_Applichen 141020.1611), y 200 mg/L N-(1-naftil) etilendiamino diclorohidrato (MP Biomedicals, LLC, 152549) disuelto en dH<sub>2</sub>O. Para llevar a cabo la determinación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se tomaron 75 µL de muestra y se incubaron con 150 µL del reactivo de trabajo durante 2 minutos. La reacción se llevó a cabo directamente en placas de 96 pocillos y seguidamente se midió la absorbancia a 540 utilizando el lector de microplacas (iMark, Bio-Rad).

## 5.2. Cuantificación de N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>

El N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> fueron cuantificados simultáneamente utilizando espectroscopía de absorción láser intensificada por cavidades ópticas (*Cavity Ring-Down Spectroscopy*, CRDS) utilizando el analizador PICARRO G2508, ([www.picarro.com](http://www.picarro.com)) (Christiansen et al., 2015). Para llevar a cabo nuestros experimentos, usamos botellas de 1 L (DURAN™) que fueron selladas herméticamente con tapones de rosca (DWK Life Sciences GL 45 con 2 ó 3 conectores).



**MM1. Tecnología CRDS del analizador Picarro.** **A)** Ilustración de la cavidad del equipo donde se acumula el gas y absorbe la luz láser. En un primer momento se enciende el láser, aumentando la señal en el detector. Una vez se apaga el láser, la señal captada por el detector disminuirá con el tiempo. **B)** Este decaimiento en la señal dependerá de la capacidad de absorción que tenga el gas para ese láser concreto.

En las botellas, se añadían 250 mL de medio del cultivo líquido y 750 mL de espacio de cabeza (fase gaseosa). El analizador CRDS se conectaba a la botella a través de una combinación de tubos de teflón de entrada y salida (2,5 metros de longitud). El tubo de salida extraía la muestra del espacio de cabeza de la botella (0,3 L/min), y el tubo de entrada, que se conectaba a una bamba de vacío y al que se le añadía un filtro (Millipore Millex Hidrofilico PVDF 0,22  $\mu\text{m}$ ) devolvía la muestra a la fase gaseosa de la botella después de pasar por el analizador. Los cultivos se mantenían durante 24 h.

### 5.3. Determinación de NO

Los cultivos celulares se incubaron en presencia de 2  $\mu\text{M}$  de DAF-FM (4,5-Diaminofluoresceína, (INVITROGEN) durante 1 h. Las medidas se hicieron por triplicado, usando 200  $\mu\text{L}$  de cultivo que se transfirieron a placas de 96 pocillos negras y opacas (OptiPlate Black Opaque 96-well Microplate, PerkinElmer). La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro Varioskan Lux (Thermo Scientific) a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 515 nm, respectivamente.

### 5.4. Determinación de O<sub>2</sub>

Para medir el O<sub>2</sub> se utilizaban botes de 125 mL cerrados herméticamente donde se añadían 31,25 mL de medio de cultivo líquido y 93,75 mL de espacio de cabeza gaseosos (misma proporción que la usada en los experimentos con el analizador PICARRO). De ese espacio de cabeza, se tomaban muestras para medir la concentración de O<sub>2</sub> y utilizando una jeringa Hamilton (Hamilton SampleLock™, #81356) se inyectaban manualmente 250  $\mu\text{L}$  en el Cromatógrafo de Gases (Agilent 7820A, Agilent Technologies).

Para conocer la concentración de O<sub>2</sub> utilizamos una columna empaquetada (60/80 Molecular Sieve 5A, Ref.13133-U Supelco) a 75 °C y se detectaba utilizando un Detector de Conductividad Térmica. El gas transportador que se utilizó fue Argón (Fakhimi et al., 2019).

La fórmula utilizada para calcular la concentración de O<sub>2</sub> fue la siguiente:

$$\text{O}_2 = (\text{Valor de O}_2 \times 4 \times \text{Espacio de cabeza (mL)}) / 1000 \times (250 / (\text{H}_2 + \text{O}_2 + \text{N}_2))$$

### 5.5. Determinación de urea

Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de la urea utilizamos el kit comercial Cromatest. El principio de este método (Tietz,1995) se basa en la reacción de la urea presente en la muestra con el o-ftalaldehído en medio ácido dando lugar a un compuesto coloreado (isoindolina) cuya absorbancia fue determinada a 540 nm utilizando el lector de microplacas de 96 pocillos iMark™Bio-Rad. La intensidad del color es proporcional a la concentración de urea que está presente en la muestra. Para llevar a cabo el ensayo se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante, a los que se añadieron 1 mL del reactivo R1 (o-ftalaldehído) y 1 mL del reactivo R2 (solución de borato).

### 5.6. Determinación de úrico

Para la determinación cuantitativa de ácido úrico se empleó el kit comercial colorimétrico Uricasa-POD (Chemelex). El principio de este método (Tietz, 1995) se basa en la reacción de oxidación del ácido úrico por la enzima uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno. La enzima peroxidasa (POD) utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar el cromógeno 4-aminofenazona (4-AF) y diclorofenol sulfonato (DCPS) para formar un compuesto rosáceo (quinonaimina). La absorbancia de la quinonaimina se determinó a 540 nm en el lector de microplacas de 96 pocillos iMark™Bio-Rad. Para el ensayo, 25  $\mu$ L de sobrenadante se mezclaron con 1 mL de reactivo de trabajo, compuesto por la mezcla del R1 (Reactivo tampón: fosfatos pH 7,4 y 2-4 diclorofenol sulfonato) y R2 (Reactivo enzimático: uricasa, peroxidasa, ascorbato oxidasa y 4-aminifenazona (4-AF)). La intensidad de la quinonaimina es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en el medio.

### 5.7. Determinación de almidón

La determinación enzimática del almidón se llevó a cabo según una variación del método descrito por (Klein and Betz, 1978) Para la extracción se tomaron 2 mL de cultivo que se centrifugaron durante 2 minutos x 3,000 *g*. El pellet se resuspendió en 2 mL de etanol puro para extraer la clorofila. Después, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos x 15,000 *g*. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se añadieron 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril y las muestras se sonicaron usando 2-3 ciclos de 10 segundos de sonicado y 10 segundos de descanso con pulsos de

una amplificación del 20%, usando el sonicador BRANSON SLPE 40:40:15:4C. Seguidamente, autoclavamos las muestras durante 20 minutos a 121 °C para que se produjera la gelatinización y solubilización del almidón. Una vez autoclavadas, las muestras se centrifugaron durante 30 segundos x 15,000 *g*. Seguidamente, se añadieron 200 µL de una mezcla enzimática que contiene acetato de Sodio 100 mM, 2,25 U/mL de amiloglucosidasa (10115, SIGMA-ALDRICH), y 2,25 U/mL de α-amilasa (A9857, SIGMA-ALDRICH). Posteriormente, incubamos las muestras a 55 °C durante 2 h para que se produzca la hidrólisis completa del almidón. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos x 15,000 *g* y se tomaron 10-20 µL del sobrenadante para determinar la glucosa liberada con la degradación del almidón. La glucosa fue cuantificada espectrofotométricamente en un lector de placas de 96 pocillos iMark™Bio-Rad utilizando un kit colorimétrico comercial (SPINREACT). Este kit se basa en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD), que produce una quinona cuya absorbancia puede ser determinada entre 490-550 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en el medio.

### **5.8. Determinación de la composición elemental**

El análisis de la composición elemental se llevó a cabo en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla Celestino Mutis. Para ello se utilizó el analizador elemental LECO TRUSPEC CHNS MICRO y se analizaron la concentración en % de C, N, H y S. Para ello, se utilizaron 10 mg de pellet liofilizado de diferentes cultivos celulares. La liofilización del pellet celular se llevó a cabo en las instalaciones del SCAI de la Universidad de Córdoba.

### **6. Determinación de los parámetros fotosintéticos Fv/Fm, ETR y NPQ**

Para determinar los diferentes parámetros fotosintéticos se utilizó 1 mL de cultivo, en placas de 24 pocillos (WVR®), aclimatado durante 15 minutos en la oscuridad y a una temperatura de 24-25 °C. El equipo que utilizamos fue IMAGING PAM (serie M, versión Maxi, Heinz Walz GmbH) y los resultados fueron analizados con el software ImagingWin.

Para determinar la fluorescencia basal (F<sub>o</sub>) empleamos una luz LED a 450 nm y a pulsos (Measure Light, ML) de una intensidad de 0,5 µmol fotones · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>. Para determinar la fluorescencia máxima (F<sub>m</sub>) el equipo emplea pulsos de

luz saturante a  $2,700 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durante 0,8 segundos. La diferencia entre la  $F_m$  y la  $F_o$  es la  $F_v$  (fluorescencia variable), la cual nos permite calcular el rendimiento cuántico máximo del PSII o  $F_v/F_m$ . En *Chlamydomonas*, el valor promedio de  $F_v/F_m$  está descrito en torno al 0,6 (Massoz et al., 2015) y valores inferiores pueden ser interpretados como daño en el PSII.

A continuación, se iluminaron las células con luz actínica con una intensidad de  $80 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durante 30 s, y posteriormente se dio un pulso saturante para calcular los valores de  $F_m'$  y  $F_o'$ , que nos permiten calcular el rendimiento fotoquímico ( $Y(\text{II}): F_v'/F_m'$ ). El cálculo del parámetro ETR, era proporcionado directamente por el equipo y para ello, utilizaba la ecuación que se muestra a continuación:

$$\text{ETR} = 0,5 \cdot Y(\text{II}) \cdot 0,84 \cdot \text{PAR (Radiación Fotosintéticamente Activa en } \mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$$

Finalmente, el cálculo del rendimiento cuántico de los mecanismos de quenching no fotoquímicos (o NPQ) la realizó el equipo utilizando la siguiente ecuación (Kramer et al 2004):

$$Y(\text{NPQ}) = 1 - Y(\text{II}) - 1 / (\text{NPQ} + 1 + q_L \cdot (F_m / F_o - 1))$$

Donde  $Y(\text{II})$  indica el rendimiento del PSII en presencia de luz. El valor de NPQ corresponde con la atenuación de la fluorescencia asociada a estos mecanismos celulares y se calcula atendiendo a la siguiente ecuación (Bilger and Björkman, 1990):  $\text{NPQ} = (F_m / F_m') / F_m'$ , y  $q_L$  (quenching fotoquímico) hace referencia a la cantidad de centros del PSII que se encuentran abiertos a una intensidad lumínica determinada. El cálculo de este coeficiente se realizó según la ecuación  $q_L = (F_m' - F') / (F_m' - F_o') \times F_o' / F'$ . Donde  $F_o'$  indica la fluorescencia basal medida en condiciones de iluminación y que se calcula atendiendo a la siguiente ecuación:  $F_o' = F_o / (F_v / F_m + F_o / F_m')$

## 7. HPLC

Para analizar los compuestos de la degradación de la clorofila, utilizamos un HPLC (Hitachi Chromatest) equipado con un detector DAD y equipado con una columna RP-18 y un caudal de 1 mL/min. Los disolventes utilizados fueron (A) acetonitrilo/agua (9:1 v/v) y (B) acetato de etilo puro. El programa de elución en gradiente fue el siguiente 0 -16 minutos 0% - 60% A; 16-30 minutos 60% A; 30 - 35 minutos 100% A. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 25 °C y el volumen de inyección fue 50  $\mu\text{L}$ . Para el procesamiento de los datos, se

utilizó el programa Chromatest Hitachi. Los estándares de violaxantina, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, clorofila *a* y clorofila *b* se adquirieron de Sigma -Aldrich (Molina-Márquez et al., 2019).

## **8. Cuantificación de lípidos: HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)**

### **8.1. Obtención de ácidos grasos mediante el método de Folch**

La extracción de lípidos de muestras liofilizadas se hizo de acuerdo al método descrito por (FOLCH et al., 1957). Para ello Pesamos 200 mg de la muestra liofilizada en un tubo de cristal de 15 mL. Añadimos 3 mL de la solución de Folch preparada con cloroformo: metanol (2:1, v/v), para extraer los lípidos. Agitamos ligeramente en el vortex durante 30 segundos. Posteriormente agitamos los tubos a 2000 x *g* a temperatura ambiente durante 10 minutos. Retiramos los tubos del agitador y añadimos 3 mL de HCl 0,1N y 300  $\mu$ L de MgCl 0,5%. Agitamos ligeramente en el vortex durante 1 minuto. Centrifugamos a 2000 x *g* durante 5 minutos para separar la fase orgánica y la fase acuosa.

Recogemos con una pipeta Pasteur la fase orgánica (parte inferior). Para obtener el máximo rendimiento en la obtención de los lípidos, repetimos el proceso añadiendo de nuevo 3 mL de la solución de Folch y seguimos el protocolo hasta obtener de nuevo la fase orgánica. Después de esto las muestras se pueden almacenar a -20 °C o bien continuar con el protocolo.

A continuación, se procede a filtrar esta fase orgánica en una columna preparada con algodón y un exceso de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en una punta de pipeta de 5 mL. Sujetamos la punta de pipeta a un tubo con parafilm. La fase orgánica se filtra por gravedad, y, finalmente, añadimos 1 mL de cloroformo para limpiar y evitar la pérdida de fase orgánica durante el proceso de filtrado. Repetimos el proceso 2 veces. Una vez filtrada la muestra, cerramos el tubo y congelamos a -20 °C para su posterior utilización

Para determinar los ácidos grasos tenemos que llevar a cabo la evaporación de la muestra. Para ello utilizamos un vaporizador con un flujo constante de N<sub>2</sub> a baja presión durante 1 hora para evitar la oxidación de los ácidos grasos.

Una vez que se produce la evaporación, resuspendemos los lípidos en 1 mL de cloroformo (Termo Scientific Chemicals) y añadimos todo el volumen a viales de HPLC (Termo Scientific™ Viales de rosca de vidrio ámbar de 8 mm). Volvemos

a llevar a cabo el proceso de evaporación con  $N_2$ , pero en este caso durante 30 minutos. Una vez evaporado, las muestras se guardan a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior utilización en el HPTLC.

## 8.2. Preparación de estándares y fases móviles

Los estándares de FFA, TAG, PE, 1,2 DAG, y MAG se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en cloroformo y todo el material utilizado se lavó previamente con cloroformo.

En relación con las fases móviles, la primera fase móvil (Elución de Lípidos Polares) estaba compuesta por acetato de metilo: isopropanol: cloroformo: MeOH: KCl 0,25% en la proporción 25:25:25:10:4 (v/v/v/v/v). La segunda fase móvil (Elución de Lípidos no polares), estaba compuesta por isohexano: éter: ácido acético en la proporción 90:10:1 (v:v:v). Finalmente, la tercera fase móvil (para la elución y detección de glicolípidos) estaba compuesta por orcinol- $H_2SO_4$ . Para preparar el reactivo se disolvió el orcinol (250 mg) en etanol y posteriormente se añadieron 3 mL de  $H_2SO_4$  diluido en agua (1:1; v/v).

## 8.3. HPTLC

Se utilizaron placas "Silica Gel 60 F254" de 20x10 cm. Para evitar la oxidación de los ácidos grasos, la placa se mantuvo en una atmósfera de  $N_2$ . Para cargar las muestras usamos una jeringuilla y un volumen de 30  $\mu\text{L}$  por muestra usando el equipo LINOMAT 5. Una vez realizada la placa, la transferimos a un aparato denominado CHAMBER para correr la primera fase móvil. Una vez finalizado este proceso, dejamos secar la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, metemos la placa 10 minutos en un secador de vidrio. Finalizado el proceso de secado, tratamos la placa con la segunda fase móvil. En este caso, utilizamos un GLASS CHAMBER donde depositamos la placa con la segunda fase móvil hasta que la placa se humedezca por completo. Finalizado este proceso, la placa se dejó secar un par de minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado, espolvoreamos la placa de forma homogénea con PMA (ácido fosfomolibdico). Esto se denomina proceso de derivatización. Posteriormente, introducimos la placa en un horno a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos en posición vertical. Para obtener la concentración (%) de los lípidos en la placa, utilizamos el TLC Scanner 4, con el programa WINCATS. La longitud de onda a la que se determinan los lípidos con este equipo es de 650 nm.

## 9. Biología Molecular

### 9.1. Extracción de ARN

Para obtener ARN de células de *Chlamydomonas*, 50 ml de cultivo se recogieron mediante centrifugación durante 2 minutos a 3,000 x *g*. El sobrenadante se eliminó, y el pellet fue resuspendido en 0,8 mL de Buffer de Lisis (50 mM Tris-HCl pH 8; 0,3 M NaCl; 5 mM EDTA, 2% SDS, pH 8). En este punto, las células fueron congeladas y almacenadas a -80 °C para su posterior tratamiento y extracción con fenol-cloroformo. Para hacer la extracción, las muestras fueron descongeladas en hielo y seguidamente y se añadió el mismo volumen de una solución de fenol que contenía fenol (pH 4,3): cloroformo saturado con 50 mM de Tris-HCl. Las muestras se vortearon vigorosamente durante 1 minuto para mezclar las fases acuosa y orgánica. A continuación, fueron centrifugadas durante 15 minutos a >15,000 x *g*. Tras centrifugar, los ácidos nucleicos quedan en la fase acuosa (superior), la cual se recuperó para someterlos a 2 pasos más de extracción con fenol. Después, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y añadimos 1 volumen de cloroformo saturado en agua y vorteamos durante 1 minuto. En este paso, se elimina los restos de fenol presente en nuestras muestras. Centrifugamos durante 5 minutos a > 15,000 x *g* y transferimos la fase acuosa a un tubo limpio. Añadimos un volumen de LiCl (Cloruro de Litio) 8 M a la fase acuosa e incubamos las muestras durante al menos 4 h a 4 °C. Pasado este tiempo, las células fueron centrifugadas durante 30 minutos a > 15,000 x *g*, y una vez centrifugadas, se eliminó el sobrenadante. El pellet de ARN resultante se lavó con 0,5 mL de etanol al 70% y se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O-MQ estéril (Sanz-Luque and de Montaignu, 2018). La determinación de ácidos nucleicos se realizó mediante densidad óptica a 260/280 utilizando Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) o bien espectrofotométricamente utilizando cubetas de cuarzo y una longitud de onda de 260 nm. Estas muestras fueron usadas para hacer la síntesis de ADNc (epígrafe 9.7) o se almacenaron a -80 °C. Durante todo el proceso de extracción las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación del ARN.

### 9.2. Tratamiento con DNAsa (para RNA)

Para llevar a cabo los análisis transcriptómicos, las muestras de ARN se trataron con DNAsa para eliminar la contaminación de ADNg usando DNAsa I recombinante (RNase-free (ROCHE, catálogo no. 04716728001)). Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después del tratamiento, la purificación del

ARN se realizó usando el kit (RNeasy® MinElute ® Cleanup Kit (Quiagen, catálogo no 74204).

### 9.3. Extracción de ADN genómico (ADNg)

Para llevar a cabo la extracción total de ADNg de *Chlamydomonas*, utilizamos el protocolo estándar de extracción con fenol-cloroformo; muy similar al protocolo utilizado para llevar a cabo la extracción total de ARN pero con algunas modificaciones. El procedimiento se llevó a cabo utilizando solamente 25 mL de cultivo celular y, después del paso de extracción con cloroformo, la precipitación se llevó a cabo con 2,4 volúmenes de etanol al 95%. Incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos a  $15,000 \times g$ . El pellet se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío. Centrifugamos 15 minutos a  $> 15,000 \times g$  y descartamos el sobrenadante cuidadosamente. Dejamos secar y añadimos 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril. Cuantificamos utilizando 1  $\mu\text{L}$  utilizando Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Almacenamos a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior utilización.

### 9.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro y midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) conociendo que el coeficiente de extinción para la doble cadena de ADN es  $(0,02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1})\cdot\text{mL}^{-1}$ ; para el ADN monocatenario  $(0,027 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1})\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $(0,025 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1})\cdot\text{mL}^{-1}$  para el ARN monocatenario.

Los ácidos nucleicos no purificados fueron cuantificados de forma semicuantitativa, estimando la concentración de estos en geles de electroforesis. Para ello, se realizó un gel de agarosa y se comparó la intensidad de la fluorescencia emitida entre las cadenas de ADN y diferentes concentraciones conocidas de ADN del virus lambda (ThermoFischer Scientific).

### 9.5. Gel de electroforesis y purificación de fragmentos de ADN

Para la separación de ácidos nucleicos los geles de agarosa se prepararon con agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (4,84 g/L Tris; 1,1 mL/L ácido acético, 50 mM EDTA pH 8), añadiendo bromuro de etidio ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para visualizar los ácidos nucleicos usando un transiluminador UV. Antes de visualizar las

muestras en el gel, es necesario añadir a las muestras 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (50% glicerol, 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno-cianol) en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Además, se utilizó un marcador de peso molecular (1 kb Ladder Plus marker-Invitrogen).

Una vez llevada a cabo la electroforesis, el gel fue visualizado utilizando luz UV y los datos fueron examinados con el sistema de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad). Para la purificación de las bandas de ADN de interés, se cortó con un bisturí el trozo de gel conteniendo el ADN y se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugó durante 15 minutos a  $3,000 \times g$ , descartándose el pellet y tomando el sobrenadante para posteriores aplicaciones.

## 9.6. Secuenciación de ADN

Para secuenciar las muestras de ADN, utilizamos la tecnología SANGER (Servicio del SCAI de la Universidad de Córdoba).

## 9.7. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Previamente a la cuantificación de la expresión de los genes se sintetizó ADNc a partir de nuestras muestras de ARN. Para llevar a cabo la transcripción reversa, 1  $\mu\text{g}$  ARN (libre de ADN) y el kit de síntesis de ADN copia iScript™ de alta fidelidad (Bio-Rad) se utilizaron siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial (5 minutos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 minutos a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 1 minuto a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y las muestras se diluyeron 2,5 veces (volumen final 50  $\mu\text{L}$ ) antes de usarlas en RT-PCR. Las muestras fueron conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 9.8. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

### 9.8.1. Diseño y lista de cebadores usados

Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) y BLAST online (NCBI). Los parámetros para la amplificación fueron estudiados usando el programa PrimerSelect. Los cebadores utilizados se muestran en la siguiente tabla (Tabla MM.2):

Tabla MM.2. Lista de cebadores

Primer	Secuencia (5' - 3')	Gen	Aplicación	Ref.
LAO1_F	TCGAAGCAAGTACACGCAAC	LAO1	RT-qPCR	1
LAO1_R	AACTGTGGGAGTGTGGGAAG			
NIA1_F	CCGAGCGCTTCCGGCTGTGGTACA	NIA1		2
NIA1_R	CTGGATCTGGCGGTCTTGCTGTA			
NRT2.1_F	CGCCGTGGCAACTGACCCTGAG	NRT2.1		2
NRT2.1_R	CGCCACCTCCTCCGCACTCCAC			
NRR1_F	GGGCAGCGTGCATTTCTTCT	NRR1		3
NRR1_R	CGCAACAGTACGGGACCAAC			
NSG17_F	CGCAGCCGTTAAGAATCGTG	NSG17		*
NSG17_R	CAAAAGTGCCCGTGGAGTTG			
BLZ8_F	GCAAGCGAATAAGCGGAAGG	BLZ8		*
BLZ8_R	GCAGCGACGTGTGAAAGAAG			
BHLH3_F	CGCGCGTGAGATGAAGAAAG	BHLH3		*
BHLH3_R	ATGCGCGAAACTGGAACAC			
Ubi_F	GTACAGCGGGCTAGAGGCAC	UBC8 Ubiquitina ligasa	2	
Ubi_R	AGCGTCAGCGGGTTGCAGGTATCT			
MTP2_F	GCTGGCATTCCTGTATCCTTGACGC	FUS1	PCR	4
MTP2_R	GCGGCGTAACATAAAGGAGGGTCCG	Alelo MT+		
MTM3_F	CGACGACTTGGCATCGACAGGTGG	Alelo MT-		4
MTM3_R	CTCGGCCAGAACCTTTCATAGGGTGG			

(1) (Calatrava et al., 2019) (2) Camargo et al., 2007 (3) (Boyle et al., 2012) (4) (Zamora et al., 2004) (\*) En este trabajo

### 9.8.2. PCR de colonia.

Para la obtención de ADN, se tomaron las células correspondientes a aproximadamente 0,5 mm<sup>2</sup> de superficie de una placa Petri y se transfirieron a un microtubo con 20 µL de agua estéril. 1 µL de las células resuspendidas se utilizó para llevar a cabo la PCR. La PCR se llevó a cabo usando la enzima iProof™ ADN polimerasa de Alta Fidelidad (Bio-Rad), atendiendo al protocolo. El primer paso de desnaturalización a 96 °C permite la ruptura y liberación de ADN. El procedimiento de PCR fue el siguiente: Desnaturalización inicial 96 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 1 minuto, anillamiento a 68 °C durante 0,5 minutos, extensión a 72 °C durante 1 minuto. Finalmente se añadió un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos y enfriamiento a 14 °C y pausa.

### 9.8.3. RT-qPCR: PCR cuantitativa para la expresión génica relativa.

Para llevar a cabo las reacciones de RT-qPCR se utilizó el kit SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad). En cada reacción se usó 1 µL de las muestras de ADNc y 10 µM de los cebadores específicos en un volumen final de 20 µL. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el equipo MyiQ2 (Bio-Rad). El protocolo del termociclador fue: desnaturalización a 95 °C, 5 minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos; anillamiento a 53-68 °C, 30 segundos; y amplificación a 72 °C, 20 segundos; y medida, 10 segundos. Las medidas de fluorescencia se hicieron a 84 °C para eliminar la fluorescencia que resultan de la formación de dímeros y el ruido de fondo. Cada reacción se realizó por triplicado y el gen control que se utilizó para normalizar y obtener la expresión relativa fue el gen de la ubiquitina ligasa. Este gen se caracteriza por mantener inalterada su expresión en una fuente de carbono y/o nitrógeno durante 24 horas (González-Ballester et al., 2004).

Los valores de Ct (*Cycle threshold*) para cada una de las reacciones fueron obtenidos automáticamente con el iCycler™ iQ software versión 5.0 (BioRad). Los valores de Ct obtenidos para cada una de las reacciones se normalizaron frente a los valores de Ct del gen constitutivo (ubiquitina ligasa). Para el cálculo de los valores de expresión relativa se utilizó la siguiente ecuación (Pfaffl, 2001):

$$\text{Incremento de expresión} = 2^{-\Delta Ct} \text{ (eficiencia de los cebadores } \approx 1)$$

donde  $\Delta Ct = Ct \text{ muestra} - Ct \text{ control}$

## 10. Análisis transcriptómico

El análisis bioinformático de la transcriptómica se llevó a cabo por la compañía Sistemas Genómicos (Valencia, España) de la siguiente manera: las lecturas de los extremos emparejados del transcriptoma inicial completo obtenidas de la secuenciación se mapearon con la versión 5.0 de *Chlamydomonas* utilizando el algoritmo bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Las lecturas de baja calidad se eliminaron utilizando el software Picard Tools versión 1.83, dejando solo las lecturas de alta calidad. Los niveles de expresión se calcularon usando el software htseq versión 0.5.4p3 (Anders and Huber, 2010). Se aplicó el método DESeq2 (Love et al., 2014) para el análisis de expresión diferencial entre condiciones. Entre los genes diferencialmente expresados se seleccionaron

genes con un Fold – Change inferior o superior a -2 y 2, respectivamente, con un valor de p-value ajustado a 0,05.

## **11. Herramientas bioinformáticas. Bases de datos.**

### Específicas de *Chlamydomonas*

The plant Genomics Resource (JGI), Phytozome v.13

### Base de datos general de secuencias de ADN y proteínas

\*NCBI: National Centre for Biotechnology Information:

### Herramientas de comparación de secuencias de nucleótidos y proteínas

\*BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Herramientas para el manejo y el análisis de ácidos nucleicos

\*Paquete de programas DNASTAR.

EditSeq (Manejo de secuencias)

PrimerSelect (Diseño de cebadores para PCR)

\*Primer-Blast online: (NCBI)

Análisis de promotores PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org>).

### Análisis de datos y estadística

\*PRISM software v8.4.3 (GradhPad Software, LLC, San Diego, CA, USA)

Se utilizó el programa de análisis de datos Prism. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de al menos tres replicas biológicas.

Para algunos casos se realizó el análisis estadístico Student's *t* test.

# FINANCIACIÓN

---

Este trabajo ha sido financiado con los siguientes proyectos PID2020-118398GB-I00 (MINECO), POCTEP-0055\_ALGARED\_PLUS\_5\_E (UE), UCO-1381052 y financiación predoctoral de la Fundación Torres Gutiérrez.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abe, J., Kubo, T., Saito, T., Matsuda, Y., 2005. The regulatory networks of gene expression during the sexual differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*, as analyzed by mutants for gametogenesis. *Plant Cell Physiol.* 46, 312–316. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci025>
- Abe, J., Kubo, T., Takagi, Y., Saito, T., Miura, K., Fukuzawa, H., Matsuda, Y., 2004. The transcriptional program of synchronous gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 46, 304–315. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0526-4>
- Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4310>
- Ariz, I., Boeckstaens, M., Gouveia, C., Martins, A.P., Sanz-Luque, E., Fernández, E., Soveral, G., Von Wirén, N., Marini, A.M., Aparicio-Tejo, P.M., Cruz, C., 2018. Nitrogen isotope signature evidences ammonium deprotonation as a common transport mechanism for the AMT-Mep-Rh protein superfamily. *Sci. Adv.* 4. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar3599>
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Asim, M., Ullah, Z., Oluwaseun, A., Wang, Q., Liu, H., 2020. Signalling overlaps between nitrate and auxin in regulation of the root system architecture: Insights from the *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21082880>
- Astier, J., Gross, I., Durner, J., 2018. Nitric oxide production in plants: An update. *J. Exp. Bot.* <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>
- Astier, J., Rossi, J., Chatelain, P., Klinguer, A., Besson-Bard, A., Rosnoblet, C., Jeandroz, S., Nicolas-Francès, V., Wendehenne, D., 2021. Nitric oxide production and signalling in algae. *J. Exp. Bot.* 72, 781–792. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa421>
- Bai, F., Zhang, Y., Liu, J., 2021. A bZIP transcription factor is involved in regulating lipid and pigment metabolisms in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 59, 102450. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102450>
- Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroustos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., Villanova, V., Bligny, R., Flori, S., Falconet, D., Krieger-Liszky, A., Santabarbara, S., Rappaport, F., Joliot, P., Tirichine, L., Falkowski, P.G., Cardol, P., Bowler, C., Finazzi, G., 2015. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO<sub>2</sub> assimilation in diatoms. *Nature* 524, 366–369. <https://doi.org/10.1038/nature14599>
- Bajhaiya, A.K., Dean, A.P., Zeef, L.A.H., Webster, R.E., Pittman, J.K., 2016. *PSR1* is a global transcriptional regulator of phosphorus deficiency responses and carbon storage metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 170, 1216–1234. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01907>
- Bellido-Pedraza, C.M., Calatrava, V., Llamas, A., Fernandez, E., Sanz-Luque, E., Galvan, A.,

2022. Nitrous Oxide Emissions from Nitrite Are Highly Dependent on Nitrate Reductase in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23169412>
- Bellido-Pedraza, C.M., Calatrava, V., Sanz-Luque, E., Tejada-Jiménez, M., Llamas, Á., Plouviez, M., Guieysse, B., Fernández, E., Galván, A., 2020. *Chlamydomonas reinhardtii*, an algal model in the nitrogen cycle. *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants9070903>
- Berman, T., Bronk, D.A., 2003. Dissolved organic nitrogen: A dynamic participant in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 279–305. <https://doi.org/10.3354/ame031279>
- Bilger, W., Björkman, O., 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25, 173–185. <https://doi.org/10.1007/BF00033159>
- Blaby, I.K., Glaesener, A.G., Mettler, T., Fitz-Gibbon, S.T., Gallaher, S.D., Liu, B., Boyle, N.R., Kropat, J., Stitt, M., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Casero, D., Merchant, S.S., 2013. Systems-level analysis of nitrogen starvation-induced modifications of carbon metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* starchless mutant. *Plant Cell* 25, 4305–4323. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117580>
- Bölling, C., Fiehn, O., 2005. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiol.* 139, 1995–2005. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071589>
- Boyle, N.R., Page, M.D., Liu, B., Blaby, I.K., Casero, D., Kropat, J., Cokus, S.J., Hong-Hermesdorf, A., Shaw, J., Karpowicz, S.J., Gallaher, S.D., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Grossman, A., Merchant, S.S., 2012. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 287, 15811–15825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334052>
- Brooks, M.D., Cirrone, J., Pasquino, A. V., Alvarez, J.M., Swift, J., Mittal, S., Juang, C.L., Varala, K., Gutiérrez, R.A., Krouk, G., Shasha, D., Coruzzi, G.M., 2019. Network Walking charts transcriptional dynamics of nitrogen signaling by integrating validated and predicted genome-wide interactions. *Nat. Commun.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09522-1>
- Brooks, M.D., Juang, C.L., Katari, M.S., Alvarez, J.M., Pasquino, A., Shih, H.J., Huang, J., Shanks, C., Cirrone, J., Coruzzi, G.M., 2021. ConnecTF: A platform to integrate transcription factor-gene interactions and validate regulatory networks. *Plant Physiol.* 185, 49–66. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA012>
- Burlacot, A., Dao, O., Auroy, P., Cuiné, S., Li-Beisson, Y., Peltier, G., 2022. Alternative photosynthesis pathways drive the algal CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism. *Nature* 605, 366–371. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04662-9>
- Burlacot, A., Richaud, P., Gosset, A., Li-Beisson, Y., Peltier, G., 2020. Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 2704–2709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915276117>

- Cakmak, T., Angun, P., Ozkan, A.D., Cakmak, Z., Olmez, T.T., Tekinay, T., 2012. Nitrogen and sulfur deprivation differentiate lipid accumulation targets of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioengineered* 3, 343–346. <https://doi.org/10.4161/bioe.21427>
- Calatrava, M. V. (2018). Nitrogen nutrition in algae: unraveling pieces of the nitrogen assimilation puzzle and its regulation in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Universidad de Córdoba
- Calatrava, V., Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorro, F., Llamas, A., Fernandez, E., Galvan, A., 2017. How *Chlamydomonas* handles nitrate and the nitric oxide cycle. *J. Exp. Bot.* 68, 2593–2602. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw507>
- Calatrava, V., Hom, E.F.Y., Llamas, A., Fernandez, E., Galván, A., 2022. Auxin Production in the Green Alga *Chlamydomonas* Involves an Extracellular L-Amino Acid Oxidase and Supports Algal-Bacterial Mutualism with *Methylobacteria*. *SSRN Electron. J.* <https://doi.org/10.2139/ssrn.4248355>
- Calatrava, V., Hom, E.F.Y., Llamas, Á., Fernández, E., Galván, A., 2019. Nitrogen scavenging from amino acids and peptides in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The role of extracellular L-amino oxidase. *Algal Res.* 38, 101395. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101395>
- Calatrava, V., Hom, E.F.Y., Llamas, Á., Fernández, E., Galván, A., 2018. OK, thanks! A new mutualism between *Chlamydomonas* and *Methylobacteria* facilitates growth on amino acids and peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny021>
- Calatrava, V., Tejada-Jimenez, M., Sanz-Luque, E., Fernandez, E., & Galvan, A. (2023b). Nitrogen metabolism in *Chlamydomonas*. In *The Chlamydomonas Sourcebook* (pp. 99-128). Academic Press.
- Calatrava, V., Tejada-Jimenez, M., Sanz-Luque, E., Fernandez, E., Galvan, A., Llamas, A., 2023a. *Chlamydomonas reinhardtii*, a Reference Organism to Study Algal-Microbial Interactions. *Why Can't They Be Friends* 1–18.
- Camargo, A., Llamas, Á., Schnell, R.A., Higuera, J.J., González-Ballester, D., Lefebvre, P.A., Fernández, E., Galván, A., 2007. Nitrate signaling by the regulatory gene NIT2 in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 19, 3491–3503. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045922>
- Campbell, W.H., Kinghorn, J.R., 1990. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* 15, 315–319. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90021-3)
- Chaiboonchoe, A., Dohai, B.S., Cai, H., Nelson, D.R., Jijakli, K., Salehi-Ashtiani, K., 2014. Microalgal metabolic network model refinement through high-throughput functional metabolic profiling. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00068>
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2017. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends Plant Sci.* 22, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>

- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, Á., Ocaña-Calahorro, F., Mariscal, V., Carreras, A., Barroso, J.B., Galván, A., Fernández, E., 2016. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* 39, 2097–2107. <https://doi.org/10.1111/pce.12739>
- Chaux, F., Burlacot, A., Mekhalfi, M., Auroy, P., Blangy, S., Richaud, P., Peltier, G., 2017. Flavodiiron proteins promote fast and transient O<sub>2</sub> photoreduction in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 174, 1825–1836. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00421>
- Chekanov, K., Fedorenko, T., Kublanovskaya, A., Litvinov, D., Lobakova, E., 2020. Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 96. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz183>
- Choi, B.Y., Kim, H., Shim, D., Jang, S., Yamaoka, Y., Shin, S., Yamano, T., Kajikawa, M., Jin, E., Fukuzawa, H., Lee, Y., 2022. The *Chlamydomonas* bZIP transcription factor BLZ8 confers oxidative stress tolerance by inducing the carbon-concentrating mechanism. *Plant Cell* 34, 910–926. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab293>
- Christiansen, J.R., Outhwaite, J., Smukler, S.M., 2015. Comparison of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O soil-atmosphere exchange measured in static chambers with cavity ring-down spectroscopy and gas chromatography. *Agric. For. Meteorol.* 211–212, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.06.004>
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Palma, J.M., Rodríguez-Ruiz, M., 2017. Plant peroxisomes: A nitro-oxidative cocktail. *Redox Biol.* 11, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.033>
- Dang, K. Van, Plet, J., Tolleter, D., Jokel, M., Cuiné, S., Carrier, P., Auroy, P., Richaud, P., Johnson, X., Alric, J., Allahverdiyeva, Y., Peltier, G., 2014. Combined increases in mitochondrial cooperation and oxygen photoreduction compensate for deficiency in cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 26, 3036–3050. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126375>
- de Montaignu, A., Sanz-Luque, E., Galván, A.G., Fernández, E., 2010. A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 22, 1532–1548. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062380>
- de Vitry, C., Olive, J., Drapier, D., Recouvreur, M., Wollman, F.A., 1989. Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 109, 991–1006. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.3.991>
- Dröge-Laser, W., Snoek, B.L., Snel, B., Weiste, C., 2018. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family — an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* 45, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.001>
- Ermilova, E. V., Zalutskaya, Z.M., Nikitin, M.M., Lapina, T. V., Fernández, E., 2010. Regulation by light of ammonium transport systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell Environ.* 33, 1049–1056. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02126.x>

- Ezer, D., Shepherd, S.J.K., Brestovitsky, A., Dickinson, P., Cortijo, S., Charoensawan, V., Box, M.S., Biswas, S., Jaeger, K.E., Wigge, P.A., 2017. The G-box transcriptional regulatory code in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 175, 628–640. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01086>
- Fagerstone, K. D., Quinn, J. C., Bradley, T. H., De Long, S. K., & Marchese, A. J. 2011. Quantitative measurement of direct nitrous oxide emissions from microalgae cultivation. *Environmental science & technology*, 45, 9449–9456. <https://doi.org/10.1021/es202573f>
- Fakhimi, N., Dubini, A., Tavakoli, O., González-Ballester, D., 2019. Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Bioresour. Technol.* 289, 121648. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121648>
- Fakhimi, N., Gonzalez-Ballester, D., Fernández, E., Galván, A., Dubini, A., 2020. Algae-Bacteria Consortia as a Strategy to Enhance H<sub>2</sub> Production. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9061353>
- Fan, J., Andre, C., Xu, C., 2011. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 585, 1985–1991. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>
- Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J., Xu, C., 2012. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 53, 1380–1390. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs082>
- Farese, R. V., Walther, T.C., 2009. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.005>
- Fernández, E., Cárdenas, J., 1982. Regulation of the nitrate-reducing system enzymes in wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *MGG Mol. Gen. Genet.* 186, 164–169. <https://doi.org/10.1007/BF00331846>
- Fernández, E., Matagne, R.F., 1986. In vivo complementation analysis of nitrate reductase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 10, 397–403. <https://doi.org/10.1007/BF00418413>
- Fernández, E., Schnell, R., Ranum, L.P., Hussey, S.C., Silflow, C.D., Lefebvre, P.A., 1989. Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6449–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6449>
- Fernandez, E., Matagne, R.F., 1984. Current genetics in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 635–640.
- Ferreira de Oliveira, A.P., Bragotto, A.P.A., 2022. Microalgae-based products: Food and public health. *Futur. Foods* 6. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100157>
- Ferris, P.J., Waffenschmidt, S., Umen, J.G., Lin, H., Lee, J.H., Ishida, K., Kubo, T., Lau, J., Goodenough, U.W., 2005. Plus and minus sexual agglutinins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 17, 597–615. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028035>

- Fields, F.J., Lejzerowicz, F., Schroeder, D., Ngoi, S.M., Tran, M., McDonald, D., Jiang, L., Chang, J.T., Knight, R., Mayfield, S., 2020. Effects of the microalgae *Chlamydomonas* on gastrointestinal health. *J. Funct. Foods* 65, 103738. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103738>
- Fischer, B.B., Ledford, H.K., Wakao, S., Huang, S.Y.G., Casero, D., Pellegrini, M., Merchant, S.S., Koller, A., Eggen, R.I.L., Niyogi, K.K., 2012. SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116843109>
- Florez-Leiva, L., Tarifeño, E., Cornejo, M., Kiene, R., Farías, L., 2010. High production of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), methane (CH<sub>4</sub>) and DiMethylSulPhoniopropionate (DMSP) in a massive marine phytoplankton culture. *Biogeosciences Discuss.* 7, 6705–6723. <https://doi.org/10.5194/bgd-7-6705-2010>
- Folch, J., Lees, M., Sloane Standley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G., Lamattina, L., 2010. Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 22, 3816–3830. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073510>
- Galván, A., Cárdenas, J., Fernández, E., 1992. Nitrate reductase regulates expression of nitrite uptake and nitrite reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 98, 422–426. <https://doi.org/10.1104/pp.98.2.422>
- Galván, A., Córdoba, F., Cárdenas, J., Fernández, E., 1991. Regulation of nitrite uptake and nitrite reductase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BBA - Gen. Subj.* 1074, 6–11. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90030-K](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90030-K)
- Galván, A., Quesada, A., Fernández, E., 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 271, 2088–2092. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.4.2088>
- Gargouri, M., Park, J.J., Holguin, F.O., Kim, M.J., Wang, H., Deshpande, R.R., Shachar-Hill, Y., Hicks, L.M., Gang, D.R., 2015. Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* 66, 4551–4566. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv217>
- Gérin, S., Mathy, G., Blomme, A., Franck, F., Sluse, F.E., 2010. Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii*: The logic of Aox1 gene localization. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797, 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.034>
- Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., 2008. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Methods Enzymol.* 440, 361–380. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00823-3)

- Goncalves, E.C., Koh, J., Zhu, N., Yoo, M.J., Chen, S., Matsuo, T., Johnson, J. V., Rathinasabapathi, B., 2016. Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: Evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. *Plant J.* 85, 743–757. <https://doi.org/10.1111/tpj.13144>
- González-Ballester, D., Camargo, A., Fernández, E., 2004. Ammonium transporter genes in *Chlamydomonas*: The nitrate-specific regulatory gene NIT2 is involved in AMT1.1 expression. *Plant Mol. Biol.* 56, 863–878. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-5292-7>
- González-Ballester, D., De Montaigu, A., Galván, A., Fernández, E., 2005. Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal. Biochem.* 340, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.01.031>
- Goodenough, U., Blaby, I., Casero, D., Gallaher, S.D., Goodson, C., Johnson, S., Lee, J.H., Merchant, S.S., Pellegrini, M., Roth, R., Rusch, J., Singh, M., Umen, J.G., Weiss, T.L., Wulan, T., 2014. The path to triacylglyceride obesity in the sta6 strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 13, 591–613. <https://doi.org/10.1128/EC.00013-14>
- Goodenough, U., Lin, H., Lee, J.H., 2007. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.02.006>
- Goodson, C., Roth, R., Wang, Z.T., Goodenough, U., 2011. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryot. Cell* 10, 1592–1606. <https://doi.org/10.1128/EC.05242-11>
- Goold, H.D., Cuiné, S., Légeret, B., Liang, Y., Brugière, S., Auroy, P., Javot, H., Tardif, M., Jones, B., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y., 2016. Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidal lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 171, 2406–2417. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00718>
- Grossman, A.R., Croft, M., Gladyshev, V.N., Merchant, S.S., Posewitz, M.C., Prochnik, S., Spalding, M.H., 2007. Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.01.012>
- Guieysse, B., Plouviez, M., Coilhac, M., Cazali, L., 2013. Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) production in axenic *Chlorella vulgaris* microalgae cultures: Evidence, putative pathways, and potential environmental impacts. *Biogeosciences* 10, 6737–6746. <https://doi.org/10.5194/bg-10-6737-2013>
- Harris, E. 2009. *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press.
- Hemme, D., Veyel, D., Mühlhaus, T., Sommer, F., Jüppner, J., Unger, A.K., Sandmann, M., Fehrle, I., Schönfelder, S., Steup, M., Geimer, S., Kopka, J., Giavalisco, P., Schroda, M., 2014. Systems-Wide analysis of acclimation responses to long-term heat stress and recovery in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 26, 4270–4297. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130997>

- Hidayati, N.A., Yamada-Oshima, Y., Iwai, M., Yamano, T., Kajikawa, M., Sakurai, N., Suda, K., Sesoko, K., Hori, K., Obayashi, T., Shimojima, M., Fukuzawa, H., Ohta, H., 2019. Lipid emodeling regulator 1 (LRL1) is differently involved in the phosphorus-depletion response from PSR1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 100, 610–626. <https://doi.org/10.1111/tpj.14473>
- Higuera, J.J., Fernandez, E., Galvan, A., 2014. *Chlamydomonas* NZF1, a tandem-repeated zinc finger factor involved in nitrate signalling by controlling the regulatory gene NIT2. *Plant, Cell Environ.* 37, 2139–2150. <https://doi.org/10.1111/pce.12305>
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., Tsay, Y.F., 2009. CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* 138, 1184–1194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004>
- Hodson, R.C., Williams, S.K., Davidson, W.R., 1975. Metabolic control of urea catabolism in *Chlamydomonas reinhardi* and *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Bacteriol.* 121, 1022–1035. <https://doi.org/10.1128/jb.121.3.1022-1035.1975>
- Horst, B.G., Stewart, E.M., Nazarian, A.A., Marletta, M.A. 2019. Characterization of a Carbon Monoxide-Activated Soluble Guanylate Cyclase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry.* 58:2250-2259. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00190.
- Ibáñez-Salazar, A., Rosales-Mendoza, S., Rocha-Uribe, A., Ramírez-Alonso, J. I., Lara-Hernández, I., Hernández-Torres, A., Paz-Maldonado, L. M., Silva-Ramírez, A. S., Bañuelos-Hernández, B., Martínez-Salgado, J. L., & Soria-Guerra, R. E. 2014. Over-expression of Dof-type transcription factor increases lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*, 184, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.003>
- Ischebeck, T., Krawczyk, H.E., Mullen, R.T., Dyer, J.M., Chapman, K.D., 2020. Lipid droplets in plants and algae: Distribution, formation, turnover and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 108, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.02.014>
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D.J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E.J., Wong, G.K.S., Wendehenne, D. 2016. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci Signal.* 9(417):re2. doi:10.1126/scisignal.aad4403.
- Ji, C., Mao, X., Hao, J., Wang, X., Xue, J., Cui, H., Li, R., 2018. Analysis of bZIP transcription factor family and their expressions under salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19092800>
- Jia, M., Munz, J., Lee, J., Shelley, N., Xiong, Y., Joo, S., Jin, E.S., Lee, J.H., 2022. The bHLH family NITROGEN-REPLETION INSENSITIVE1 represses nitrogen starvation-induced responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 110, 337–357. <https://doi.org/10.1111/tpj.15673>
- Jiang, X., & Stern, D. 2009. Mating and tetrad separation of *Chlamydomonas reinhardtii* for genetic analysis. *J Vis Exp*, 30, 1274. <https://doi.org/10.3791/1274>
- Jin, T., Huppe, H.C., Turpin, D.H., 1998. In vitro reconstitution of electron transport from glucose-6-phosphate and NADPH to nitrite. *Plant Physiol.* 117, 303–309. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.303>

- Jones, C.S., Luong, T., Hannon, M., Tran, M., Gregory, J.A., Shen, Z., Briggs, S.P., Mayfield, S.P., 2013. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1987–1995. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4071-7>
- Johnson, X., Alric, J., 2013. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot. Cell* 12, 776–793. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-12>
- Juergens, M.T., Deshpande, R.R., Lucker, B.F., Park, J.J., Wang, H., Gargouri, M., Omar Holguin, F., Disbrow, B., Schaub, T., Skepper, J.N., Kramer, D.M., Gang, D.R., Hicks, L.M., Shachar-Hill, Y., 2015. The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 167, 558–573. <https://doi.org/10.1104/pp.114.250530>
- Karsten, P., 1993. The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Rev.* 34, 243–260.
- Kirk, D.L., Kirk, M.M., 1978. Carrier-mediated Uptake of Arginine and Urea by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 61, 556–560. <https://doi.org/10.1104/pp.61.4.556>
- Kitajima, M., Butler, W.L., 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *BBA - Bioenerg.* 376, 105–115. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90209-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90209-1)
- Klein, U., Betz, A., 1978. Fermentative Metabolism of Hydrogen-evolving *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiol.* 61, 953–956. <https://doi.org/10.1104/pp.61.6.953>
- Knaff, D.B., Hirasawa, M., 1991. Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *BBA - Bioenerg.* 1056, 93–125. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80277-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80277-4)
- Kou, Z., Bei, S., Sun, J., Pan, J., 2013. Fluorescent measurement of lipid content in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* 25, 1633–1641. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0011-x>
- Kudela, R.M., Lane, J.Q., Cochlan, W.P., 2008. The potential role of anthropogenically derived nitrogen in the growth of harmful algae in California, USA. *Harmful Algae* 8, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.019>
- Kuo, E.Y.H., Lee, T.M., 2021. Molecular Mechanisms Underlying the Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* Against Nitric Oxide Stress. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690763>
- Kurvari, V., Grishin, N. V., Snell, W.J., 1998. A gamete-specific, sex-limited homeodomain protein in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 143, 1971–1980. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1971>
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee, J.W., Lee, M.W., Jin, C.Z., Oh, H.M., Jin, E.S., Lee, H.G., 2022. Inhibition of monogalactosyldiacylglycerol synthesis by down-regulation of MGD1 leads to

- membrane lipid remodeling and enhanced triacylglycerol biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* 15, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02187-x>
- Leftley, J.W., Syrett, P.J., 1973. ATP: Urea amidolyase activity in unicellular algae. *J. Gen. Microbiol.* 77, 109–115.
- Légeret, B., Schulz-Raffelt, M., Nguyen, H.M., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G., Blanc, G., Li-Beisson, Y., 2016. Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids. *Plant Cell Environ.* 39, 834–847. <https://doi.org/10.1111/pce.12656>
- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A., Fernández, E., 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol.* 22, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.11.003>
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J.M., Halkier, B.A., Harris, J.M., Hedrich, R., Limami, A.M., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y.F., Zhang, M., Coruzzi, G., Lacombe, B., 2014. A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. *Trends Plant Sci.* 19, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.008>
- Li, X., Moellering, E.R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B.B., Kuo, M.H., Benning, C., 2012. A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24, 4670–4686. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105106>
- Li-Beisson, Y., Kong, F., Wang, P., Lee, Y., & Kang, B. H. 2021. The disassembly of lipid droplets in *Chlamydomonas*. *New Phytol.* 231, 1359–1364. <https://doi.org/10.1111/nph.17505>
- Lin, Y.T., Takeuchi, T., Youk, B., Umen, J., Sears, B.B., Benning, C., 2022. *Chlamydomonas* CHT7 is involved in repressing DNA replication and mitotic genes during synchronous growth. *G3 (Bethesda)* 12, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac023>
- Lisa, T.A., Piedras, P., Cárdenas, J., Pineda, M. 1995. Utilization of adenine and guanine as nitrogen sources by *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Plant, Cell & Environment*, 18: 583-588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00558.x>
- Liu, K.H., Diener, A., Lin, Z., Liu, C., Sheen, J., 2020. Primary nitrate responses mediated by calcium signalling and diverse protein phosphorylation. *J. Exp. Bot.* 71, 4428–4441. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa047>
- Llamas, A., Igeño, M.I., Galván, A., Fernández, E., 2002. Nitrate signalling on the nitrate reductase gene promoter depends directly on the activity of the nitrate transport systems in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 30, 261–271. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01281.x>
- López García De Lomana, A., Schäuble, S., Valenzuela, J., Imam, S., Carter, W., Bilgin, D.D., Yohn, C.B., Turkarlan, S., Reiss, D.J., Orellana, M. V., Price, N.D., Baliga, N.S., 2015.

- Transcriptional program for nitrogen starvation-induced lipid accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0391-z>
- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M.C.P., Matagne, R.F., 1999. Transcriptional regulation of the *Nia1* gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the *Nia1* promoter. *Plant Mol. Biol.* 41, 701–711. <https://doi.org/10.1023/A:1006381527119>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Marini, A.-M. . e. al, 1997. A Family of Ammonium Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4282–4293.
- Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A.J., Fernández, E., Galván, A., 2006. Differential Regulation of the *Chlamydomonas Nar1* Gene Family by Carbon and Nitrogen. *Protist* 157, 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.06.003>
- Mariscal, V., Rexach, J., Fernández, E., Galván, A., 2004. The plastidic nitrite transporter NAR1.1 improves nitrate use efficiency for growth in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell Environ.* 27, 1321–1328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01239.x>
- Márquez, A. J., Orea, A., Pajuelo, P., Pajuelo, E., Romero, J. M., Arcondéguy, T., Betti, M., García-Calderón, M., Estivill, G. & Palove-Balang, P., 2004. Nitrogen assimilation in roots of the model legume *Lotus japonicus*. *Biologia, Bratislava*, 59/Suppl. 13: 69—76, ISSN 0006-3088.
- Massoz, S., Larosa, V., Horrión, B., Matagne, R.F., Remacle, C., Cardol, P., 2015. Isolation of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants with altered mitochondrial respiration by chlorophyll fluorescence measurement. *J. Biotechnol.* 215, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.05.009>
- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J.,...Grossman A.R. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318:245-50. doi: 10.1126/science.1143609.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R.R., Vieler, A., Gartner, K., Li, X., Moellering, E.R., Zauner, S., Cornish, A.J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B.B., Kuo, M.H., Hegg, E.L., Shachar-Hill, Y., Shiu, S.H., Benning, C., 2010. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol.* 154, 1737–1752. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165159>
- Mitamura, O., Nakamoto, N., Ibañez, M. do S.R., Cavalcante, P.R.S., Costa Neto, J.P., Barbieri, R., 2012. Biogeochemical cycling of urea in the aquatic systems of Pindaré and Turiaçu River basins, a pre-Amazonian floodplain, Baixada Maranhense, Brazil. *Acta Limnol. Bras.* 24, 167–180. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x2012005000036>
- Molina-Márquez, A., Vila, M., Vígara, J., Borrero, A., León, R., 2019. The bacterial phytoene desaturase-encoding gene (CRTI) is an efficient selectable marker for the genetic

- transformation of eukaryotic microalgae. *Metabolites* 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9030049>
- Morisse, S., Zaffagnini, M., Gao, X.H., Lemaire, S.D., Marchand, C.H., 2014. Insight into protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxid Redox Signal.* 21, 1271–1284. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5632>
- Mourad, G.S., Tippmann-Crosby, J., Hunt, K.A., Gicheru, Y., Bade, K., Mansfield, T.A., Schultes, N.P., 2012. Genetic and molecular characterization reveals a unique nucleobase cation symporter 1 in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 586, 1370–1378. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.058>
- Msanne, J., Xu, D., Konda, A.R., Casas-Mollano, J.A., Awada, T., Cahoon, E.B., Cerutti, H., 2012. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry* 75, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.007>
- Muñoz-Blanco, J., Hidalgo-Martínez, J., Cárdenas, J., 1990. Extracellular deamination of amino acids by *Chlamydomonas*. *Planta* 182, 194–198.
- Navarro, M.T., Guerra, E., Fernandez, E., Galvan, A., 2000. Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122, 283–289. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.283>
- O'Brien, J.A.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., Gutiérrez, R.A.A., 2016. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol. Plant* 9, 837–856. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.004>
- Painter, S.C., Sanders, R., Waldron, H.N., Lucas, M.I., Torres-Valdes, S., 2008. Urea distribution and uptake in the Atlantic Ocean between 50° N and 50° S. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 368, 53–63. <https://doi.org/10.3354/meps07586>
- Park, J.J., Wang, H., Gargouri, M., Deshpande, R.R., Skepper, J.N., Holguin, F.O., Juergens, M.T., Shachar-Hill, Y., Hicks, L.M., Gang, D.R., 2015. The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: A systems biology analysis. *Plant J.* 81, 611–624. <https://doi.org/10.1111/tpj.12747>
- Payne, R.M.E., Xu, D., Foureau, E., Teto Carqueijeiro, M.I.S., Oudin, A., De Bernonville, T.D., Novak, V., Burow, M., Olsen, C.E., Jones, D.M., Tatsis, E.C., Pendle, A., Halkier, B.A., Geu-Flores, F., Courdavault, V., Nour-Eldin, H.H., O'Connor, S.E., 2017. An NPF transporter exports a central monoterpene indole alkaloid intermediate from the vacuole. *Nat. Plants* 3. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.208>
- Pérez-Alegre, M., Dubus, A., Fernández, E., 2005. REM1, a New Type of Long Terminal Repeat Retrotransposon in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10628–10638. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.23.10628-10638.2005>
- Pérez-Vicente, R., Cárdenas, J., Pineda, M., 1991. Distinction between hypoxanthine and xanthine transport in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 95, 126–130. <https://doi.org/10.1104/pp.95.1.126>
- Pérez-Vicente, R., M.I. B., J.A. González-Reyes, J.Cárdenas, M.Pineda, 1995. Xanthine

- accumulation and vacuolization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 186, 93–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00230-8>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pfalz, J., Liebers, M., Hirth, M., Grübler, B., Holtzegel, U., Schröter, Y., Dietzel, L., Pfannschmidt, T., 2012. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Front. Plant Sci.* 3, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00257>
- Piedras, P., Cárdenas, J., & Pineda, M. 1995. Solubilization and extraction of allantoinase and allantoicase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemical Analysis*, 6(5), 239–243. <https://doi.org/10.1002/pca.2800060503>.
- Piedras, P., Pineda, M., Muñoz, J., Cárdenas, J., 1992. Purification and characterization of an l-amino-acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 188, 13–18. <https://doi.org/10.1007/BF00198934>
- Plouviez, M., Shilton, A., Packer, M.A., Guieysse, B., 2019. Nitrous oxide emissions from microalgae: potential pathways and significance. *J. Appl. Phycol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1531-1>
- Plouviez, M., Wheeler, D., Shilton, A., Packer, M.A., McLenachan, P.A., Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorra, F., Fernández, E., Guieysse, B., 2017. The biosynthesis of nitrous oxide in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 91, 45–56. <https://doi.org/10.1111/tpj.13544>
- Plumley, F.G., Schmidt, G.W., 1989. Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2678–2682. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2678>
- Pozuelo, M., Merchán, F., Macías, M.I., Beck, C.F., Galván, A., Fernández, E., 2000. The negative effect of nitrate on gametogenesis is independent of nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 211, 287–292. <https://doi.org/10.1007/s004250000291>
- Prieto, R., Pardo, J.M., Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1996. Salt-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* isolated after insertional tagging. *Plant Physiol.* 112, 99–104. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.99>
- Pröschold, T., Harris, E.H., Coleman, A.W., 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170, 1601–1610. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044503>
- Quesada, A., Galvan, A., Fernandez, E., 1994. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 5, 407–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00407.x>
- Quesada, A., Gómez-García, I., Fernández, E., 2000. Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. *Trends Plant Sci.* 5, 463–464. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01770-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01770-2)

- Quesada, A., Hidalgo, J., Fernández, E., 1998. Three Nrt2 genes are differentially regulated in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* 258, 373–377. <https://doi.org/10.1007/s004380050743>
- Ramos, G.J.P., De Mattos Bicudo, C.E., Do Nascimento Moura, C.W., 2018. Diversity of green algae (Chlorophyta) from bromeliad phytotelmata in areas of rocky outcrops and “restinga”, Bahia state, Brazil. *Rodriguesia* 69, 1973–1985. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869431>
- Raunser, S., Mathai, J.C., Abeyrathne, P.D., Rice, A.J., Zeidel, M.L., Walz, T., 2009. Oligomeric Structure and Functional Characterization of the Urea Transporter from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 387, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.005>
- Remacle, C., Eppe, G., Coosemans, N., Fernandez, E., Vigeolas, H., 2014. Combined intracellular nitrate and NIT2 effects on storage carbohydrate metabolism in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* 65, 23–33. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert339>
- Rexach, J., Fernandez, E., Galvan, A., 2000. The *Chlamydomonas reinhardtii* *Nar1* gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *Plant Cell* 12, 1441–1453. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1441>
- Rexach, J., Llamas, A., Fernández, E., Galván, A., 2002. The activity of the high-affinity nitrate transport system I (NRT2.1, NAR2) is responsible for the efficient signalling of nitrate assimilation genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 215, 606–611. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0778-5>
- Rodríguez-Palacio, M.C., Cabrera-Cruz, R.B.E., Rolón-Aguilar, J.C., Tobías-Jaramillo, R., Martínez-Hernández, M., Lozano-Ramírez, C., 2022. The cultivation of five microalgae species and their potential for biodiesel production. *Energy. Sustain. Soc.* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13705-022-00337-5>
- Sager, R., Granick, S., 1954. Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas*. *J. Gen. Physiol.* 65, 208–209. <https://doi.org/10.1126/science.65.1678.208-a>
- Salomé, P.A., Merchant, S.S., 2019. A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* 31, 1682–1707. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952>
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2015a. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Sanz-Luque, E. and Montaigu, A. D. 2018. Phenol-based Extraction of RNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bio-101*: e2910. DOI: 10.21769/BioProtoc.2910.
- Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorro, F., De Montaigu, A., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, Á., Galván, A., Fernández, E., 2015b. THB1, a Truncated Hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant J.* 81, 467–479. <https://doi.org/10.1111/tpj.12744>
- Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorro, F., Galván, A., Fernández, E., de Montaigu, A., 2016. Characterization of a Mutant Deficient for Ammonium and Nitric Oxide Signalling

- in the Model System *Chlamydomonas reinhardtii*. PLoS One 11, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155128>
- Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorra, F., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2013. Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Exp. Bot. 64, 3373–3383. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert175>
- Saroussi, S. I., Wittkopp, T. M., & Grossman, A. R. 2016. The Type II NADPH Dehydrogenase Facilitates Cyclic Electron Flow, Energy-Dependent Quenching, and Chlororespiratory Metabolism during Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to Nitrogen Deprivation. Plant physiology, 170, 1975–1988. <https://doi.org/10.1104/pp.15.02014>
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., Grossman, A.R., 2018. The natural history of model organisms from molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. Elife 7, 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.39233>
- Schmollinger, S., Mühlhaus, T., Boyle, N.R., Blaby, I.K., Casero, D., Mettler, T., Moseley, J.L., Kropat, J., Sommer, F., Strenkert, D., Hemme, D., Pellegrini, M., Grossman, A.R., Stitt, M., Schroda, M., Merchant, S.S., 2014. Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism. Plant Cell 26, 1410–1435. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122523>
- Schnell, R.A., Lefebvre, P.A., 1993. Isolation of the chlamydomonas regulatory gene NIT2 by transposon tagging. Genetics 134, 737–747. <https://doi.org/10.1093/genetics/134.3.737>
- Schreiber, U., 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview, Chlorophyll a Fluorescence. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_11)
- Seitzinger, S. P., & Sanders, R. W. 1997. Contribution of dissolved organic nitrogen from rivers to estuarine eutrophication. Marine Ecology Progress Series, 159, 1–12.
- Semler, B.L., Hodson, R.C., Williams, S.K., Howell, S.H., 1975. The induction of allophanate lyase during the vegetative cell cycle in light-synchronized cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. BBA - Gen. Subj. 399, 71–78. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(75\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(75)90212-3)
- Siaut, M., Cuiñé, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G., 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. BMC Biotechnol. 11, 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>
- Smythers, A.L., McConnell, E.W., Lewis, H.C., Mubarek, S.N., Hicks, L.M., 2020. Photosynthetic metabolism and nitrogen reshuffling are regulated by reversible cysteine thiol oxidation following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas*. Plants 9, 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants9060784>
- Solomon, C.M., Collier, J.L., Berg, G.M., Glibert, P.M., 2010. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: A biochemical and molecular review. Aquat.

- Microb. Ecol. 59, 67–88. <https://doi.org/10.3354/ame01390>
- Soupeine, E., Inwood, W., Kustu, S., 2004. Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO<sub>2</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 7787–7792. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401809101>
- Specht, E.A., Mayfield, S.P., 2014. Algae-based oral recombinant vaccines. Front. Microbiol. 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00060>
- Spudich, J.L., Sager, R., 1980. Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. J. Cell Biol. 85, 136–145. <https://doi.org/10.1083/jcb.85.1.136>
- Suppmann, B., & Sawers, G. 1994. Isolation and characterization of hypophosphite--resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter. *Molecular microbiology*, 11(5), 965–982. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00375.x>
- Takeuchi, T., Benning, C., 2019. Nitrogen-dependent coordination of cell cycle, quiescence and TAG accumulation in *Chlamydomonas*. Biotechnol. Biofuels 12, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1635-0>
- Takeuchi, T., Sears, B.B., Lindeboom, C., Lin, Y.T., Fekaris, N., Zienkiewicz, K., Zienkiewicz, A., Poliner, E., Benninga, C., 2020. *Chlamydomonas* CHT7 is required for an effective quiescent state by regulating nutrient-responsive cell cycle gene expression. Plant Cell 32, 1240–1269. <https://doi.org/10.1105/TPC.19.00628>
- Tietz, N.W. 1995. Clinical Guide to Laboratory Test. 3rd Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, 384-387.
- Timilsina, A., Zhang, C., Pandey, B., Bizimana, F., Dong, W., Hu, C., 2020. Potential Pathway of Nitrous Oxide Formation in Plants. Front. Plant Sci. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01177>
- Torres, M.J., González-Ballester, D., Gómez-Osuna, A., Galván, A., Fernández, E., Dubini, A., 2022. *Chlamydomonas-Methylobacterium oryzae* cooperation leads to increased biomass, nitrogen removal and hydrogen production. Bioresour. Technol. 352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127088>
- Tran, P.T., Sharifi, M.N., Poddar, S., Dent, R.M., Niyogi, K.K., 2012. Intragenic enhancers and suppressors of Phytoene desaturase mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. PLoS One 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042196>
- Tsai, C.H., Uygun, S., Roston, R., Shiu, S.H., Benning, C., 2018. Recovery from N deprivation is a transcriptionally and functionally distinct state in *Chlamydomonas*. Plant Physiol. 176, 2007–2023. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01546>
- Tsai, C.H., Warakanontb, J., Takeuchic, T., Sears, B.B., Moellering, E.R., Benningc, C., 2014. The protein compromised hydrolysis of triacylglycerols 7 (cht7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 15833–15838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414567111>
- Turkina, M. V., Kargul, J., Blanco-Rivero, A., Villarejo, A., Barber, J., Vener, A. V., 2006. Environmentally modulated phosphoproteome of photosynthetic membranes in the

- green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1412–1425. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600066-MCP200>
- Urzica, E.I., Vieler, A., Hong-Hermesdorf, A., Page, M.D., Casero, D., Gallaher, S.D., Kropat, J., Pellegrini, M., Benning, C., Merchant, S.S., 2013. Remodeling of membrane lipids in iron-starved *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 288, 30246–30258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490425>
- Vallon, O., Bulté, L., Kuras, R., Olive, J., Wollman, F.-A. 1993. Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS*, 215, 351–360.
- van Kooten, O., F.H. Snel, J., 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, 147–150.
- Vidal, E.A., Alvarez, J.M., Araus, V., Riveras, E., Brooks, M.D., Krouk, G., Ruffel, S., Lejay, L., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., Gutiérrez, R.A., 2020. Nitrate in 2020: Thirty years from transport to signaling networks. *Plant Cell* 32, 2094–2119. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00748>
- Von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., Frommer, W.B., 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 254–261. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00073-X)
- Wang, L., Yamano, T., Kajikawa, M., Hirono, M., Fukuzawa, H., 2014. Isolation and characterization of novel high-CO<sub>2</sub>-requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 121, 175–184. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9983-x>
- Wang, Z.T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., Goodenough, U., 2009. Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 8, 1856–1868. <https://doi.org/10.1128/EC.00272-09>
- Weathers, P.J., 1984. N<sub>2</sub>O evolution by green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1251–1253. <https://doi.org/10.1128/AEM.48.6.1251-1253.1984>
- Wei, L., Derrien, B., Gautier, A., Houille-Vernes, L., Boulouis, A., Saint-Marcoux, D., Malnoë, A., Rappaport, F., de Vitry, C., Vallon, O., Choquet, Y., Wollman, F.A., 2014. Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 26, 353–372. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120121>
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G., Camire, M.E., Brawley, S.H., 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* 29, 949–982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>
- Westhoff, C.M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D.O.D., Kevin Foskett, J., 2002. Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J. Biol. Chem.* 277, 12499–12502. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200060200>

- Williams, S.K., Hodson, R.C., 1977. Transport of urea at low concentrations in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Bacteriol. 130, 266–273. <https://doi.org/10.1128/jb.130.1.266-273.1977>
- Yamano, T., Sato, E., Iguchi, H., Fukuda, Y., Fukuzawa, H., 2015. Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 7315–7320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501659112>
- Yamaoka, Y., Shin, S., Choi, B.Y., Kim, H., Jang, S., Kajikawa, M., Yamano, T., Kong, F., Légeret, B., Fukuzawa, H., Li-Beisson, Y., Lee, Y., 2019. The BZIP1 transcription factor regulates lipid remodeling and contributes to ER stress management in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 31, 1127–1140. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00723>
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., 2005. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. Cell 120, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.044>
- Yohn, C. Mendez, M. Behnke, C and Brand, A. 2011. Stress-induced Lippid trigger (U.S Patent No. WO/2011/097261) U.S.Patent and Trademark Office. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011097261>
- Yoon, Y., Seo, D.H., Shin, H., Kim, H.J., Kim, C.M., Jang, G., 2020. The role of stress-responsive transcription factors in modulating abiotic stress tolerance in plants. Agronomy 10, 1–23. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060788>
- Yoshihara, C., Inoue, K., Schichnes, D., Ruzin, S., Inwood, W., Kustu, S., 2008. An Rh1-GFP fusion protein is in the cytoplasmic membrane of a white mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Plant 1, 1007–1020. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn074>
- Yu, C.W., Lin, Y.T., Li, H. min, 2020. Increased ratio of galactolipid MGDG : DGDG induces jasmonic acid overproduction and changes chloroplast shape. New Phytol. 228, 1327–1335. <https://doi.org/10.1111/nph.16766>
- Zalutskaya, Z., Kochemasova, L., Ermilova, E., 2018. Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle. BMC Plant Biol. 1–10.
- Zalutskaya, Z., Ostroukhova, M., Filina, V., Ermilova, E., 2017. Nitric oxide upregulates expression of alternative oxidase 1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Plant Physiol. 219, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.10.004>
- Zamora, I., Feldman, J.L., Marshall, W.F., 2004. PCR-based assay for mating type and diploidy in *Chlamydomonas*. Biotechniques 37, 534–536. <https://doi.org/10.2144/04374bm01>
- Zhang, D., Lefebvre, P.A., 1997. FAR1, a negative regulatory locus required for the repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics 146, 121–133. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.1.121>
- Zhou, J., Kleinhofs, A., 1996. Molecular evolution of nitrate reductase genes. J. Mol. Evol. 43, 1–10.

- 42, 432–442. <https://doi.org/10.1007/BF02498637>
- Zhou, J.J., Fernández, E., Galván, A., Miller, A.J., 2000. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Lett.* 466, 225–227. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01085-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01085-1)
- Zou, Y., Wenzel, S., Müller, N., Prager, K., Jung, E.M., Kothe, E., Kottke, T., Mittag, M., 2017. An animal-like cryptochrome1 controls the *Chlamydomonas* sexual cycle. *Plant Physiol.* 174, 1334–1347. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00493>
- Zuo, Z., Rong, Q., Chen, K., Yang, L., Chen, Z., Peng, K., Zhu, Y., Bai, Y., Wang, Y., 2012. Study of amino acids as nitrogen source in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phycol. Res.* 60, 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00646.x>



## **ANEXOS**

---



## **ANEXO I**

---





Review

# *Chlamydomonas reinhardtii*, an Algal Model in the Nitrogen Cycle

Carmen M. Bellido-Pedraza <sup>1</sup>, Victoria Calatrava <sup>1,†</sup>, Emanuel Sanz-Luque <sup>1</sup>,  
Manuel Tejada-Jiménez <sup>1</sup>, Ángel Llamas <sup>1</sup>, Maxence Plouviez <sup>2</sup>, Benoit Guieysse <sup>2</sup>,  
Emilio Fernández <sup>1,\*</sup> and Aurora Galván <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales y Campus Internacional de Excelencia Agroalimentario (CeIA3), Edif. Severo Ochoa, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; b22bepec@uco.es (C.M.B.-P.); b82capom@uco.es (V.C.); q92salue@uco.es (E.S.-L.); q62tejim@uco.es (M.T.-J.); bb2llaza@uco.es (Á.L.)

<sup>2</sup> School of Food and Advanced Technology, Massey University, Private Bag, 11222 Palmerston North, New Zealand; M.Plouviez@massey.ac.nz (M.P.); B.J.Guieysse@massey.ac.nz (B.G.)

\* Correspondence: bb1feree@uco.es (E.F.); bb1gacea@uco.es (A.G.)

† Current address: Department of Plant Biology, Carnegie Institution for Science, Stanford, CA 94305, USA.

Received: 22 June 2020; Accepted: 13 July 2020; Published: 16 July 2020



**Abstract:** Nitrogen (N) is an essential constituent of all living organisms and the main limiting macronutrient. Even when dinitrogen gas is the most abundant form of N, it can only be used by fixing bacteria but is inaccessible to most organisms, algae among them. Algae preferentially use ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) for growth, and the reactions for their conversion into amino acids (N assimilation) constitute an important part of the nitrogen cycle by primary producers. Recently, it was claimed that algae are also involved in denitrification, because of the production of nitric oxide (NO), a signal molecule, which is also a substrate of NO reductases to produce nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), a potent greenhouse gas. This review is focused on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as an algal model and its participation in different reactions of the N cycle. Emphasis will be paid to new actors, such as putative genes involved in NO and N<sub>2</sub>O production and their occurrence in other algal genomes. Furthermore, algae/bacteria mutualism will be considered in terms of expanding the N cycle to ammonification and N fixation, which are based on the exchange of carbon and nitrogen between the two organisms.

**Keywords:** algae; *Chlamydomonas*; nitrogen cycle; nitric oxide; nitrous oxide

## 1. Introduction

Nitrogen (N) is an essential macronutrient that supports life in all living beings. This nutrient is an elemental constituent of biomolecules, such as nucleic acids, proteins, chlorophylls, cofactors, and signal molecules, among others.

In nature, living organisms can use different N reservoirs, and the biotic and abiotic conversions among different N forms constitute the biogeochemical N cycling. These N reservoirs and N flux in terrestrial and marine ecosystems have been recently reviewed [1]. Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) bound into rocks and sediments is the largest N reservoir (1.8 × 10<sup>10</sup> Tg nitrogen). However, this NH<sub>4</sub><sup>+</sup> has a minimal impact on the annual N cycling because it is accessible only upon erosion [1]. The largest available N reservoir for organisms is dinitrogen gas (N<sub>2</sub>) with 3.9 × 10<sup>9</sup> Tg, which represents 79% of the atmospheric air. However, due to the reduced reactivity of the triple bonded N<sub>2</sub>, only a small group of organisms having the dinitrogenase enzyme complex can use it as N source [1–3]. The global and usable N-reservoirs are organic nitrogen (9 × 10<sup>5</sup> Tg), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (6 × 10<sup>5</sup> Tg), and nitrous

oxide ( $N_2O$ ) (2000 Tg) [1–4]. The ammonia ( $NH_3$ ) reservoir estimated in the marine ecosystem is 340–3600 Tg, but it is unknown in the terrestrial ecosystem [1]. Other global inorganic N sources such as nitrite and nitric oxide are considered minor reservoirs.

N compounds exhibit different oxidation states ranging from  $-3$  (organic N and  $NH_3/NH_4^+$ ) to  $+5$  ( $NO_3^-$ ), with intermediate values in compounds such as hydrazine ( $N_2H_4$ ) ( $-2$ ), hydroxylamine ( $NH_2OH$ ) ( $-1$ ),  $N_2$  ( $0$ ), nitrous oxide ( $N_2O$ ) ( $+1$ ),  $NO$  ( $+2$ ), nitrite,  $NO_2^-$  ( $+3$ ), and nitrogen dioxide ( $NO_2$ ) ( $+4$ ). Bacteria can catalyze many redox reactions involving the above compounds, which can be used to provide nitrogen for growth and redox energy to fuel cells. Bacterial species have been classically classified according to the reactions that they mediate within the N cycle (nitrification, denitrification, fixation, ammonification, anammox, assimilatory, and dissimilatory processes). Notwithstanding, DNA genome sequencing has revealed the set of genes present in each microorganism and highlighted the enormous metabolic flexibility of some of the organisms studied, making it almost impossible to classify them using only the classical divisions [1,2]. Moreover, it is expected that further research will unravel new N-transforming reactions and enzymes that will emphasize the metabolic flexibility of many of these organisms [1].

Prokaryotic organisms exhibit an enormous versatility to metabolize most of the N compounds, and they are the main players for most of the transformations in the N cycle. In addition, enzymes required for  $N_2$  fixation, such as nitrogenase, are exclusively found in prokaryotes or bacteria involved in symbiosis/mutualism with other eukaryotic organisms. For instance,  $N_2$ -fixing bacteria from the order Rhizobiales establish symbiotic interactions with legume plants, whose crops provide almost 20% of food protein in the world [5]. Other examples are found in marine ecosystems, where a symbiotic interaction between the haptophyte algae and the most widespread  $N_2$ -fixing cyanobacterium '*Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*' (UCYN-A) has been described [6,7]. In the lab, the  $N_2$ -fixing bacterium *Azotobacter chroococcum* provides N to the alga *Chlamydomonas* and promotes its growth, whereas *Chlamydomonas* fixes  $CO_2$  and provides organic carbon to the bacterium. This symbiotic interaction has reported benefits for the industry by increasing lipid production in the microalga [8].

Anthropomorphic activities have affected the natural equilibrium of the N cycle for more than a century. The industrial  $N_2$ -fixation into ammonia (Haber-Bosch process) and the use of this ammonia as fertilizers has dramatically improved crop productivity but, at the same time, it has increased the reactive N load by more than 120%, which includes all biologically active, photochemically reactive, and radiatively active N compounds in the atmosphere and biosphere [1,2,9,10]. This increase in the N load comprises a higher global amount of reduced inorganic forms of N ( $NH_3$  and  $NH_4^+$ ), oxidized inorganic forms (as  $NO_x$ ,  $HNO_3$ ,  $N_2O$ , and  $NO_3^-$ ), and organic compounds (such as urea, amines, and proteins), in detriment to the unreactive  $N_2$  gas. One of the main unwanted effects of this imbalance in the N cycle is the transfer of reactive N from terrestrial to coastal systems and ground waters, causing algal blooms and the eutrophication of these ecological niches [9,10]. In addition, it is estimated that 3–5% of the N used in fertilizers is converted into  $N_2O$ , a greenhouse gas that is 310 times more potent than  $CO_2$  and considered the dominant ozone-depleting pollutant emitted in the 21st century [1,11–13]. The principal substrate for  $N_2O$  synthesis is  $NO$ , which is mainly reduced by bacterial  $NO$  reductases but also can be reduced by some eukaryotic enzymes that carry out nitrate dissimilatory reactions.

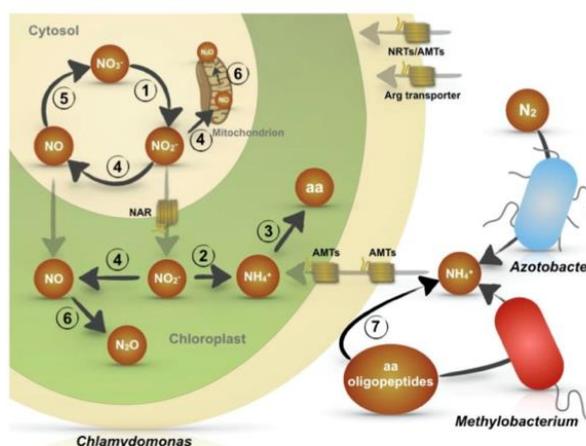
Nitrogen is a macronutrient for plants, algae, and bacterial growth. Nitrate is the most oxidized form of nitrogen and highly abundant in aquatic habitats. The nitrate assimilation pathway ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+ \rightarrow$  amino acids) is quantitatively the most important redox process, supporting almost 20% of marine algal growth [1,4]. Dissimilatory nitrate reduction pathways such as dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), denitrification to  $N_2O$ , and total denitrification to  $N_2$  are also processes mediated by eukaryotes in aquatic systems. DNRA is described in diatoms as an adaptation and survival process to darkness and anoxia, where the intracellular  $NO_3^-$  is used as an electron acceptor instead of  $O_2$  [14,15]. On the other hand, a complete denitrification process ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ ) has been described in some species belonging to the foraminifera

group, which represent the only eukaryotic organisms able to perform complete denitrification to  $N_2$  [16–18]. Other foraminifer species perform only partial nitrate denitrification to  $N_2O$  [17–19]. The genes involved in the foraminifer denitrification pathway have been recently identified [20]; however, the genes encoding the enzymes responsible for the first and last steps of this pathway, the dissimilatory nitrate reductases and nitrous oxide reductase, are missing in most of the foraminifer genomes but found in the associated bacteria. Partial nitrate denitrification to  $N_2O$  has also been well documented in fungi [21–25] and recently described in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, where a NO reductase (CYP55) [26] and flavodiiron proteins (FLVs) [27] catalyze the reduction of NO to  $N_2O$  in dark and light conditions, respectively. These two proteins constitute the molecular evidence that supports that microalgae contribute to  $N_2O$  emissions, something known for decades [28]. In this review, we analyze the metabolic flexibility of microalgae to carry out different steps of the N cycle with special attention to the denitrification pathway.

## 2. The Role of *Chlamydomonas reinhardtii* in the N Cycle

Traditionally the genus *Chlamydomonas* corresponds to unicellular, biflagellate, green microalgae and encompasses more than 500 species. However, current phylogenetic studies have reevaluated the taxonomy of *Chlamydomonas* into three species: *C. reinhardtii*, *C. incerta*, and *C. schloesseri* [29,30]. Today, all the unequivocally identified *C. reinhardtii* cells have been isolated from soil habitats suggesting a preference for rich nutrient environments. *Chlamydomonas* spp., other than *C. reinhardtii*, have been isolated from very different environments such as acid mine drainage, temperate marine, Antarctic ice, and even air [29]. *C. reinhardtii*, named as *Chlamydomonas* throughout, has been developed as a powerful model organism useful to study essential biological processes but also biotechnological applications [31].

Nitrogen assimilation has been widely studied in *Chlamydomonas* and the pathways for the assimilation of different forms of nitrogen, inorganic (nitrate, nitrite, and ammonium) as well as organic (urea, amino acids, and purines), have been identified [32–34]. However, besides the classical N assimilation pathways that have been described in axenic *Chlamydomonas* cultures, recent advances on nitrogen-transforming reactions have revealed that this microalga can also carry out both an ammonification process by mutualistic interactions with bacteria and a denitrification process that releases  $N_2O$  to the environment (Figure 1, Table 1).



**Figure 1.** Nitrogen-transforming reactions by *Chlamydomonas reinhardtii*.  $NO_3^-$  assimilation (steps 1,2,3);  $NO_3^-/NO_2^-$  cycle, (steps 1,4,5);  $NO_3^-$  dissimilation (steps 4,6) and ammonification from amino acids and peptides (step 7). Transporters for ammonium (AMT), nitrate (NRT), and arginine are indicated. Mutualism with bacteria for N/C exchange is also shown.

**Table 1.** Enzymes for nitrogen-transformation reactions in *Chlamydomonas*.

Step	Enzyme	Gene ID	Regulation	Localization	Ref.
1	$\text{NO}_3^- + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	NR	$\text{NO}_3^-$	Cytosol	[33]
2	$\text{NO}_2^- + 6e^- + 8\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	NIR	$\text{NO}_3^-$	Cytosol	[33]
3	$\text{NH}_4^+ + 2e^- + \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glutamate} + \text{ADP} + \text{P}_i$	GS/GOGAT			[33]
4	$\text{NO}_2^- + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	NR/NOFNIR NirK	$\text{NO}_3^-$ Dark	Cytosol Mitochondria	[35] [36]
5	$\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 3e^- + 4\text{H}^+$	NR/THB1 CYP55	$\text{NO}_3^-$ $\text{NO}_3^-/\text{Dark}$	Cytosol Mitochondria *	[37] [38]
6	$2\text{NO} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	FLVA	-	Chloroplast	[27]
		FLVB	-	Chloroplast	[27]
		HCP1	$\text{NO}_3^-/\text{Dark}$	Chloroplast	[39]
		HCP2	$\text{NO}_3^-$	Mitochondria *	[38]
		HCP3	$\text{NO}_3^-/\text{Dark}$	Chloroplast	[39]
7	$\text{L-Amino acid} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+ + \alpha\text{-keto acid} + \text{H}_2\text{O}_2$	HCP4	$\text{NO}_3^-/\text{Dark}/\text{anaerobiosis}$	Chloroplast	[40]
		LAO1	Nitrogen starvation	Periplasm	[35]

Steps 1 to 7 correspond to those in Figure 1. Gene identification (Phytozome). \* Protein identified in the mitoproteome. NR (Nitrate Reductase), NIR (Nitrite Reductase), GS (Glutamine Synthetase), GOGAT (Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase), NOFNIR (NO Forming Nitrite Reductase), NirK (Copper-Containing Nitrite Reductase), THB1 (Truncated Hemoglobin 1), CYP55 (Cytochrome P450), FLV (Flavodiiron Proteins), HCP (Hybrid Cluster Protein) and LAO1 (L-Amino Acid Oxidase).

### 2.1. Ammonification and Mutualism with Bacteria for N Scavenging from Amino Acids and Peptides

*Chlamydomonas* cells scavenge nitrogen from amino acids in three ways: transport, deamination/ammonification, and mutualistic interaction with bacteria [41]. Arginine is the only amino acid that is efficiently transported into the cell from the surrounding media and then used as carbon and nitrogen sources [42]. L-leucine and L-cysteine is also transported, but by passive diffusion [43]. However, most of the proteinogenic amino acids, including arginine, but also di- and tri-peptides, can be extracellularly deaminated, producing  $\text{NH}_4^+$  and the corresponding keto acids. This ammonification process is mediated by the periplasmic L-amino acid oxidase (LAO1) (step 7, Figure 1, and Table 1), which is induced upon inorganic N deprivation [41,44–47]. Interestingly, only the  $\text{NH}_4^+$  generated by the LAO1 enzyme is transported inside the cell by high-affinity ammonium transporters (AMT) and used by the alga, but the carbon skeletons remain in the medium [47]. It has been hypothesized that such carbon skeletons could be used for establishing mutualistic interactions with specific bacteria in the surrounding medium. These interactions depend on whether the released keto acid can meet the particular carbon requirements of a specific bacterium [41]. Besides ammonium and the keto acid, the ammonification process mediated by LAO1 also generates  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which has bactericidal properties [48]. The eco-physiological role of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , if any, is not clear but its production could repel other microorganisms to avoid competition for the organic N and, simultaneously, promote bacterial cell death making more N available. Alternatively,  $\text{H}_2\text{O}_2$  synthesis could also serve as a mechanism to select specific  $\text{H}_2\text{O}_2$ -tolerant bacterial species in order to restrict the mutualistic interactions. The role of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in algal-bacterial mutualistic interaction has been previously reported [49].

*Chlamydomonas* LAO1 homologs have been found in other algal species, including Rhodophyta, Alveolata, Heterokonta, Haptophyta, and Dinophyta species, but not in other chlorophytes [41].

Despite the promiscuous LAO1 activity to deaminate amino acids and oligopeptides, Calatrava and collaborators [50] have reported that this enzyme cannot use proline and some oligopeptides as substrate. Interestingly, when proline is the only N source in the media, *Chlamydomonas* can establish a strict and specific mutualism with *Methylobacterium* species [50]. Under this situation, the bacteria mineralize the amino acid (or peptide) releasing ammonium that can be incorporated by the alga. In return, *Chlamydomonas*, which fixes  $\text{CO}_2$  to satisfy its carbon demand, produces C-compounds as glycerol that can be secreted and used as a C source for the bacterium.

Another step in which *Chlamydomonas* could participate in the N cycle is the use of  $\text{N}_2$ , as described from co-cultures with the nitrogen-fixing anaerobic bacteria *Azotobacter chroococcum*. In this situation, the bacteria supply the nitrogen source and  $\text{CO}_2$  to the alga by nitrogen fixation, meanwhile, the alga supplies carbohydrates and  $\text{O}_2$  via photosynthesis to the bacteria [8].

## 2.2. Nitrate Denitrification

The nitrate flux toward its assimilation is the primary nitrogen pathway that occurs in *Chlamydomonas* as well as in eukaryotic organisms containing an assimilatory nitrate reductase (NR). The nitrate assimilation appears to occur via a relatively simple linear pathway involving (1) nitrate uptake by specific nitrate transporters (i.e., NRT2.1/NAR2), (2) cytosolic nitrate reduction by a typical eukaryotic nitrate reductase (NR), (3) nitrite transport into the chloroplast by specific transporters (i.e., NAR1.1), (4) nitrite reduction to ammonium by a typical plant-like ferredoxin-dependent nitrite reductase (NIR), and finally (5) the ammonium incorporation into carbon skeletons by the GS/GOGAT cycle that synthesizes glutamate [33,34].

Besides its assimilatory role, the NR is a moonlighting protein that interacts with different partners to carry out alternative reactions. In photosynthetic organisms, NR is considered one of the principal nitric oxide (NO) sources [35] and also participates, as shown in *Chlamydomonas*, in the NO oxygenation to convert this signaling molecule back to nitrate. These reactions, in which NR is central and acts with different partners, can be called the  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$  cycle (steps 1, 4, and 5 in Figure 1). Moreover, the intracellular NO can also be the substrate for NO reductases producing  $\text{N}_2\text{O}$  in mitochondria and chloroplasts [1]. Thus, NR seems to be a cross-point among three different pathways: nitrate assimilation, a partial nitrate-denitrification to NO and the contaminant gas  $\text{N}_2\text{O}$ , and the NO oxygenation to nitrate.

### 2.2.1. The $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$ Cycle

The eukaryotic NR is a homo-dimeric protein that contains three prosthetic groups in each subunit (FAD, Heme  $b_{557}$ , and molybdenum cofactor –Moco-). Nitrate reduction to nitrite is a redox reaction that occurs across a mini electron transport chain (mini-ETC) from NAD(P)H to nitrate through three prosthetic groups ( $\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{heme} \rightarrow \text{Moco} \rightarrow \text{NO}_3^-$ ). However, as mentioned above, NR can bind to other protein partners and detour electrons at different levels of this mini-ETC. When the partner protein is the molybdoprotein NOFNIR (NO forming nitrite reductase), electrons flow until the heme cofactor, where they reduce the NOFNIR that converts nitrite to NO [35,51]. When the partner is the truncated hemoglobin 1 (THB1), electrons go out of the mini-ETC at the FAD cofactor level and reduce the THB1 protein, which transforms NO into nitrate [33]. These three reactions constitute the named  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$  cycle.

Nitric oxide is a signal molecule that regulates a high number of physiological processes in mammals, plants, and algae [52]. In *Chlamydomonas*, NO regulates N assimilation at the transcriptional and posttranslational level. NO is a negative regulator for the expression and activities of the high-affinity nitrate/nitrite transporters, the NR, and the high-affinity ammonium transporters [33,53]. As a signal molecule, NO is expected to have a temporal effect, and therefore, its synthesis and degradation have to be tightly controlled.

This  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$  cycle could work for regulating nitrate assimilation without N loss. When the conditions are optimal, nitrate goes toward its assimilation up to glutamate. If the conditions are not optimal (i.e.,  $\alpha$ -ketoglutarate is deficient) and nitrite accumulates, NO is synthesized and stops the nitrate uptake and reduction. However, although NO is a gas and can diffuse out of the cells, the NR-THB complex could convert the NO into nitrate, avoiding the N loss.

### 2.2.2. NO Synthesis and Reduction: A Prokaryote Pathway

In plants and plant-like organisms, NO is produced by different mechanisms that use different substrates (i.e.,  $\text{NO}_2^-$  or arginine) in different intracellular compartments such as cytosol [35,54,55], mitochondria [26,56], chloroplast [57,58], and peroxisomes [59]. The oxidation of arginine to NO and citrulline by the NO synthase (NOS) is a well-known reaction in mammals, bacteria, and some algae [60,61]. NOS-like reactions have been described in land plants (peroxisomes) [62] and *Chlamydomonas* [63], but extensive genome analyses have ruled out the existence of NOS in

photosynthetic organisms except for some microalgae [60,61]. However, NO production from  $\text{NO}_2^-$  is well documented to occur in the cytosol, by NR [54,55] or NR/NOFNIR [35], and also in mitochondria [26,56] and chloroplast by the electron transport chains [57].

Besides NO conversion into nitrate, NO can also be reduced by NO reductases to  $\text{N}_2\text{O}$ . This denitrification process implies the loss of nitrogen to the atmosphere as a potent greenhouse gas. This pathway ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) has been well defined in both prokaryotes [1] and eukaryotes (fungi). In fungi, denitrification involves NIRK (copper-containing nitrite reductase) ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ) and the cytochrome P450, CYP55 ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ), both acquired from bacteria [22]. For fungal CYP55, a horizontal gene transfer from bacteria is suggested, but for NIRK, a proto-mitochondrial origin has been proposed.

The *Chlamydomonas* genome contains two genes encoding for both proteins, NIRK and CYP55 (Table 1). CYP55 appears to be responsible for  $\text{N}_2\text{O}$  production in the dark [26,27]. Accordingly, CYP55 is located in mitochondria [38] and its transcript is accumulated in the dark [64] and in the presence of nitrate [38]. The dark NO reduction attributed to CYP55 activity has also been shown to be stronger when cells are grown in the presence of nitrate [27]. Although found in the mitochondrial proteome, CYP55 is also predicted to be targeted to the chloroplast [27]. Thus, it is possible that the protein is targeted to both organelles. In this case, CYP55 could be able to use electron donors from photosynthetic origin. Like CYP55, NIRK is also up-regulated in the dark [64] and in nitrate-containing media (Calatrava, unpublished data). In silico analyses strongly suggest that NIRK could also be localized in the mitochondria (Table 1), pointing out that *Chlamydomonas* seems to have a complete and operative  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  pathway in the mitochondria.

The second type of protein shown to reduce NO to  $\text{N}_2\text{O}$ , in *Chlamydomonas*, corresponds to FLVs (flavodiiron proteins) [27]. Flavodiiron proteins belong to a singular family of oxygen and/or nitric oxide reductases widespread in prokaryote and eukaryote organisms. This protein family has been classified into eight classes (A to H) according to the presence of modular domains [65,66]. Class A FDPs are the most dominant class in the family and only contain the two core domains (Fe-Fe and FMN) [65,66]. Some examples for this class A show a preference for  $\text{O}_2$  as revealed for the protozoal and archaeal enzyme [67–70], or they may have a dual activity toward NO and  $\text{O}_2$  as in *M. thermoacetica* or *D. gigas* [71,72]. Class B FDPs contain an additional C-terminal rubredoxin domain and, because of that, were named flavorubredoxins (FIRD) or NORV (from the encoding gene in *E. coli*) [65]. In *E. coli*, FLVB/FIRD/NORV was shown to have significant preference for NO over  $\text{O}_2$  and confers resistance to NO under anaerobic conditions [73,74]. Class C FDPs have a C-terminal flavin-binding domain, predicted to have a flavin reductases activity accepting electrons from NAD(P)H [65,66]. This class C is present in cyanobacteria, the protozoan *Paulinella chromatophora*, green algae, mosses, lycophytes, and gymnosperms, but absent in angiosperms [65]. *Chlamydomonas* FDPs correspond to class C (also called Flv), which forms a distinct cluster that falls into two groups. One of these groups (FlvA) has the ligand binding diiron site strictly conserved, while in the other (FlvB) the ligand binding sites are not conserved. The *Chlamydomonas* genome contains two genes, *FLVA* and *FLVB*, encoding both groups of flavodiiron proteins. Moreover, the *Chlamydomonas* FLVs could work as a heterodimer as shown by different insertional mutants of the *FLVB* gene that result in the loss of expression of both *FLVB* and *FLVA* proteins [71]. The study of these mutants revealed that FLVs participate in a Mehler-like reduction of  $\text{O}_2$ , providing an alternative valve for electrons during the dark to light transition in the chloroplast. Thus, FLVs are critical for the algal growth under fluctuating light regimes but not in continuous light [75]. These mutants were also useful to prove the FLVs role as a NO reductase, being the major enzyme responsible for NO reduction to  $\text{N}_2\text{O}$  under conditions of light in the presence of  $\text{O}_2$  in *Chlamydomonas*. In addition, in vivo experiments suggest that *Chlamydomonas* FLVs shows a higher affinity for NO than for  $\text{O}_2$  [27]. Therefore, *Chlamydomonas* has inherited two types of  $\text{N}_2\text{O}$ -producing proteins, FLVs in the chloroplast and CYP55 in the mitochondria.

Besides CYP55 and FLVs, the *Chlamydomonas* genome also contains four genes encoding for hybrid cluster proteins (HCPs) [39], which are metalloproteins characterized by the presence of an

iron-sulfur-oxygen cluster considered to be unique in biology [25]. The analysis of these protein sequences and their phylogenetic analyses support that the HCP family has emerged from a single gene of an alpha-proteobacterium with subsequent duplications in *Chlamydomonas* [39]. Like for CYP55 and NIRK, both nitrate and darkness contribute to the strong up-regulation of the HCPs in *Chlamydomonas* growing under oxic conditions [39]. In dark anoxia, the HCP4 transcript shows the stronger induction [76], and the studies performed in mutants obtained by gene silencing suggest a role in regulating fermentative and nitrogen metabolism pathways [77]. Concerning their cellular localization, HCP1, 3, and 4 are predicted to be in the chloroplast [39], but HCP2 is located in the mitochondria, as confirmed in mito-proteome analysis [38]. In bacteria, the function(s) of HCP is debated. Initially, they were considered hydroxylamine reductases, as they can use this substrate to produce ammonium in vitro, but the low affinity for hydroxylamine has questioned this physiological role [78]. Later, Wang and collaborators demonstrated that *E. Coli* HCP is a high-affinity nitric oxide (NO) reductase and proposed it as the major enzyme for reducing NO to N<sub>2</sub>O under physiologically relevant conditions [25]. The in vivo high affinity NOR activity is also demonstrated in *Methylobacter tundripaludum*, where NO mediates a response to hypoxia, quorum sensing, the secondary metabolite tundenone, and methanol dehydrogenase [79]. What makes the history of HCP attractive is that it can function as a protein S-nitrosylase with a role in the NO sensing pathway. Thus, HCP is auto-S-nitrosylated and afterward results in the assembly of an HCP interactome, including enzymes that generate NO, synthesize SNO-proteins, and propagate SNO-based signaling mediating the NO-mediated stress responses [80]. The function(s) of HCP in *Chlamydomonas* as NOR and or protein-S-nitrosylase has to be solved as well as its relationship with nitrate metabolism. Seth and collaborators propose that HCPs oxidize NO to NO<sup>+</sup>, which is the form required for S-nitrosylation [80]. However, the redox potentials of both HCP and HCR (HCP reductase, also required for HCP function) do not fit with an oxidase activity and Lis et al. have proposed that HCPs might exhibit reductase activity and perform the following two-electron reduction reaction,  $\text{NO}_3^- + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$  [39].

### 3. N<sub>2</sub>O Production and Enzymes in Other Microalgae

For decades, N<sub>2</sub>O emission has been detected from lakes, coasts, and oceans, ecosystems where microalgae are mainly present [81], although the contribution of microalgae to these N<sub>2</sub>O emissions has been mostly neglected and attributed to the prokaryotic organisms present in these environments [28,82–84]. However, the correlation between algal bloom events, triggered by the excess of N from anthropogenic origins, and N<sub>2</sub>O emissions suggests that these microorganisms may be partly responsible for this production [1,28,83]. Importantly, many microalgae are currently cultivated at a large scale for commercial and biotechnological purposes. Therefore, the potential contribution to N<sub>2</sub>O emissions of these microalgae should be considered [26,28]. Microalgae cultures, supplied with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as the sole N source, have been estimated to emit N<sub>2</sub>O in amounts 2.5 to 14 times more than from natural vegetation [85,86]. Although the emission of N<sub>2</sub>O by microalgae depends on many environmental factors, the major ones seem to be the species of microalga and the N source [26,27,87]. While N<sub>2</sub>O is produced on nitrate or nitrite, its production is prevented on ammonium [28].

The existence of a full NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub>O dissimilation pathway in *Chlamydomonas* made interesting the analysis of other microalgae genomes. Public algal databases were searched for homologous proteins to the *Chlamydomonas* NIRK, possibly involved in NO synthesis and CYP55, FLVs, HCP as potential NO reductases. Those microalgae containing at least one of these proteins were selected. A total of 33 microalgae were considered, 23 Chlorophyta and 10 non-Chlorophyta species. Considering there are around one hundred microalgae genomes available, it can be assumed that almost 33% of microalgae contain at least one of these proteins. Phylogenetic trees of these proteins were constructed to provide a broader picture of the distribution of these proteins in the tree of life consistent with previous reports for FLV [65] (Figure S1), HCP [39] (Figure S2), CYP55 [88] (Figure S3), and NIRK [21] (Figure S4). These data were correlated to the production of N<sub>2</sub>O by the microalgae (Table 2) and discussed.

**Table 2.** Microalgal production of N<sub>2</sub>O and putative NIRK proteins, involved in NO formation, and putative HCP, CYP55, and FLV, involved in NO reduction to N<sub>2</sub>O.

Microalgae	NIRK	HCP	CYP55	FLVA	FLVB	N <sub>2</sub> O/Ref.
1-7 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PNW79625.1	XP_001694756.1 XP_001694571.1 XP_001694671.1 XP_001694454.1 GAX74118.1	XP_001700272.1	XP_001692916.1	PNW71243.1	+ [26,27]
<i>Chlamydomonas eustigma</i> <i>Chlorella variabilis</i> <i>Chlorella sorokiniana</i>	PRW57688.1	XP_005851548.1 PRW58172.1 PRW60486.1 PRW58278.1	XP_005848845.1 PRW58571.1 (A) PRW58572.1 (B)	GAX73888.1 XP_005849742.1 PRW59370.1	GAX73438.1 XP_005849474.1 PRW58882.1	+ [27]
<i>Scenedesmus obliquus</i> UTEX 393	SZX67391.1	ID:15469 ID:3042	ID:435	SZX62872.1 SZX76545.1	SZX63966.1 SZX63966.1	+ [89]
<i>Scenedesmus obliquus</i> EN0004	ID:579459	ID:571596 ID:618262 NSK_004142	ID:324854	ID:321778/332768 ID:342393	XP002948938.1	+ [89]
<i>Nannochloropsis salina</i> <i>Nannochloropsis oceanica</i> CCMP1779		599317				+ [90,91]
<i>Nannochloropsis gaditana</i> <i>Gonium pectorale</i>		XP_005853562.1 KXZ41847.1 KXZ44628.1	KXZ42279.1	KXZ51271.1	KXZ42718.1	- [27]
<i>Coccomyxa subelipsoidea</i> <i>Tetraena socialis</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i>		PNH09786.1 GBF99305.1 GBF96263.1	GBF95475.1	GBF88523.1	GBF98453.1	+ [27]
<i>Volvox carteri</i> <i>Yamagishiella unicocca</i> <i>Micractinium conductrix</i>		XP_002952683.1 ARO50069.1 PSC73563.1 PSC72373.1 PSC68490.1		XP_002947563.1	XP_002948938.1	
<i>Micromonas pusilla</i> <i>Micromonas commoda</i>				XP_003057013.1 XP_002502419.1	XP_003057495.1 XP_002502038.1	
<i>Monoraphidium neglectum</i> SAG 48.87		XP013900867.1	ID:2893 ID:2894			
<i>Bathycoccus prasinos</i> <i>Bathycoccus lucimarinus</i> <i>Ostreococcus tauri</i> <i>Klebsormidium nitens</i>				XP007514084.1 XP001416100.1 XP003075211.2 GAQ79906.1	XP_007514099.1 XP001416098.1 XP003075215.2 GAQ89021.1	
<i>Galdieria sulphuraria</i>	XP_005707361.1					- [27]
<i>Porphyridium purpureum</i>						- [27]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		ID:12416 ID:32716				- [27]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>		ID:152637	ID:263399 <sup>a</sup>			- [27]
<i>Guillardia theta</i> CCMP2712						
<i>Andalucia godoyi</i>	KAF0852161.1					
<i>Phaeocystis antarctica</i> CCMP1374	ID:684					
<i>Emiliana huxleyi</i>	XP 005783766.1					

Reciprocal BLAST was performed using the *Chlamydomonas* homolog of each protein as a query. Green background highlights microalgal species that belong to the Chlorophyta phylum. For those algal species that did not show in a positive hit using the current available genome sequences, the gene coding for the corresponding queried protein was considered to be absent. Protein accession numbers correspond to those indicated in Figures S1–S4, from NCBI or Phycocosm (protein references obtained from Phycocosm are indicated as follows "ID: (ref number)". "a" indicates partial sequence. N<sub>2</sub>O/Ref., positive or negative (+/–) N<sub>2</sub>O production by the microalgae and empty when it is unknown.

From the 33 selected microalgae, only three Chlorophyta species (*Chlamydomonas reinhardtii*, two subspecies of *Scenedesmus obliquus*, and *Chlorella sorokiniana*) contained a full set NIRK, CYP55, FLVA, FLVB, and HCP. In other words, they contain a prokaryote NO synthetase and redundant potential NO reductases. This represents almost 9% of the microalgae in Table 2. In addition, these three microalgae have been reported to produce N<sub>2</sub>O [26,27,89].

For the rest of microalgae in Table 2, an incomplete NO<sub>2</sub><sup>−</sup> → N<sub>2</sub>O pathway or the potential to produce NO (NIRK) or reduce NO to N<sub>2</sub>O through FLVs, CYP55, or HCP reductases was observed. The molecular evidence for these NO reductases is restricted to a few microalgae and comes from a recent study by Burlacot and collaborators [27]. Both CYP55 and FLVs were responsible for producing N<sub>2</sub>O under two different conditions, CYP55 in the dark and FLVs in the light. Therefore, microalga strains lacking CYP55 and/or FLV also are unable to produce N<sub>2</sub>O under its particular condition. However, whether HCP is or is not a NO reductase is unsolved in microalgae.

As previously reported, FLVs are present only in Chlorophyta and in approximately 74% of the selected chlorophytes in Table 2. These species contain both FLVA and FLVB, suggesting that these proteins may function as a heterodimer [75]. The phylogenetic tree suggests that FLVs from chlorophytes and early-diverged land plants are related to cyanobacteria (Figure S1), most likely derived from the endosymbiotic gene-transfer (EGT) of both genes from the chloroplast to the nuclear genome in the green lineage, after the divergence of the red algae and glaucophytes. Otherwise, both genes may have been transferred to the nucleus of the ancestral archaeplastidan and subsequently lost in red algae and glaucophytes.

As previously reported, *HCP* genes, although not present land plants, are highly represented in Chlorophyta; most of the chlorophytes harbor more than one copy of this gene [39]. In *Chlamydomonas reinhardtii*, the four *HCP* gene copies are phylogenetically related and located in the same chromosome, which suggests that these genes were recently duplicated [39]. In Table 2 it is shown that 69% of the chlorophytes harbor *HCP*. Moreover, putative *HCP* orthologs are also found in nonchlorophytes, including three *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatales), the *Guillardia theta* and the Stramenopiles *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* (Table 2, Figure S2). Supported by further phylogenetic analyses, an endosymbiotic origin of the microalgal *HCP* genes from mitochondria has been proposed [39].

Although less abundant, *CYP55* is in almost 39% of the Chlorophyta in Table 2 and Figure S3. It was also found only in one of other non-chlorophytes (*Thalassiosira pseudonana*), but it corresponds to a truncated sequence and it was not included in the phylogenetic tree. The most closely related to microalgal *CYP55* are fungal members, which are hypothesized to have been acquired from Actinobacteria [22]. In fungi, *CYP55*, known as p450nor (cytochrome p450 NO reductase), is considered as a biomarker for  $N_2O$  production, since it is detected in all fungal isolates producing  $N_2O$  from  $NO_2^-$  [24]. Because Actinobacteria are not considered canonical denitrifying bacteria, the prevalent hypothesis for the origin and evolution of *CYP55*/p450nor is its acquisition from Actinobacteria and next evolution to a new role in denitrification [22]. Recently, a new hypothesis suggests that fungal p450nor has a role in secondary metabolism rather than denitrification and that  $N_2O$  is a minor bioproduct of the secondary metabolism [88].

The NO-forming NIRK, which shares a common bacterial origin in both fungi and microalgae [21], is poorly represented in chlorophytes (3 out of 33) (Table 2, Figure S4), but it is present in the genome of the red alga *Galdieria sulpharia*, the haptophyte *Emiliana huxleyi*, and in Excavata. However, the NO reductase activity by this protein in these species is still unknown.

#### 4. Concluding Remarks and Future Perspectives

N homeostasis in ecosystems relies on the balance between N fixation and N release to the atmosphere in gaseous forms (mainly  $N_2$  and, to a lower extent,  $N_2O$  and NO). In-depth studies of the reactions mediated by isolated organisms, as well as those carried out by consortiums, will help us to understand how organisms keep the equilibrium of the biogeochemical N cycle and will allow us to forecast putative imbalances.

*Chlamydomonas reinhardtii* performs a high number of N-transforming reactions. Quantitatively and preferentially are those devoted to inorganic nitrogen ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_3^-$ ) assimilation for biomass production. The ammonification/deamination of amino acids and peptides constitutes a poor N supply but leads to bacterial mutualistic interactions for C/N exchange.  $NO_3^-$  offers additional N-transforming reactions, such as the  $NO_3^-/NO_3^-$  cycle, and dissimilation through a typical prokaryotic pathway  $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$  by means of apparently redundant NO reductases.

Algae, playing essential roles in aquatic ecosystems in carbon and N cycles, were claimed for a long time to produce the potent greenhouse gas  $N_2O$ . This point was recently further confirmed by molecular evidence with *CYP55* and FLVs in *Chlamydomonas reinhardtii*. This review opens new perspectives for future investigations of the full or partial dissimilation pathway ( $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$ ) by algae, where NIRK, *CYP55*, FLVs, and HCPs may be involved. In fact, some green microalgae

seem to share the dissimilating full pathway  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  with *Chlamydomonas*. However, partial pathways seem to be prevalent in microalgae.

Understanding this  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  pathway operating in microalgae as complete or partial routes will be important to understand the production and regulation of either a signal molecule as is NO or the loss of nitrogen as the contaminant gas  $\text{N}_2\text{O}$ .

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/903/s1>, Figure S1. Evolutionary relationships of putative FLV proteins, Figure S2. Evolutionary relationships of putative HCP proteins, Figure S3. Evolutionary relationships of putative CYP55 proteins, Figure S4. Evolutionary relationships of putative NIRK proteins.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.G., E.F. and C.M.B.-P.; writing—Original draft preparation, A.G.; writing—Review and editing C.M.B.-P., V.C., E.S.-L., M.T.-J., Á.L., M.P., B.G., A.G. and E.F.; funding acquisition, A.G. and E.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by MINECO (Grant BFU2015-70649-P), the European FEDER program, the Plan Propio de la Universidad de Córdoba, and the U.E.INTERREG POCTEP-055\_ALGARED\_PLUS5\_E.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Kuypers, M.M.M.; Marchant, H.K.; Kartal, B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 263–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Stein, L.Y.; Klotz, M.G. The nitrogen cycle. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, R94–R98. [[CrossRef](#)]
3. Zerkle, A.L.; Mikhail, S. The geobiological nitrogen cycle: From microbes to the mantle. *Geobiology* **2017**, *15*, 343–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gruber, N.; Galloway, J.N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **2008**, *451*, 293–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Burris, R.H.; Roberts, G.P. Biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Nutr.* **1993**, *13*, 317–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Harding, K.; Turk-Kubo, K.A.; Sipler, R.E.; Mills, M.M.; Bronk, D.A.; Zehr, J.P. Symbiotic unicellular cyanobacteria fix nitrogen in the Arctic Ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 13371–13375. [[CrossRef](#)]
7. Muñoz-Marin, M.D.C.; Shilova, I.N.; Shi, T.; Farnelid, H.; Cabello, A.M.; Zehr, J.P. The transcriptional cycle is suited to daytime  $\text{N}_2$  fixation in the unicellular cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* (UCYN-A). *mBio* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
8. Xu, L.; Cheng, X.; Wang, Q. Enhanced lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii* by co-culturing with *Azotobacter chroococcum*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 741. [[CrossRef](#)]
9. Erisman, J.Z.; Sutton, M.A.; Galloway, J.; Klimont, Z.; Winiwarter, W. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nat. Geosci.* **2008**, *1*, 636–639. [[CrossRef](#)]
10. Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erisman, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.R.; Martinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **2008**, *320*, 889–892. [[CrossRef](#)]
11. Ravishankara, A.R.; Daniel, J.S.; Portmann, R.W. Nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **2009**, *326*, 123–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Crutzen, P.J.; Moiser, A.R.; Smith, K.A.; Winiwarter, W.  $\text{N}_2\text{O}$  release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys.* **2008**, *8*, 389–395. [[CrossRef](#)]
13. Davidson, A. The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. *Nat. Geosci.* **2009**, *2*, 659–662. [[CrossRef](#)]
14. Kamp, A.; Stief, P.; Knappe, J.; de Beer, D. Response of the ubiquitous pelagic diatom *Thalassiosira weissflogii* to darkness and anoxia. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kamp, A.; de Beer, D.; Nitsch, J.L.; Lavik, G.; Stief, P. Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5649–5654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Risgaard-Petersen, N.; Langezaal, A.M.; Ingvarsdson, S.; Schmid, M.C.; Jetten, M.S.; Op den Camp, H.J.; Derksen, J.W.; Pina-Ochoa, E.; Eriksson, S.P.; Nielsen, L.P.; et al. Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **2006**, *443*, 93–96. [[CrossRef](#)]

17. Piña-Ochoa, E.; Hogslund, S.; Geslin, E.; Cedhagen, T.; Revsbech, N.P.; Nielsen, L.P.; Schweizer, M.; Jorissen, F.; Rysgaard, S.; Risgaard-Petersen, N. Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and *Gromiida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1148–1153. [[CrossRef](#)]
18. Bernhard, J.M.; Casciotti, K.L.; McIlvin, M.R.; Beaudoin, D.J.; Visscher, P.T.; Edgcomb, V.P. Potential importance of physiologically diverse benthic foraminifera in sedimentary nitrate storage and respiration. *J. Geophys. Res.* **2012**, *117*, 1–14. [[CrossRef](#)]
19. Kamp, A.; Hogslund, S.; Risgaard-Petersen, N.; Stief, P. Nitrate storage and dissimilatory nitrate reduction by eukaryotic microbes. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1492. [[CrossRef](#)]
20. Woehle, C.; Roy, A.S.; Glock, N.; Wein, T.; Weissenbach, J.; Rosenstiel, P.; Hiebenthal, C.; Michels, J.; Schonfeld, J.; Dagan, T. A Novel eukaryotic denitrification pathway in foraminifera. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 2536–2543. [[CrossRef](#)]
21. Kim, S.W.; Fushinobu, S.; Zhou, S.; Wakagi, T.; Shoun, H. Eukaryotic *nirK* genes encoding copper-containing nitrite reductase: Originating from the protomitochondrion? *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2652–2658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shoun, H.; Fushinobu, S.; Jiang, L.; Kim, S.W.; Wakagi, T. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450<sub>nor</sub>. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 1186–1194. [[CrossRef](#)]
23. Maeda, K.; Spor, A.; Edel-Hermann, V.; Heraud, C.; Breuil, M.C.; Bizouard, F.; Toyoda, S.; Yoshida, N.; Steinberg, C.; Philippot, L. N<sub>2</sub>O production, a widespread trait in fungi. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9697. [[CrossRef](#)]
24. Higgins, S.A.; Welsh, A.; Orellana, L.H.; Konstantinidis, K.T.; Chee-Sanford, J.C.; Sanford, R.A.; Schadt, C.W.; Löffler, F.E. Detection and diversity of fungal nitric oxide reductase genes (*p450<sub>nor</sub>*) in agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 2919–2928. [[CrossRef](#)]
25. Wang, J.; Vine, C.E.; Balasiny, B.K.; Rizk, J.; Bradley, C.L.; Tinajero-Trejo, M.; Poole, R.K.; Bergaust, L.L.; Bakken, L.R.; Cole, J.A. The roles of the hybrid cluster protein, Hcp and its reductase, Hcr, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100*, 877–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Plouviez, M.; Wheeler, D.; Shilton, A.; Packer, M.A.; McLenachan, P.A.; Sanz-Luque, E.; Ocana-Calahorra, F.; Fernandez, E.; Guieysse, B. The biosynthesis of nitrous oxide in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **2017**, *91*, 45–56. [[CrossRef](#)]
27. Burlacot, A.; Richaud, P.; Gosset, A.; Li-Beisson, Y.; Peltier, G. Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 2704–2709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Plouviez, M.; Shilton, A.; Packer, M.A.; Guieysse, B. Nitrous oxide emissions from microalgae: Potential pathways and significance. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 1–8. [[CrossRef](#)]
29. Sasso, S.; Stibor, H.; Mittag, M.; Grossman, A.R. From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife* **2018**, *7*. [[CrossRef](#)]
30. Proschold, T.; Marin, B.; Schlosser, U.G.; Melkonian, M. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist* **2001**, *152*, 265–300. [[CrossRef](#)]
31. Salome, P.A.; Merchant, S.S. A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* **2019**, *31*, 1682–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fernandez, E.; Galvan, A. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 555–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sanz-Luque, E.; Chamizo-Ampudia, A.; Llamas, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 899. [[CrossRef](#)]
34. Fernandez, E.; Galvan, A. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 2279–2287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chamizo-Ampudia, A.; Sanz-Luque, E.; Llamas, A.; Ocana-Calahorra, F.; Mariscal, V.; Carreras, A.; Barroso, J.B.; Galvan, A.; Fernandez, E. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell. Environ.* **2016**, *39*, 2097–2107. [[CrossRef](#)]
36. Düner, M.; Lambertz, J.; Mugge, C.; Hemschemeier, A. The soluble guanylate cyclase CYG12 is required for the acclimation to hypoxia and trophic regimes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **2018**, *93*, 311–337. [[CrossRef](#)]

37. Sanz-Luque, E.; Ocaña-Calahorro, F.; de Montaigu, A.; Chamizo-Ampudia, A.; Llamas, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant J.* **2015**, *81*, 467–479. [[CrossRef](#)]
38. Gerin, S.; Mathy, G.; Blomme, A.; Franck, F.; Sluse, F.E. Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii*: The logic of *Aox1* gene localization. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1797*, 994–1003. [[CrossRef](#)]
39. van Lis, R.; Brugiere, S.; Baffert, C.; Coute, Y.; Nitschke, W.; Atteia, A. Hybrid cluster proteins in a photosynthetic microalga. *FEBS J.* **2020**, *287*, 721–735.
40. Atteia, A.; Adrait, A.; Brugiere, S.; Tardif, M.; van Lis, R.; Deusch, O.; Dagan, T.; Kuhn, L.; Gontero, B.; Martin, W.; et al. A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 1533–1548. [[CrossRef](#)]
41. Calatrava, V.; Hom, E.F.Y.; Llamas, A.; Fernandez, E.; Galvan, A. Nitrogen scavenging from amino acids and peptides in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The role of extracellular L-amino oxidase. *Algal Res.* **2019**, *28*, 101395. [[CrossRef](#)]
42. Kirk, D.L.; Kirk, M.M. Carrier-mediated uptake of arginine and urea by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **1978**, *61*, 556–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zuo, Z.; Qingqing, R.; Chen, K.; Yang, L.; Cheng, Z.; Peng, K.; Zhu, Y.; Bai, Y.; Wang, Y. Study of amino acids as nitrogen source in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phycol. Res.* **2012**, *60*, 161–168. [[CrossRef](#)]
44. Vallon, O.; Bulte, L.; Kuras, R.; Olive, J.; Wollman, F.A. Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 351–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Schroda, M.; Vallon, O. Chaperones and Proteases. In *The Chlamydomonas Sourcebook*, 2nd ed.; Harris, E.H., Stern, D.B., Witman, G.B., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2009; pp. 671–729.
46. Schmollinger, S.; Muhlhaut, T.; Boyle, N.R.; Blaby, I.K.; Casero, D.; Moseley, J.L.; Kropat, J.; Sommer, F.; Strenkert, D.; et al. Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism. *Plant Cell* **2014**, *26*, 1410–1435. [[CrossRef](#)]
47. Muñoz-Blanco, J.; Hidalgo-Martinez, J.; Cardenas, J. Extracellular deamination of L-amino acids by *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta* **1990**, *182*, 194–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kasai, K.; Ishikawa, T.; Nakamura, T.; Miura, T. Antibacterial properties of L-amino acid oxidase: Mechanisms of action and perspectives for therapeutic applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 7847–7857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hunken, M.; Harder, J.; Kirst, G.O. Epiphytic bacteria on the Antarctic ice diatom *Amphiprora kufferathii* Manguin cleave hydrogen peroxide produced during algal photosynthesis. *Plant Biol.* **2008**, *10*, 519–526. [[CrossRef](#)]
50. Calatrava, V.; Hom, E.F.Y.; Llamas, A.; Fernandez, E.; Galvan, A. OK, thanks! A new mutualism between *Chlamydomonas* and methylobacteria facilitates growth on amino acids and peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365*. [[CrossRef](#)]
51. Chamizo-Ampudia, A.; Sanz-Luque, E.; Llamas, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant. Sci.* **2017**, *22*, 163–174. [[CrossRef](#)]
52. Leon, J.; Costa-Broseta, A. Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. de Montaigu, A.; Sanz-Luque, E.; Macias, M.I.; Galvan, A.; Fernandez, E. Transcriptional regulation of *CDP1* and *CYG56* is required for proper NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sensing in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 1425–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rockel, P.; Strube, F.; Rockel, A.; Wildt, J.; Kaiser, W.M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 103–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yamasaki, H.; Sakihama, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: In vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 89–92. [[CrossRef](#)]
56. Gupta, K.J.; Stoimenova, M.; Kaiser, W.M. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 2601–2609. [[CrossRef](#)]

57. Jasid, S.; Simontacchi, M.; Bartoli, C.G.; Puntarulo, S. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 1246–1255. [[CrossRef](#)]
58. Tewari, R.K.; Prommer, J.; Watanabe, M. Endogenous nitric oxide generation in protoplast chloroplasts. *Plant Cell Rep.* **2013**, *32*, 31–44. [[CrossRef](#)]
59. Corpas, F.J.; Del Rio, L.A.; Palma, J.M. Plant peroxisomes at the crossroad of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism. *J. Integr. Plant Biol.* **2019**, *61*, 803–816. [[PubMed](#)]
60. Foresi, N.; Mayta, M.L.; Lodeyro, A.F.; Scuffi, D.; Correa-Aragunde, N.; Garcia-Mata, C.; Casalongue, C.; Carrillo, N.; Lamattina, L. Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2015**, *82*, 806–821. [[CrossRef](#)]
61. Jeandroz, S.; Wipf, D.; Stuehr, D.J.; Lamattina, L.; Melkonian, M.; Tian, Z.; Zhu, Y.; Carpenter, E.J.; Wong, G.K.; Wendehenne, D. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, re2. [[CrossRef](#)]
62. del Rio, L.A.; Corpas, F.J.; Barroso, J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gonzalez-Ballester, D.; Sanz-Luque, E.; Galvan, A.; Fernandez, E.; de Montaigu, A. Arginine is a component of the ammonium-CYG56 signalling cascade that represses genes of the nitrogen assimilation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hemschemeier, A.; Duner, M.; Casero, D.; Merchant, S.S.; Winkler, M.; Happe, T. Hypoxic survival requires a 2-on-2 hemoglobin in a process involving nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10854–10859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Folgosa, F.; Martins, M.C.; Teixeira, M. The multidomain flavodiiron protein from *Clostridium difficile* 630 is an NADH: oxygen oxidoreductase. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10164. [[CrossRef](#)]
66. Romao, C.V.; Vicente, J.B.; Borges, P.T.; Frazao, C.; Teixeira, M. The dual function of flavodiiron proteins: Oxygen and/or nitric oxide reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, *21*, 39–52. [[CrossRef](#)]
67. Seedorf, H.; Dreisbach, A.; Hedderich, R.; Shima, S.; Thauer, R.K. F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arboriphilus*, a coenzyme F<sub>420</sub>-dependent enzyme involved in O<sub>2</sub> detoxification. *Arch. Microbiol.* **2004**, *182*, 126–137. [[CrossRef](#)]
68. Smutna, T.; Goncalves, V.L.; Saraiva, L.M.; Tachezy, J.; Teixeira, M.; Hrdy, I. Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: The terminal oxygen reductase. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 47–55. [[CrossRef](#)]
69. Di Matteo, A.; Scandurra, F.M.; Testa, F.; Forte, E.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A. The O<sub>2</sub>-scavenging flavodiiron protein in the human parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 4061–4068. [[CrossRef](#)]
70. Vicente, J.B.; Gomes, C.M.; Wasserfallen, A.; Teixeira, M. Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 82–87. [[CrossRef](#)]
71. Silaghi-Dumitrescu, R.; Coulter, E.D.; Das, A.; Ljungdahl, L.G.; Jameson, G.N.; Huynh, B.H.; Kurtz, D.M., Jr. A flavodiiron protein and high molecular weight rubredoxin from *Moorella thermoacetica* with nitric oxide reductase activity. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2806–2815. [[CrossRef](#)]
72. Rodrigues, R.; Vicente, J.B.; Felix, R.; Oliveira, S.; Teixeira, M.; Rodrigues-Pousada, C. Desulfovibrio gigas flavodiiron protein affords protection against nitrosative stress in vivo. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 2745–2751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Justino, M.C.; Vicente, J.B.; Teixeira, M.; Saraiva, L.M. New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2636–2643. [[CrossRef](#)]
74. Gardner, A.M.; Helmick, R.A.; Gardner, P.R. Flavobredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 8172–8177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chaux, F.; Burlacot, A.; Mekhalfi, M.; Auroy, P.; Blangy, S.; Richaud, P.; Peltier, G. Flavodiiron proteins promote fast and transient O<sub>2</sub> photoreduction in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 1825–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Mus, F.; Dubini, A.; Seibert, M.; Posewitz, M.C.; Grossman, A.R. Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 25475–25486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Olson, A.C.; Carter, C.J. The involvement of hybrid cluster protein 4, HCP4, in anaerobic metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149816. [[CrossRef](#)]

78. Overeijnder, M.L.; Hagen, W.R.; Hagedoorn, P.L. A thermostable hybrid cluster protein from *Pyrococcus furiosus*: Effects of the loss of a three helix bundle subdomain. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 703–710. [[CrossRef](#)]
79. Yu, Z.; Pesesky, M.; Zhang, L.; Huang, J.; Winkler, M.; Chistoserdova, L. A Complex interplay between nitric oxide, quorum sensing, and the unique secondary metabolite tundrenone constitutes the hypoxia response in *Methylobacter*. *mSystems* **2020**, *5*. [[CrossRef](#)]
80. Seth, D.; Hess, D.T.; Hausladen, A.; Wang, L.; Wang, Y.J.; Stamler, J.S. A Multiplex enzymatic machinery for cellular protein s-nitrosylation. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 451–464. [[CrossRef](#)]
81. Bange, H.B.; Arevalo-Martinez, D.L.; Paz, M.; Farias, L.; Kaiser, J.; Kock, A.; Law, C.S.; Rees, A.P.; Rehder, G.; Tortell, P.D.; et al. A harmonized nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) ocean observation network for the 21st century. *Front. Mar. Sci.* **2019**, *6*. [[CrossRef](#)]
82. Cohen, Y.; Gordon, L.G. Nitrous oxide in the oxygen minimum of the eastern tropical North Pacific: Evidence for its consumption during denitrification and possible mechanisms for its production. *Deep Sea Res.* **1978**, *25*, 509–524. [[CrossRef](#)]
83. Smith, C.J.; DeLaune, R.D.; Patrick, W.H. Nitrous oxide emission from Gulf Coast wetlands. *Geochim. Cosmochim.* **1983**, *47*, 1805–1814. [[CrossRef](#)]
84. Mengis, M.; Gächter, R.; Wehrli, B. Sources and sinks of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) in deep lakes. *Biogeochemistry* **1997**, *38*, 281–301. [[CrossRef](#)]
85. Guieysse, B.; Plouviez, M.; Coilhac, M.; Cazali, L. Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) production in axenic *Chlorella vulgaris* microalgae cultures: Evidence, putative pathways, and potential environmental impacts. *Biogeosciences* **2013**, *10*, 6737–6746. [[CrossRef](#)]
86. Smeets, E.M.; Bouwman, L.F.; Stehfest, E.; Vuuren, D.P.; Postuma, A. Contribution of N<sub>2</sub>O to the greenhouse gas balance of first-generation biofuels. *Glob. Chang. Biol.* **2009**, *15*, 1–23. [[CrossRef](#)]
87. Bauer, S.K.; Grotz, L.S.; Connelly, E.B.; Colosi, L.M. Reevaluation of the global warming impacts of algae-derived biofuels to account for possible contributions of nitrous oxide. *Bioresour. Technol.* **2016**, *218*, 196–201. [[CrossRef](#)]
88. Higgins, S.A.; Schadt, C.W.; Matheny, P.B.; Löffler, F.E. Phylogenomics reveal the dynamic evolution of fungal nitric oxide reductases and their relationship to secondary metabolism. *Genome Biol. Evol.* **2018**, *10*, 2474–2489. [[CrossRef](#)]
89. Weather, P.J. N<sub>2</sub>O Evolution by green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 1251–1253. [[CrossRef](#)]
90. Florez-Leiva, L.; Tarifeño, E.; Cornejo, M.; Kiene, R.; Farias, L. High production of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), methane (CH<sub>4</sub>) and dimethylsulphoniopropionate (DMSP) in a massive marine phytoplankton culture. *Biogeosci. Discuss.* **2010**, *7*, 6705–6723. [[CrossRef](#)]
91. Fagerstone, K.D.; Quinn, J.C.; Bradley, T.H.; De Long, S.K.; Marchese, A.J. Quantitative measurement of direct nitrous oxide emissions from microalgae cultivation. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 9449–9456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Microalgae	NIRK	HCP	CYP55	FLVA	FLVB
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PNW79625.1	XP_001694756.1 XP_001694571.1 XP_001694671.1 XP_001694454.1	XP_001700272.1	XP_001692916.1	PNW71243.1
<i>Chlamydomonas debaryana</i>	KAG2487786	KAG2498775 KAG2498774 KAG2498751 KAG2498770		KAG2496624	KAG2499462
<i>Chlamydomonas eustigma</i>		GAX74118.1		GAX73888.1	GAX73438.1
<i>Chlamydomonas incerta</i>	KAG2426177	KAG2432520 KAG2432517 KAG2432480 KAG2432479		KAG2438740	KAG2441538
<i>Chlamydomonas schloesserii</i>	KAG2435997	KAG2454081 KAG2454078 KAG2454043 KAG2454044		KAG2453394	KAG2437757
<i>Chlamydomonas sp. UWO 241</i>		KAG1659225 KAG1660707			KAG1672365
<i>Astrephomene gubernaculifera</i>		GFR47975 GFR45201		GFR44040	GFR46262
<i>Chlorella variabilis</i>		XP_005851548.1 EFN59446	XP_005848845.1	XP_005849742.1	XP_005849474.1
<i>Chlorella sorokiniana</i>	PRW57688.1	PRW58172.1 PRW60486.1 PRW58278.1	PRW58571.1 (A) PRW58572.1 (B)	PRW59370.1	PRW58882.1
<i>Chlorella ohadii</i>	KAI7844.64	KAI7838688 KAI7844495			KAI7837261 QFB70711
<i>Chlorella vulgaris</i>		KAI3433500	KAI3427183		KAI3438442
<i>Scenedesmus obliquus UTEX 393</i>	SZX67391.1	ID:15469 ID:3042	ID:435	SZX62872.1 SZX76545.1	SZX63966.1 SZX639665.1
<i>Scenedesmus obliquus EN0004</i>	ID:579459	ID:571596 ID:618262	ID:324854	ID:321778/332768 ID:342393	XP002948938.1
<i>Chlorella desiccata</i>		KAG7667567 KAH7617614 KAH7622732			KAH7617473 KAG7675217 KAG7675218
<i>Scenedesmus sp. NREL 46B-D3</i>		KAF6257770	KAF6261839	KAF6262522	KAF6259934
<i>Scenedesmus sp. PABB004</i>		KAF8063050		KAF8073046	KAF8058361
<i>Nannochloropsis salina</i>		NSK 004142			
<i>Nannochloropsis oceanica CCMP1779</i>		599317			
<i>Nannochloropsis gaditana</i>		XP_005853562.1			
<i>Gonium pectorale</i>		KXZ41847.1 KXZ44628.1	KXZ42279.1	KXZ51271.1	KXZ42718.1
<i>Coccomyxa sp. Obi</i>				BDA49024	BDA49022
<i>Coccomyxa subelipsoidea</i>				XP_005643451.1 EIE18907	XP_005643449.1 EIE18905
<i>Tettrabaena socialis</i>		PNH09786.1			
<i>Raphidocelis subcapitata</i>		GBF99305.1 GBF96263.1	GBF95475.1	GBF88523.1	GBF98453.1
<i>Volvox africanus</i>		GIL42242	GIL45310	GIL62756 GIL62757	GIL48334
<i>Volvox carteri</i>		XP_002952683.1 EFJ46236		XP_002947563.1 EFJ51611	XP_002948938.1 EFJ49873
<i>Volvox reticuliferus</i>		GIL89518 GIL96010	GIL78759	GIL84269 GIM12576	GIL74655 GIL96502
<i>Yamagishiella unicocca</i>		ARO50069.1			
<i>Micractinium conductrix</i>		PSC73563.1 PSC72373.1 PSC68490.1 PSC73564 PSC73565		PSC76351.1	PSC76929.1
<i>Micromonas pusilla</i>				XP_003057013.1	XP_003057495.1
<i>Micromonas commoda</i>				XP_002502419.1	XP_002502038.1
<i>Monoraphidium minutum</i>		KAI8467520		KAI8477430	KAI8476040

<i>Micromonas pusilla</i>				XP 003057013.1	XP 003057495.1
<i>Micromonas commoda</i>				XP 002502419.1	XP 002502038.1
<i>Monoraphidium minutum</i>		KAI8467520 KAI8475555		KAI8477430	KAI8476040
<i>Monoraphidium neglectum</i> SAG 48.87		XP013900867.1	ID:2893 ID:2894		
<i>Bathycoccus prasinos</i>				XP007514084.1	XP 007514099.1
<i>Bathycoccus lucimarinus</i>				XP001416100.1	XP001416098.1
<i>Ostreococcus tauri</i>				XP003075211.2	XP003075215.2
<i>Ostreobium quekettii</i>				CAD7701125	
<i>Haematococcus lacustris</i>		GFH14804			
<i>Pedinophyceae</i> sp. YPF-701				CAG9467030	
<i>Picochlorum</i> sp. BPE23				KAI8111210 KAI8107842	
<i>Gonium pectorale</i>		KXZ44628 KXZ41844	KXZ42279	KXZ51271	
<i>Yamagishiella unicocca</i>		ARO50069			
<i>Trebouxia</i> sp. A1-2				KAA6429531	
<i>Klebsormidium nitens</i>				GAQ79906.1	GAQ89021.1
<i>Galdieria sulphuraria</i>	XP_005707361.1				
<i>Porphyridium purpureum</i>					
<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>		ID:12416			
<i>Thalassiosira pseudonana</i>		ID:32716	ID:263399 <sup>a</sup>		
<i>Guillardia theta</i> CCMP2712		ID:152637			
<i>Andalucia godoyi</i>	KAF0852161.1				
<i>Phaeocystis antarctica</i> CCMP1374	ID:684				
<i>Emiliana huxleyi</i>	XP 005783766.1				

Tabla actualizada respecto al artículo que se cita anteriormente. Es la misma tabla que se encuentra en el texto, Tabla 1.1 pero con el número correspondiente al ID.

## **ANEXO II**

---





Article

# Nitrous Oxide Emissions from Nitrite Are Highly Dependent on Nitrate Reductase in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Carmen M. Bellido-Pedraza <sup>1</sup>, Victoria Calatrava <sup>1,2</sup>, Angel Llamas <sup>1</sup>, Emilio Fernandez <sup>1</sup>, Emanuel Sanz-Luque <sup>1,\*</sup> and Aurora Galvan <sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Cordoba, 14004 Cordoba, Spain<sup>2</sup> Department of Plant Biology, Carnegie Institution for Science, Stanford, CA 94305, USA

\* Correspondence: q92salue@uco.es; Tel.: +34-957-218352

**Abstract:** Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is a powerful greenhouse gas and an ozone-depleting compound whose synthesis and release have traditionally been ascribed to bacteria and fungi. Although plants and microalgae have been proposed as N<sub>2</sub>O producers in recent decades, the proteins involved in this process have been only recently unveiled. In the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, flavodiiron proteins (FLVs) and cytochrome P450 (CYP55) are two nitric oxide (NO) reductases responsible for N<sub>2</sub>O synthesis in the chloroplast and mitochondria, respectively. However, the molecular mechanisms feeding these NO reductases are unknown. In this work, we use cavity ring-down spectroscopy to monitor N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> in cultures of nitrite reductase mutants, which cannot grow on nitrate or nitrite and exhibit enhanced N<sub>2</sub>O emissions. We show that these mutants constitute a very useful tool to study the rates and kinetics of N<sub>2</sub>O release under different conditions and the metabolism of this greenhouse gas. Our results indicate that N<sub>2</sub>O production, which was higher in the light than in the dark, requires nitrate reductase as the major provider of NO as substrate. Finally, we show that the presence of nitrate reductase impacts CO<sub>2</sub> emissions in both light and dark conditions, and we discuss the role of NO in the balance between CO<sub>2</sub> fixation and release.

**Keywords:** nitrous oxide emission; carbon dioxide emission; nitrate reductase; nitrite reductase mutants; nitric oxide; *Chlamydomonas*



**Citation:** Bellido-Pedraza, C.M.; Calatrava, V.; Llamas, A.; Fernandez, E.; Sanz-Luque, E.; Galvan, A. Nitrous Oxide Emissions from Nitrite Are Highly Dependent on Nitrate Reductase in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9412. <https://doi.org/10.3390/ijms23169412>

Academic Editor: Antonio Lucacchini

Received: 18 July 2022

Accepted: 18 August 2022

Published: 20 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is a greenhouse gas ~300-fold more potent than CO<sub>2</sub> and considered the dominant ozone-depleting chemical emitted in the 21st century [1–5]. In 2020, the atmospheric N<sub>2</sub>O reached 333.2 ppb, which constitutes 123% of the pre-industrial (before 1750) levels, with the fastest-growing rate occurring in the past five decades [6–8]. N<sub>2</sub>O emissions are released to the atmosphere from natural (~60%) and anthropogenic sources (~40%), including oceans, soils, biomass burning, fertilizers, and several industrial activities. N<sub>2</sub>O emissions derived from human activities are dominated by nitrogen additions to crop plants [6,8]. In modern agriculture, the abundant supply of nitrogen fertilizers leads to excess nitrogen in the soil, and non-assimilated nitrogen can be emitted as N<sub>2</sub>O to the atmosphere or lost as runoffs into aquatic ecosystems, causing their eutrophication [9,10]. Nitrification and denitrification are two well-documented biochemical processes that control N<sub>2</sub>O emissions in terrestrial and aquatic ecosystems and are regulated by biological and environmental factors [8,11].

Bacteria and fungi are widely recognized as N<sub>2</sub>O producers by the scientific community [1,11–14], but recently, plants and algae have also emerged as N<sub>2</sub>O emitters. In the late 1970s, Hahn and Junge already hypothesized that phytoplankton and plants could release N<sub>2</sub>O in the presence of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) [15]. Several years later, this was demonstrated in microalgae [16,17] and plant leaves during photosynthesis [18–22]. Despite this, the intergovernmental agencies have not yet considered N<sub>2</sub>O emissions by plants

and algae in the global budget [6,23]. Thus, understanding the molecular mechanisms associated with  $N_2O$  synthesis and their regulation under different environmental conditions is critical to assessing the actual contribution of plants and microalgae to atmospheric  $N_2O$  emissions.

The molecular players for  $N_2O$  synthesis are just starting to be studied in microalgae. *Chlamydomonas reinhardtii* (hereafter *Chlamydomonas*) is a unicellular, biflagellate, and green alga widely used as a model organism due to the numerous tools available to perform genetic and metabolic studies and its suitability for biotechnological applications [24,25]. Recently, two works have identified the flavodiiron proteins (FLVs) and cytochrome P450 (CYP55) as NO reductases (NORs) in *Chlamydomonas* [26,27]. The CrFLVs belong to a singular family of  $O_2$  and NO reductases that are ubiquitous in oxygenic photoautotrophs, including cyanobacteria, the rhizarian *Paulinella chromatophora*, green algae, mosses, lycophytes, and gymnosperms, but are absent in angiosperms [28,29]. The *Chlamydomonas* CYP55 is a cytochrome p450 NO reductase closely related to fungal p450 nor members, which are considered biomarkers for  $N_2O$  production [14]. In *Chlamydomonas*, CYP55 and FLVs are proposed to be responsible for  $N_2O$  production in dark and light conditions, respectively [26,27]. In addition, light and dark  $N_2O$  emissions have been studied in different algal species and correlated with the presence of FLV and CYP55 genes in their genomes; algal species having only FLV (*Tetraselmis subcordiformis* and *Coccomyxa subellipsoidea*) seem to synthesize  $N_2O$  in the light but not in the dark. In contrast, algae lacking both CYP55 and FLV (*Galdieria sulphuraria*, *Porphyridium purpureum*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Thalassiosira pseudonana*) do not reduce NO to  $N_2O$ , whereas those algal species containing both genes in their genome (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella variabilis*) exhibit  $N_2O$  emissions in light and dark conditions [27].

Both FLV and CYP55 require NO as substrate in order to synthesize  $N_2O$ . Several NO synthesis pathways have been proposed in photosynthetic organisms. The most characterized mechanism entails the reduction of  $NO_2^-$  to NO in a process mediated by the cytosolic  $NO_3^-$  reductase (NR) in microalgae and plants [17,30–33]. These NRs are typical eukaryotic and nitrogen assimilatory enzymes that form homodimers containing FAD, heme  $b_{557}$ , and molybdenum cofactor as prosthetic groups [34,35]. These cofactors allow the sequential electron transfer from NAD(P)H to the molybdenum cofactor, the final electron donor for  $NO_3^-$  reduction. The formed  $NO_2^-$  is assimilated in the chloroplast by the following actions of  $NO_2^-$  reductase (NiR) and glutamine synthetase (GS) [36]. In *Chlamydomonas*, the NR-dependent NO synthesis requires the protein partner ARC (aka. NOFNiR), a molybdoenzyme that accepts electrons from the NR heme group to reduce  $NO_2^-$  to NO [35,37]. Moreover, the *Chlamydomonas* NR can also donate electrons to the truncated hemoglobin THB1 to scavenge NO and produce  $NO_3^-$  by deoxygenation [38,39]. Thus, NR has a central role comprising the recently named  $NO_3^-$ - $NO_3^-$  cycle [29].

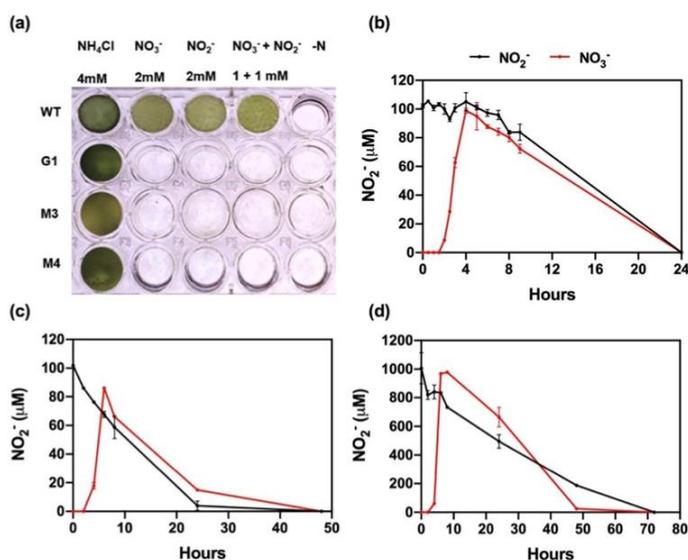
In this work, we use previously isolated *Chlamydomonas*  $NO_2^-$  reductase mutants, which cannot assimilate  $NO_2^-$ , as a valuable tool to study  $NO_2^-$  dissimilation to  $N_2O$ . We show that the NR-ARC complex strongly contributes to  $N_2O$  emissions in cells incubated in the presence of  $NO_2^-$ . Our results corroborate NR function in synthesizing NO and suggest that this cytosolic enzyme is the primary NO source for  $N_2O$  synthesis, carried out in the chloroplast and mitochondria. Furthermore, we show that excess  $NO_2^-$  and NR-dependent NO impacts  $CO_2$  emissions under our experimental conditions, and we briefly discuss the impact on  $CO_2$  fixation and release.

## 2. Results

### 2.1. Nitrite Reductase Mutants (*nii1*) Cannot Use $NO_3^-/NO_2^-$ for Growth but Can Reduce Them to $N_2O$

*Chlamydomonas nii1* mutants (G1, M3, and M4) cannot reduce  $NO_2^-$  to ammonium ( $NH_4^+$ ) and, therefore, do not grow in media containing either  $NO_3^-$  or  $NO_2^-$  as the sole nitrogen (N) source (Figure 1a). The G1 strain is a deletion mutant that lacks the entire cluster of the  $NO_3^-$  assimilation genes. This cluster, located in chromosome 9, contains

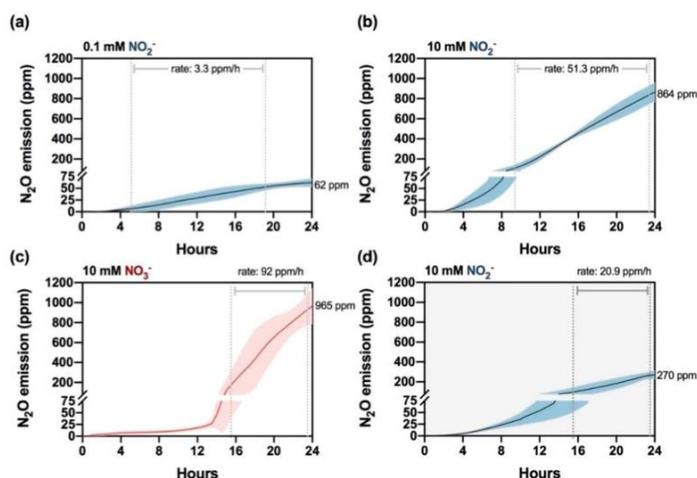
the genes that encode  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reductases (*NIA1* and *NIII1*, respectively) and the high-affinity  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  transport components (*NRT2.1*, *NRT2.2*, and *NAR2*) [40,41]. By genetic crosses, either the *NIA1* and *NRT2.1-NAR2* sets of genes or only *NIA1* were transferred to the G1 strain, generating the M3 and M4 mutants, respectively (see [41] for more details). As previously mentioned, *Chlamydomonas* cells can reduce  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{NO}$  [37] and  $\text{NO}$  to  $\text{N}_2\text{O}$  [26,27]; therefore, we used these mutants as model organisms to study this process in microalgae. First, we studied  $\text{NO}_2^-$  evolution in the M3 strain.  $\text{NH}_4^+$ -grown cells were washed and transferred to fresh media containing 0.1 and 1 mM  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  concentration in the medium was determined at different time points (Figure 1b–d). Cells exposed to 0.1 mM  $\text{NO}_3^-$  showed a stoichiometric excretion of  $\text{NO}_2^-$  after 4 h (Figure 1b), as previously reported [41]. Subsequently, extracellular  $\text{NO}_2^-$  concentration slowly decreased, being completely exhausted from the medium after 24 h. Similar depletion rates and kinetics were observed when 0.1 mM  $\text{NO}_2^-$  was added instead, but a lag of 4–6 h was observed before the concentration started to decrease.



**Figure 1.** M3 strain cannot grow in  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  but metabolizes them. (a) Growth test of the *niii1* mutants (G1, M3, and M4) and the WT (6145c) strain on the indicated N sources. Plate wells were inoculated with  $0.1 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  and cultured for 7 days. (b–d) Extracellular  $\text{NO}_2^-$  quantification in cultures incubated in the presence of either  $\text{NO}_3^-$  (red line) or  $\text{NO}_2^-$  (black line).  $\text{NH}_4^+$ -grown cells were washed and transferred to  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$ -containing media at 0.1 mM in non-sealed bottles (b), 0.1 mM in sealed bottles (c), or 1 mM in sealed bottles (d). Error bars represent  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ .

The same experiment was performed in sealed bottles, in which  $\text{N}_2\text{O}$  emission would be retained and could be quantified. Under these conditions, similar rates of accumulation and depletion of  $\text{NO}_2^-$  were observed (Figure 1c). However,  $\text{NO}_2^-$  depletion was induced faster than in non-sealed cultures (2 h vs. 6–8 h); therefore,  $\text{NO}_2^-$  excretion after  $\text{NO}_3^-$  reduction was not stoichiometric and reached only a concentration of 86  $\mu\text{M}$ . Furthermore, as observed in non-sealed bottles,  $\text{NO}_2^-$  was exhausted before 24 h. A similar pattern was observed when cells were exposed to 1 mM  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$ , although total depletion required longer incubations (Figure 1d).

To monitor  $N_2O$  emissions in the headspace of the cultures, we used Cavity Ring-Down Spectroscopy (CRDS) (see Material and Methods), which allows continuous  $N_2O$  measurements. The M3 cultures produced  $N_2O$  in a  $NO_2^-$  concentration-dependent manner and from both  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$  (Figure 2). When the cells were incubated with 0.1 mM  $NO_2^-$ ,  $N_2O$  started to accumulate after 2–3 h with a rate of 3.3 ppm/h and plateaued after 21 h, reaching a final concentration of 62 ppm after 24 h (Figure 2a). In the presence of 10 mM  $NO_2^-$ , although  $N_2O$  accumulation was also detected after 2 h of induction, the gas was released at ~15-fold higher rate (51 ppm/h) than in 0.1 mM  $NO_2^-$ , and no saturation was observed after 24 h when  $N_2O$  concentration was 864 ppm (Figure 2b). When the cells were incubated with 10 mM  $NO_3^-$  (Figure 2c),  $N_2O$  release was delayed as expected due to the requirement to reduce  $NO_3^-$  to  $NO_2^-$ , but the production rate was boosted after 14 h (92 ppm/h), almost doubling that observed in the cells supplemented with  $NO_2^-$ . As expected, cells incubated in N-free media did not emit detectable amounts of  $N_2O$  (Supplementary Table S1).



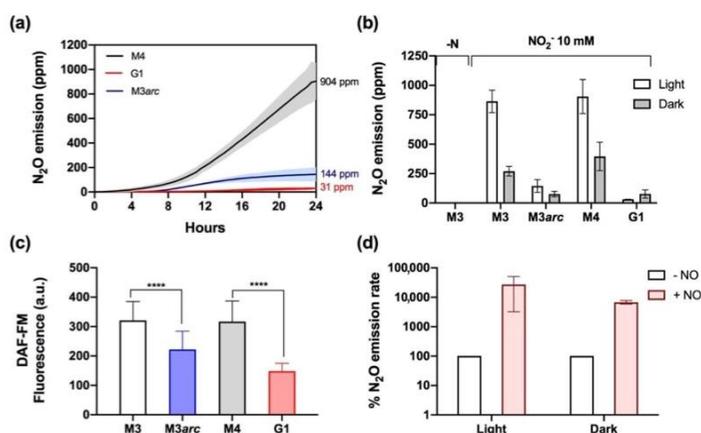
**Figure 2.** Kinetics of  $N_2O$  emission in the M3 strain in the presence of  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$ .  $NH_4^+$ -grown cells were washed and transferred to  $NO_2^-$ -containing media in sealed bottles at 0.1 mM (a) and 10 mM (b) in the light. Cells were also incubated in the presence of 10 mM  $NO_3^-$  under illumination (c) and 10 mM  $NO_2^-$  in the dark (d). Each data line represents an average of three biological replicates, and the colored area corresponds to  $\pm$ SD.

In *Chlamydomonas*,  $N_2O$  production may involve light-dependent and light-independent pathways [26,27]; therefore, we additionally studied  $N_2O$  production in cells incubated with  $NO_2^-$  in the dark. In this condition, total  $N_2O$  accumulation (270 ppm) and production rate (20 ppm/h) were both strongly reduced (Figure 2d), highlighting the importance of light in this process in the M3 strain.

In these experiments, the earliest  $N_2O$  emissions were achieved during incubation with 10 mM  $NO_2^-$ , a concentration previously used by Plouviez and collaborators [26]; therefore, we set this concentration for further studies. Moreover, the kinetics and high rates of  $N_2O$  production observed in the M3 strain led us to use this mutant as a model to study the role of other players involved in the reduction of  $NO_2^-$  to  $N_2O$ .

### 2.2. Nitrate Reductase Is the Primary NO Source Involved in N<sub>2</sub>O Emissions from NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the *nii1* Mutants

The enzymes responsible for NO reduction to N<sub>2</sub>O are located in the chloroplast (FLV) [27] and mitochondria (CYP55) [42] in *Chlamydomonas*. However, the NO sources that feed these reactions are not well understood. In plants and algae, the cytosolic NR seems to be the main enzyme involved in NO synthesis from NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [30,31,43], although other pathways for NO synthesis have been proposed in chloroplasts [44] and mitochondria [26]. Here, we set out to elucidate the possible role of the NR-ARC complex as a NO source for the synthesis of N<sub>2</sub>O. First, N<sub>2</sub>O emissions were compared in the *nii1* mutants G1 (NR<sup>-</sup>) and M4 (NR<sup>+</sup>) (Figure 3a). The lack of NR led to a dramatic reduction in N<sub>2</sub>O accumulation after 24 h in both light (31 ppm) and dark (77 ppm) conditions, while the M4 strain behaved similarly to the M3 mutant, reaching 904 ppm after 24 h in the light and 395 ppm in the dark (Figure 3a,b).



**Figure 3.** N<sub>2</sub>O emission by the *nii1* mutants mainly depends on the functionality of the NR-ARC complex to reduce NO<sub>2</sub><sup>-</sup> to NO. (a) N<sub>2</sub>O emissions by M3, G1, and M3arc strains in media containing 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the light. (b) Effect of light and dark on total N<sub>2</sub>O emission in the *nii1* mutants in the presence of 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> after 24 h. (c) DAF-FM fluorescence in the *nii1* mutants after 24 h incubation in 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the light. (d) N<sub>2</sub>O emission rates after adding 40 μM DEA-NONOate to G1 cultures in light and dark conditions. The initial rates (100%) correspond to 0.66 ppm/h (light) and 4.42 ppm/h (dark). Each data line in (a) represents an average of three biological replicates, and the colored area corresponds to ±SD. Error bars represent ±SD, *n* ≥ 3. Student's *t* test was performed. \*\*\*\* *p* ≤ 0.0001.

Secondly, to study the potential role of ARC in N<sub>2</sub>O emission, we transferred the *arc* mutation to the M3 background by genetic crossing. This new strain (M3arc) showed a significant reduction in N<sub>2</sub>O accumulation after 24 h in both light (~144 ppm) and dark (~69 ppm) conditions (Figure 3a,b), suggesting that the NR-ARC complex is responsible for the synthesis of most of the NO that sustains N<sub>2</sub>O production. To confirm this idea, NO levels were measured in these four strains (M3, M3arc, M4, and G1) using the DAF-FM fluorescent probe in cells incubated for 24 h in 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> under illumination (Figure 3c). G1 and M3arc strains exhibited a pronounced reduction in fluorescence (50% and 30%, respectively) compared to their corresponding strain of reference, M4, and M3. Our results suggest that NR-ARC is the main player in NO synthesis to feed NO reductases, but also that other NR-ARC-independent pathways should be considered.

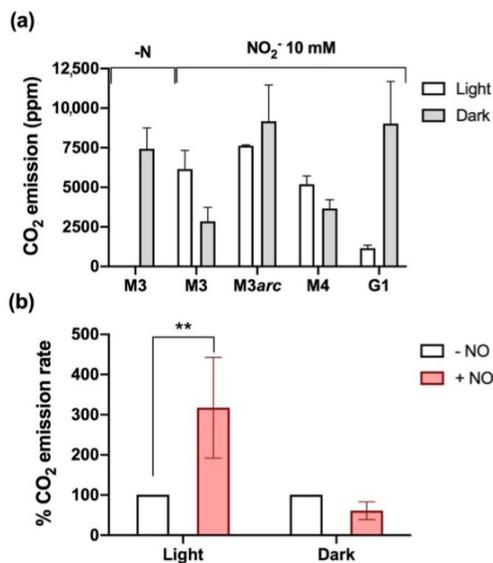
If NR is required for N<sub>2</sub>O production as a key NO supplier, then the exogenous addition of NO should enhance N<sub>2</sub>O production in the NR-lacking G1 strain. To test this hypothesis, G1 cells were incubated for 20 h with 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in either light or dark conditions and then were exposed to NO donor (40 μM DEA-NONOate). In both conditions, an immediate burst of N<sub>2</sub>O emission was observed. Before NO donor addition, N<sub>2</sub>O was produced with a rate of 0.66 ppm/h and 4.42 ppm/h in light and dark, respectively; after NO donor supplementation, the rate increased up to 131 ppm/h in light and 150 ppm/h in the dark (Figure 3d). These results suggest that the low N<sub>2</sub>O emissions observed in the G1 strain are due to a limitation in NO synthesis.

### 2.3. Nitrite Impacts CO<sub>2</sub> Emissions through a NR-Dependent Process in the *nii1* Mutants

NO is a signal molecule that inhibits a wide variety of processes in *Chlamydomonas*, including photosynthesis [45] and mitochondrial respiration [46]. Thus, taking advantage of the CRDS analyzer's functionality to quantify CO<sub>2</sub>, we studied CO<sub>2</sub> evolution to understand how NO accumulation, and indirectly N<sub>2</sub>O emissions, might impact central metabolism in the *nii1* mutants. Under mixotrophic conditions, CO<sub>2</sub> emissions are mainly a result of the flux balance between CO<sub>2</sub> fixation (photosynthesis and Calvin–Benson–Bassham cycle) and CO<sub>2</sub> release by the Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) that is fed with acetate as an exogenous carbon source, although CO<sub>2</sub> emissions can also be impacted by other processes such as carbon mobilization from storage compounds (i.e., starch and lipids) and, to a lesser extent, photorespiration [47–49]. Therefore, we assayed how the different *nii1* mutants were affected in CO<sub>2</sub> evolution.

Total CO<sub>2</sub> accumulation in the headspace of the cultures was monitored after 24 h of induction in the presence of 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in light and dark conditions. In the dark, when cells cannot fix carbon, CO<sub>2</sub> emissions were higher in G1 (9024 ppm) than in the M4 and M3 strains (3658 ppm and 2852 ppm) (Figure 4a and Supplementary Table S1). The same experiment, carried out under illumination, showed the opposite effect: lower CO<sub>2</sub> emission in the G1 mutant (1153 ppm) than in the M4 and M3 strains (5188 ppm and 6151 ppm). Similar results were obtained for M3arc and M3 strains in the dark (M3arc accumulated more CO<sub>2</sub>, 9169 ppm, than M3, 2852 ppm) but not in the light, where they showed almost identical CO<sub>2</sub> accumulation (Figure 4a). We suggest that this different phenotype in the light might be a consequence of the slightly higher NO levels observed in M3arc compared to G1 (Figure 3c), as CO<sub>2</sub> emission patterns in light and darkness seem to be affected by NO. To test this hypothesis, the G1 cultures were supplied with a NO donor in dark and light conditions after 20 h induction in 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. The NO addition led to a three-fold increase in the CO<sub>2</sub> emission rate in the light but not in the dark, where only a slight reduction was observed (Figure 4b). To further confirm whether NO reduces CO<sub>2</sub> emission in the dark, the M3 strain was treated with NO donor in N-free medium in the dark, and after a short incubation time (75 min) (Supplementary Figure S1). Before NO donor addition, the CO<sub>2</sub> emission rate was 242 ppm/h, but after NO donor addition, the CO<sub>2</sub> emission rate decreased to 88 ppm/h. Accordingly, the N<sub>2</sub>O emission rate increased from 0 to 8 ppm/h (Supplementary Figure S1).

CO<sub>2</sub> emission was also studied in M3 cells under N deprivation and different NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations in the light (Supplementary Figure S2). In N-free medium, the atmospheric CO<sub>2</sub> was consumed, and almost no emission was detected after 24 h. However, CO<sub>2</sub> was released in the presence of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in a concentration-dependent manner (4718 ppm and 6152 ppm in 0.1 mM and 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, respectively). These data highlight the regulatory role of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-derived NO in CO<sub>2</sub> emission levels (see Discussion Section).

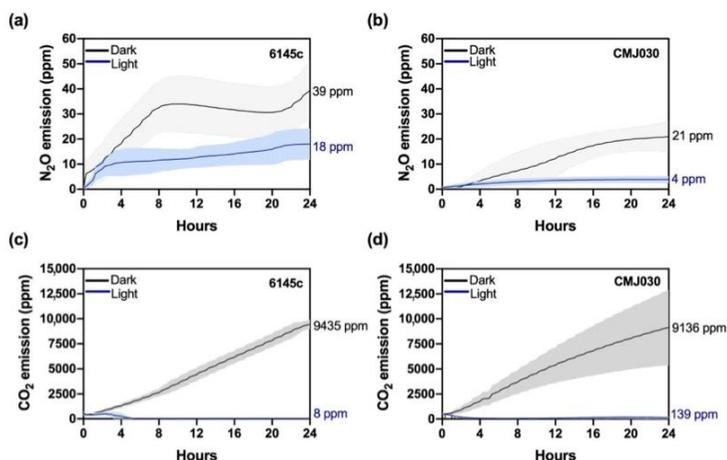


**Figure 4.** NR impacts CO<sub>2</sub> evolution in the *nii1* mutants. (a) CO<sub>2</sub> emission by the *nii1* mutants under light and dark incubation in 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and N-free media after 24 h. (b) CO<sub>2</sub> emission rates after adding 40 μM DEA-NONOate to G1 cultures in light and dark conditions. The initial rates (100%) correspond to 44.28 ppm/h and 78.21 ppm/h in light and dark, respectively. Error bars represent ±SD,  $n \geq 3$ . Student's *t* test was performed. \*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 2.4. N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> Emissions in the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Assimilation Wild Type Strain 6145c and the *nit1nit2* Mutant CMJ030

To better understand how the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> assimilation pathway impacts N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> emissions, we studied the accumulation of these gases in sealed cultures of the WT strain (6145c) and CMJ030, a mutant that cannot assimilate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and exhibits a limited growth on NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. By genetic crossing, we demonstrated that CMJ030 is a *nit1nit2* mutant (see Supplementary Figure S3) that lacks NR activity and also NIT2, which is the key transcriptional factor involved in the regulation of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> assimilation pathway [36,40].

Both 6145c and CMJ030 strains accumulated much less N<sub>2</sub>O than the M3 and M4 mutants; N<sub>2</sub>O emission reached 18 ppm in 6145c and 4 ppm in CMJ030 after 24 h in the light (Figure 5a,b). After normalization using chlorophyll concentration (as 6145c cultures double their chlorophyll content after 24 h in NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), N<sub>2</sub>O production in 6145c was two-fold higher than in CMJ030 (Supplementary Table S1). In the dark (where no growth was observed), normalized emission increased ~five-fold (Supplementary Table S1), showing characteristic kinetics with two phases of production separated by another phase in which N<sub>2</sub>O was not accumulated (Figure 5a,b). The lower N<sub>2</sub>O emissions observed in the *nit1nit2* mutant further support that the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> assimilation pathway impacts N<sub>2</sub>O synthesis in *Chlamydomonas*.



**Figure 5.**  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  emissions in the wild-type strain 6145c and the *nit1nit2* mutant CMJ030.  $\text{NH}_4^+$ -grown cells were washed and transferred to 10 mM  $\text{NO}_2^-$ -containing media in sealed bottles in the light (blue line) or the dark (black line).  $\text{N}_2\text{O}$  emissions (a,b) and  $\text{CO}_2$  (c,d) were quantified during 24 h. Each data line represents an average of three biological replicates, and the colored area corresponds to  $\pm$ SD.

The low  $\text{N}_2\text{O}$  production detected in these strains seems to point out that NO is not highly accumulated. Consequently, both strains exhibited high  $\text{CO}_2$  emissions in the dark and low  $\text{CO}_2$  levels in light (Figure 5c,d, and Supplementary Table S1), suggesting that 10 mM  $\text{NO}_2^-$  is not enough to alter  $\text{CO}_2$  evolution under our experimental conditions.

### 3. Discussion

Plants and algae can produce the potent greenhouse gas  $\text{N}_2\text{O}$ , which can be emitted at significant amounts into the atmosphere as a result of high inputs of  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  [16,17,22]. Despite its potentially high environmental and ecological impact, the molecular mechanisms involved in  $\text{N}_2\text{O}$  production by photosynthetic organisms remain largely unknown, and genetic evidence supporting  $\text{N}_2\text{O}$  emissions has been only recently described in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii* [26,27]. Recent works have documented the existence of two NO reductases, FLVs and CYP55, able to produce  $\text{N}_2\text{O}$  when the alga is supplied with NO. Most of these experiments were performed in a *Chlamydomonas nit1nit2* genetic background and demonstrated that  $\text{N}_2\text{O}$  production mostly relies on FLVs in the light and on CYP55 in the dark. Another approach by Plouviez and collaborators studied the  $\text{N}_2\text{O}$  production from  $\text{NO}_2^-$  by *Chlamydomonas* strains with different genetic backgrounds for  $\text{NO}_3^-$  assimilation. Their results showed that  $\text{N}_2\text{O}$  production by the WT strain, able to assimilate  $\text{NO}_3^-$ , occurs from  $\text{NO}_2^-$  and mainly in the dark linked to CYP55. This result was supported later by Burlacot and collaborators showing that NO uptake and  $\text{N}_2\text{O}$  production in the dark were much higher when WT cells were grown with  $\text{NO}_3^-$  as the sole nitrogen source and reflecting the regulation of CYP55 by  $\text{NO}_3^-$  metabolism. Different processes have been proposed to synthesize NO from  $\text{NO}_2^-$ , the intermediary step in  $\text{N}_2\text{O}$  production [17,35,44]. Plouviez et al., 2017 [26] suggest two phases in the *Chlamydomonas*  $\text{N}_2\text{O}$  emissions by WT in the dark, an early one involving NR (3.5 h) and a late phase involving the mitochondrial COX (24 h). Here, we present and discuss new data on the  $\text{NO}_2^-$ -to- $\text{N}_2\text{O}$  denitrification process in *Chlamydomonas nit1* mutants and how  $\text{CO}_2$  emissions are affected in these strains.

**When  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  assimilation is interrupted because of the absence of NiR activity**, two main conclusions are considered: (1) NR and ARC (NOFNiR) have a vast impact on  $\text{N}_2\text{O}$  emissions, and (2) this NR-dependent  $\text{N}_2\text{O}$  emission is significantly higher (4.5-fold) in the light than in the dark, a result in accord with Plouviez et al., 2017. Our results highlight that the NO synthesized by the cytosolic NR/ARC complex can diffuse to other organelles such as mitochondria and chloroplast, and this NO seems to regulate processes involved in  $\text{CO}_2$  emissions (later discussed). Despite the importance of NR as the main NO source in the *nit1* mutants, the remaining NO and  $\text{N}_2\text{O}$  levels observed in G1 cultures point out alternative NO synthesis pathways such as that involving COX, as previously reported [26].

**When  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  assimilation is totally functional**,  $\text{N}_2\text{O}$  emissions are tremendously diminished. This result reveals that  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in *Chlamydomonas* seem to be mainly restricted to conditions in which  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  cannot be properly assimilated and used for growth. This might support why the WT strain emits more  $\text{N}_2\text{O}$  in the dark, as cells need to acclimate to this condition and  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  assimilation is less efficient. According to this, we could expect high  $\text{N}_2\text{O}$  emission in  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -rich environments depleted of other nutrients. Therefore, growth limitation in the presence of high  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  concentrations should lead to high  $\text{N}_2\text{O}$  synthesis rates. Finally, the two phases of  $\text{N}_2\text{O}$  emission observed in dark-incubated WT cells could be attributed to NO generated by NR (first phase) and mitochondrial COX (second phase), as previously reported [17].

**When  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  assimilation is impaired (*nit1nit2* mutant)**,  $\text{N}_2\text{O}$  emissions are lower than in the WT. In this genetic background, neither NR nor the regulatory NIT2 proteins are functional, and  $\text{NO}_2^-$  assimilation is slow, allowing a limited growth in this N source [50]. This residual  $\text{NO}_2^-$  assimilation is enough to avoid  $\text{NO}_2^-$  dissimilation to  $\text{N}_2\text{O}$ . In addition, NIT2 also controls other steps in  $\text{NO}_3^-$  assimilation, including  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  transporters [36,40] and NO metabolism-related proteins such as AOX1 [51], THB1 and THB2 [38,39], and probably CYP55, which increases in response to  $\text{NO}_3^-$  [29]. Moreover, a putative  $\text{NO}_3^-$ -dependent regulation of the  $\text{N}_2\text{O}$  production, mediated by NIT2, is also supported by the significant increase in the  $\text{N}_2\text{O}$  emission rate observed in M3 cells incubated in  $\text{NO}_3^-$  compared to those incubated in  $\text{NO}_2^-$  (Figure 2c).

$\text{CO}_2$  emissions are closely related to  $\text{NO}_2^-$ -dependent  $\text{N}_2\text{O}$  emissions. Our results show a relationship between  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  emissions that will require further investigation to understand the metabolic adaptations of *Chlamydomonas* to heterotrophic and mixotrophic conditions in the presence of  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$ . In both conditions, acetate is the main carbon source, but it is essential only in the dark to feed the TCA cycle and provide energy to the cells, releasing  $\text{CO}_2$  [47,52,53].

This study shows that low  $\text{N}_2\text{O}$  emissions correlate with high  $\text{CO}_2$  release in the dark and vice versa; high  $\text{N}_2\text{O}$  emissions correlate with less  $\text{CO}_2$  release. The link between  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  emissions appears to be the NO signal molecule, produced mainly by the NR/ARC complex in the *nit1* mutants. NO could inhibit acetate metabolism and  $\text{CO}_2$  release, also supported by the slight inhibition of the  $\text{CO}_2$  emission rate by NO donor.

In the light, we found the opposite correlation: low  $\text{N}_2\text{O}$  accumulation, due to low NO synthesis, leads to a reduced  $\text{CO}_2$  emission and vice versa. Under illumination, NO inhibits photosynthesis [45], reducing  $\text{CO}_2$  fixation. In fact, NO supply increased by three-fold the  $\text{CO}_2$  emissions in the light, suggesting that  $\text{CO}_2$  fixation is very sensitive to NO. Thus,  $\text{CO}_2$  fixation would be more active in those strains/conditions in which low NO is synthesized (low  $\text{N}_2\text{O}$  emitted) and, therefore, lower  $\text{CO}_2$  levels would be accumulated. The role of NO as a photosynthesis inhibitor has been described in plants and algae and has been considered a mechanism to avoid photo-damage in algae under nutrient deprivation [45,54,55]. Nitrogen- [56] or sulfur-starved [57] *Chlamydomonas* cells accumulate NO, which causes the degradation of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex and Rubisco by the FtsH and Clp proteases. More recently, transcriptomic analyses reported the molecular mechanisms underlying the acclimation of *Chlamydomonas* after NO supply [45]. Among

the regulated process, NO decreases photosynthesis, respiration, N availability, and induces NO scavenging (THB1, THB2, FLVB, and CYP55).

The contributions of plants and algae to the N<sub>2</sub>O atmospheric budget are not being considered by the expert panels, even when increasing reports support their participation in this process, and the high input of nitrogen fertilizers is the primary cause [8,17,22]. Our data shed light on the mechanisms involved in the N<sub>2</sub>O synthesis and highlight the *nit1* mutants as good models to study the molecular bases of the N<sub>2</sub>O emission in photosynthetic organisms. Moreover, the NR role on N<sub>2</sub>O emission raises an important link between NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation and dissimilation, making of this enzyme a good candidate for future studies in order to acquire a better understanding on those environmental conditions that promote NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dissimilation over assimilation.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Strains and Growth Conditions

The strains used in this study are listed in Supplementary Table S1. G1 strain is a deletion mutant affected at the *NIT1* locus and lacking nitrite reductase (NiR), nitrate reductase (NR) and the high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> transporters ( $\Delta$  (*NIII*, *NIA1*, *NRT2.2*, *NRT2.1*, *NAR2*)). By genetic crosses, *NIA1* (the gene encoding NR) was transferred to G1 to generate the M4 strain ( $\Delta$  (*NIII*, *NIA1*, *NRT2.2*, *NRT2.1*, *NAR2*):*NIA1*). Similarly, *NIA1* plus the gene encoding the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> transporter *NRT2.1* were added to obtain the M3 strain ( $\Delta$  (*NIII*, *NIT1*, *NRT2.2*, *NRT2.1*, *NAR2*):*NIT1*, :(*NRT2.1*, *NAR2*)) [41]. Strain 6145c is a WT strain for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation and CMJ030 is a *nit1nit2* mutant. Finally, the M3arc strain ( $\Delta$  (*NIII*, *NIT1*, *NRT2.2*, *NRT2.1*, *NAR2*):*NIT1*, :(*NRT2.1*, *NAR2*), *arc*) was obtained in this work by crossing M3 (mt<sup>+</sup>) and LMJ.RY0402.255418 (mt<sup>-</sup>), where LMJ.RY0402.255418 is an insertional mutant where the *ARC* gene was interrupted with the paramomycin cassette [58] (obtained from the *Chlamydomonas* Library Project (CLiP), <https://www.chlamylibrary.org>).

All the cell cultures were performed in TAP medium (Tris, Acetate, Phosphate) [59] in a chamber (AlgaeIron AG 230, Photon System Instruments, Drásov, Czech Republic) at 25 °C, with continuous agitation (120 rpm) and illumination (light intensity 130  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). When indicated, cell cultures were transferred to dark in the same chamber.

Cells were grown in TAP medium with NH<sub>4</sub><sup>+</sup> as a nitrogen source (8 mM NH<sub>4</sub>Cl) (pre-cultures). At the exponential phase of the culture, cells were harvested by centrifugation (2 min at 3000  $\times g$ ), washed twice with nitrogen-free TAP and transferred to new media containing the indicated nitrogen sources. The initial chlorophyll concentration was adjusted to 9–10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

For unsealed flask, Erlenmeyer flasks covered with foil paper were used. The same flasks were hermetically sealed with screw caps (sealed flasks), and a syringe was used to collect samples from the culture.

##### 4.2. Chlorophyll, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and Cell Counting Measurements

Samples of 1 mL were centrifuged at 15,000  $\times g$  for 5 min, and the supernatant (cell-free medium) and the pellet were separately frozen at -20 °C. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> was quantified in the cell-free medium using the Griess reagents according to Snell and Snell (1949) [60]. For chlorophyll concentration, the pellet was resuspended in 1 mL ethanol and incubated for 3 min, at room temperature. Afterwards, the samples were centrifuged and the chlorophyll concentration in the supernatant was quantified as previously described [61]. Cell quantification of liquid cultures was determined using the Sysmex Microcellcounter F-500 cell counter.

##### 4.3. NO Measurements

Cells cultures (25 mL) were induced in media with 10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> during 24 h. Then, 2  $\mu\text{M}$  of DAF-FM (4,5-Diaminofluorescein) was added and incubated for 1h. An amount of 200  $\mu\text{L}$  of the culture was used for NO quantification in a fluorescence spectrophotometer

(Varioskan Lux, Thermo scientific, Waltham, MA USA) using OptiPlate Black Opaque 96-well Microplate (PerkinElmer, Waltham, MA USA). The excitation and emission wavelengths for the NO indicator were 485 and 515 nm, respectively. Data are represented as arbitrary fluorescence units.

#### 4.4. Determination of N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> Emissions

N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> were simultaneously quantified by using a Cavity Ring-Down Spectroscopy (CRDS) analyzer (PICARRO G2508). For this purpose, we used 1 L bottles (DURAN™) that were hermetically sealed with screw caps (GL 45 with 2 or 3 connectors) both from DWK Life Sciences (Mainz, Germany). The bottles were set with 250 mL liquid culture medium and 750 mL headspace (gas phase). The CRDS analyzer was connected to the bottle through a combined inlet and outlet Teflon tubes (2.5 m in length). The outlet tube extracted the sample from the headspace of the bottle (0.3 L/min), and the inlet tube returned the sample into the gas phase of the cultures, passing the air through a 0.22 µm PVDF filter (Dualex™-Plus; Merck, Darmstadt, Germany) to avoid culture contamination.

#### 4.5. Genetic Crosses

Genetic crosses were performed according to [62] and the random spore plating method. Then, 100 segregants were analyzed, and several of them were chosen for further experiments.

#### 4.6. Chemicals and Statistical Analysis

DEA-NONOate [2-(N,N-diethylamino)-diazonolate 2-oxide sodium salt] (D-184) and DAF-FM (4,5-Diaminofluorescein) (D224-1MG) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). For statistical analysis (Student's *t* test), PRISM software v8.4.3 (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA) was used.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23169412/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.M.B.-P., E.S.-L. and A.G.; methodology, C.M.B.-P. and E.S.-L.; investigation and data analysis, C.M.B.-P., V.C., A.L., E.S.-L. and A.G.; writing—original draft preparation, E.S.-L. and A.G.; writing—review and editing, C.M.B.-P., V.C., A.L., E.F., E.S.-L. and A.G.; supervision, E.S.-L. and A.G.; project administration, A.L., E.S.-L. and A.G.; funding acquisition, A.L., E.F., E.S.-L. and A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by “Ministerio de Ciencia e Innovación”, grant number PID2020-118398GB-I00, and “UCO-FEDER Program”, grant number UCO-1381052. C.M.B.-P. acknowledges “Fundación Torres Gutierrez” for predoctoral funding; and E.S.-L. acknowledges “Plan Propio-UCO” for postdoctoral support.

**Data Availability Statement:** All data required to evaluate the conclusions of this paper are included in the main text or the Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** All authors thank Vidal Barron for helping with CRDS methodology, and Maria Isabel Macias for technical assistance with genetic crossing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kuypers, M.M.M.; Marchant, H.K.; Kartal, B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 263–276. [CrossRef] [PubMed]
2. Ravishankara, A.R.; Daniel, J.S.; Portmann, R.W. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **2009**, *326*, 123–125. [CrossRef] [PubMed]
3. Crutzen, P.J.; Mosier, A.R.; Smith, K.A.; Winiwarter, W. N<sub>2</sub>O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys.* **2008**, *8*, 389–395. [CrossRef]
4. Davidson, E.A. The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. *Nat. Geosci.* **2009**, *2*, 659–662. [CrossRef]

5. Prather, M.J.; Hsu, J.; Deluca, N.M.; Jackman, C.H.; Oman, L.D.; Douglass, A.R.; Fleming, E.L.; Strahan, S.E.; Steenrod, S.D.; Sovde, O.A.; et al. Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability. *J. Geophys. Res. Atmos.* **2015**, *95*, 18369–18385. [[CrossRef](#)]
6. Basso, L.; Crotwell, A.; Dolman, H.; Gatti, L.; Gerbig, C.; Griffith, D.; Hall, B.; Jordan, A.; Krummel, P.; Leuenberger, M.; et al. The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2020. *WMO Greenh. Gas Bull.* **2021**, *17*, 1–10.
7. Masson-Delmotte, V.; Zhai, P.; Pirani, A.; Connors, S.L.; Péan, C.; Berger, S.; Caud, N.; Chen, Y.; Goldfarb, L.; Gomis, M.I.; et al. (Eds.) IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*; Cambridge University Press: Cambridge, UK; New York, NY, USA, 2021; pp. 3–32. [[CrossRef](#)]
8. Tian, H.; Xu, R.; Canadell, J.G.; Thompson, R.L.; Winiwarter, W.; Suntharalingam, P.; Davidson, E.A.; Ciais, P.; Jackson, R.B.; Janssens-Maenhout, G.; et al. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. *Nature* **2020**, *586*, 248–256. [[CrossRef](#)]
9. Seitzinger, S.P.; Kroeze, C. Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Glob. Biogeochem. Cycles* **1998**, *12*, 93–113. [[CrossRef](#)]
10. Liu, L.; Greaver, T.L. A review of nitrogen enrichment effects on three biogenic GHGs: The CO<sub>2</sub> sink may be largely offset by stimulated N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> emission. *Ecol. Lett.* **2009**, *12*, 1103–1117. [[CrossRef](#)]
11. Richardson, D.; Felgate, H.; Watmough, N.; Thomson, A.; Baggs, E. Mitigating release of the potent greenhouse gas N<sub>2</sub>O from the nitrogen cycle—Could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 388–397. [[CrossRef](#)]
12. Maeda, K.; Spor, A.; Edel-Hermann, V.; Heraud, C.; Breuil, M.C.; Bizouard, F.; Toyoda, S.; Yoshida, N.; Steinberg, C.; Philippot, L. N<sub>2</sub>O production, a widespread trait in fungi. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Shoun, H.; Fushinobu, S.; Jiang, L.; Kim, S.W.; Wakagi, T. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 1186–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Higgins, S.A.; Welsh, A.; Orellana, L.H.; Konstantinidis, K.T.; Sanford, R.A.; Schadt, C.W. Detection and diversity of fungal nitric oxide reductase genes (P450nor) in agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 2919–2928. [[CrossRef](#)]
15. Hahn, J.; Junge, C. Atmospheric nitrous oxide: A critical review. *Z. Nat. A* **1977**, *32*, 190–214. [[CrossRef](#)]
16. Weathers, P.J. N<sub>2</sub>O evolution by green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 1251–1253. [[CrossRef](#)]
17. Plouviez, M.; Shilton, A.; Packer, M.A.; Guieysse, B. Nitrous oxide emissions from microalgae: Potential pathways and significance. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 1–8. [[CrossRef](#)]
18. Dean, J.V.; Harper, J.E. Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the in vivo nitrate reductase assay. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 718–723. [[CrossRef](#)]
19. Goshima, N.; Mukai, T.; Suemori, M.; Takahashi, M.; Caboche, M.; Morikawa, H. Emission of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) from transgenic tobacco expressing antisense NiR mRNA. *Plant J.* **1999**, *19*, 75–80. [[CrossRef](#)]
20. Smart, D.R.; Bloom, A.J. Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7875–7878. [[CrossRef](#)]
21. Hakata, M.; Takahashi, M.; Zumft, W.; Sakamoto, A.; Morikawa, H. Conversion of the nitrate nitrogen and nitrogen dioxide to nitrous oxides in plants. *Acta Biotechnol.* **2003**, *23*, 249–257. [[CrossRef](#)]
22. Lenhart, K.; Behrendt, T.; Greiner, S.; Steinkamp, J.; Well, R.; Giesemann, A.; Keppler, F. Nitrous oxide effluxes from plants as a potentially important source to the atmosphere. *New Phytol.* **2019**, *221*, 1398–1408. [[CrossRef](#)]
23. Bartram, D.; Short, M.D.; Ebie, Y.; Farkaš, J.; Gueguen, C.; Peters, G.M.; Zanzottera, N.M.; Karthik, M.; Masuda, S. Wastewater treatment and discharge. In *2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*; IPCC: Geneva, Switzerland, 2019.
24. Salomé, P.A.; Merchant, S.S. A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* **2019**, *31*, 1682–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sasso, S.; Stibor, H.; Mittag, M.; Grossman, A.R. From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife* **2018**, *7*, e39233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Plouviez, M.; Wheeler, D.; Shilton, A.; Packer, M.A.; McLenachan, P.A.; Sanz-Luque, E.; Ocaña-Calahorra, F.; Fernández, E.; Guieysse, B. The biosynthesis of nitrous oxide in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **2017**, *91*, 45–56. [[CrossRef](#)]
27. Burlacot, A.; Richaud, P.; Gosset, A.; Li-Beisson, Y.; Peltier, G. Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 2704–2709. [[CrossRef](#)]
28. Folgosa, F.; Martins, M.C.; Teixeira, M. The multidomain flavodiiron protein from *Clostridium difficile* 630 is an NADH: Oxygen oxidoreductase. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10164. [[CrossRef](#)]
29. Bellido-Pedraza, C.M.; Calatrava, V.; Sanz-Luque, E.; Tejada-Jiménez, M.; Llamas, A.; Plouviez, M.; Guieysse, B.; Fernandez, E.; Galvan, A. *Chlamydomonas reinhardtii*, an algal model in the nitrogen cycle. *Plants* **2020**, *9*, 903. [[CrossRef](#)]
30. Yamasaki, H.; Sakihama, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: In vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 89–92. [[CrossRef](#)]
31. Rockel, P.; Strube, F.; Rockel, A.; Wildt, J.; Kaiser, W.M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 103–110. [[CrossRef](#)]

32. Sakihama, Y.; Nakamura, S.; Yamasaki, H. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: An alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 290–297. [[CrossRef](#)]
33. Timilsina, A.; Zhang, C.; Pandey, B.; Bizimana, F.; Dong, W.; Hu, C. Potential pathway of nitrous oxide formation in plants. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 160–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Campbell, W.H. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: Nitrate reductase. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 194–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chamizo-Ampudia, A.; Sanz-Luque, E.; Llamas, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fernandez, E.; Galvan, A. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 555–559. [[CrossRef](#)]
37. Chamizo-Ampudia, A.; Sanz-Luque, E.; Llamas, A.; Ocaña-Calahorra, F.; Mariscal, V.; Carreras, A.; Barroso, J.B.; Galván, A.; Fernández, E. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* **2016**, *39*, 2097–2107. [[CrossRef](#)]
38. Johnson, E.A.; Rice, S.L.; Preimesberger, M.R.; Nye, D.B.; Gilevicius, L.; Wenke, B.B.; Brown, J.M.; Witman, G.B.; Lecomte, J.T.J. Characterization of THB1, a *Chlamydomonas reinhardtii* truncated hemoglobin: Linkage to nitrogen metabolism and identification of lysine as the distal heme ligand. *Biochemistry* **2014**, *53*, 4573–4589. [[CrossRef](#)]
39. Sanz-Luque, E.; Ocaña-Calahorra, F.; De Montaigu, A.; Chamizo-Ampudia, A.; Llamas, A.; Galván, A.; Fernández, E. THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant J.* **2015**, *81*, 467–479. [[CrossRef](#)]
40. Sanz-Luque, E.; Chamizo-Ampudia, A.; Llamas, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 899. [[CrossRef](#)]
41. Navarro, M.T.; Guerra, E.; Fernandez, E.; Galvan, A. Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 283–289. [[CrossRef](#)]
42. Gérin, S.; Mathy, G.; Blomme, A.; Franck, F.; Sluse, F.E. Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii*: The logic of Aox1 gene localization. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **2010**, *1797*, 994–1003. [[CrossRef](#)]
43. Yamasaki, H.; Sakihama, S.; Takahashi, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: New features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 128–129. [[CrossRef](#)]
44. Astier, J.; Gross, I.; Durner, J. Nitric oxide production in plants: An update. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 3401–3411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kuo, E.Y.H.; Lee, T.M. Molecular mechanisms underlying the acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* against nitric oxide stress. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zalutskaya, Z.; Kochemasova, L.; Ermilova, E. Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Johnson, X.; Alric, J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot. Cell.* **2013**, *12*, 776–793. [[CrossRef](#)]
48. Shi, X.; Bloom, A. Photorespiration: The Futile Cycle? *Plants* **2021**, *10*, 908. [[CrossRef](#)]
49. Schnell, R.A.; Lefebvre, P.A. Isolation of the *Chlamydomonas* regulatory gene NIT2 by transposon tagging. *Genetics* **1993**, *134*, 737–747. [[CrossRef](#)]
50. Quesada, A.; Gómez-García, I.; Fernández, E. Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. *Trends Plant Sci.* **2000**, *5*, 463–464. [[CrossRef](#)]
51. Singh, H.; Shukla, M.R.; Chary, K.V.; Rao, B.J. Acetate and bicarbonate assimilation and metabolite formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: A <sup>13</sup>C-NMR Study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106457. [[CrossRef](#)]
52. Sweetlove, L.J.; Beard, K.F.M.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A.R.; Ratcliffe, R.G. Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 462–470. [[CrossRef](#)]
53. Peltier, G.; Schmidt, G.W. Chlororespiration: An adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4791–4795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Grossman, A.R. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist* **2000**, *151*, 201–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Salomon, E.; Bar-Eyal, L.; Sharon, S.; Keren, N. Balancing photosynthetic electron flow is critical for cyanobacterial acclimation to nitrogen limitation. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **2013**, *1827*, 340–347. [[CrossRef](#)]
56. Wei, L.; Derrien, B.; Gautier, A.; Houille-Vernes, L.; Boulouis, A.; Saint-Marcoux, D.; Malnoë, A.; Rappaport, F.; de Vitry, C.; Vallon, O.; et al. Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **2014**, *26*, 353–372. [[CrossRef](#)]
57. De Mia, M.; Lemaire, S.D.; Choquet, Y.; Wollman, F.A. Nitric oxide remodels the photosynthetic apparatus upon S-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 718–731. [[CrossRef](#)]
58. Li, X.; Patena, W.; Fauser, F.; Jinkerson, R.E.; Saroussi, S.; Meyer, M.T.; Ivanova, N.; Robertson, J.M.; Yue, R.; Zhang, R. A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 627–635. [[CrossRef](#)]
59. Harris, E.H. Culture and storage methods. In *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*; Harris, E., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1989; pp. 25–63.
60. Snell, F.D.; Snell, C.T. *Colorimetric Methods of Analysis*; Van Nostrand: New York, NY, USA, 1949; Volume 2, pp. 802–807.

- 
61. Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **1949**, *24*, 1–15. [[CrossRef](#)]
  62. Jiang, X.; Stern, D. Mating and tetrad separation of *Chlamydomonas reinhardtii* for genetic analysis. *J. Vis. Exp.* **2009**, *30*, e1274. [[CrossRef](#)]

## **ANEXO III**

---



**Tablas de expresión de genes en las estirpes WT (704) y el mutante *nit2* (89.7)**

En cada una de las tablas, se muestra la identificación del gen, el nombre de gen y los cambios de expresión como  $\log_2$ Fold Change. Columna WTN/WTA, expresión en  $\text{NO}_3^-$ /expresión en  $\text{NH}_4^+$ , de la estirpe WT. Columna WT/*nit2*N, expresión en  $\text{NO}_3^-$  de WT/ expresión en  $\text{NO}_3^-$  de *nit2*. Columna *nit2*N/*nit2*A, expresión en  $\text{NO}_3^-$  de *nit2*/ expresión en  $\text{NH}_4^+$  de *nit2* y *nit2*A/WTA, expresión en  $\text{NH}_4^+$  de WT/ expresión en  $\text{NH}_4^+$  de *nit2*. Color verde,  $\log_2$ Fold Change  $>1$ . Color rojo,  $\log_2$ Fold Change  $<1$ . Siempre se ha considerado un p- value (adj)  $<0.05$ . En casos excepcionales se han considerado y  $\log_2$ Fold Change inferior pero cercano a 1. Donde corresponde, se indican las condiciones de inducción, mixotróficas (luz, medio TAP, acetato) o autotróficas (luz, medio mínimo,  $\text{CO}_2$ ).

**Anexo III Tabla 1. Patrones de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y degradación de clorofila en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas**

<b>Biosíntesis de clorofila</b>					
<b>Locus ID</b>	<b>Gen</b>	<b>WTN/WTA</b>	<b>WTN/<i>nit2N</i></b>	<b><i>nit2N/nit2A</i></b>	<b><i>nit2A/WTA</i></b>
Cre01.g015350	<i>POR/POR1</i>	-0,99	0,50	-1,34	0,20
Cre01.g042800	<i>DVR</i>	-0,28	0,86	-1,30	-0,10
Cre01.g043350	<i>CAO/CAO1</i>	-0,12	0,57	-0,66	0,08
Cre02.g073700	<i>UPD3/UROD3</i>	-0,88	0,36	-1,31	-0,02
Cre02.g076300	<i>UPD2/UROD2</i>	-0,75	1,22	-1,91	-0,12
Cre02.g085450	<i>CPX1</i>	-1,23	0,66	-1,37	0,28
Cre02.g091050	<i>ALAD</i>	-0,57	0,08	-0,75	-0,04
Cre02.g092600	<i>CPX2</i>	-0,48	0,74	-1,31	-0,04
Cre02.g113850	<i>PBGD2</i>	-0,14	-0,88	0,86	0,17
Cre03.g158000	<i>GSA1</i>	-1,08	1,43	-1,87	0,07
Cre05.g242000	<i>CHLD</i>	-1,01	0,75	-1,63	-0,04
Cre05.g246800	<i>GUN4</i>	-1,02	0,97	-2,02	0,06
Cre06.g294750	<i>CHLG</i>	-0,76	0,85	-1,78	-0,11
Cre06.g306300	<i>CHL11</i>	-0,99	1,18	-1,96	0,03
Cre07.g313700	<i>GTS2</i>	-0,69	0,10	-0,82	0,03
Cre07.g325500	<i>CHLH1</i>	-0,25	0,40	-0,64	0,11
Cre07.g342150	<i>HEMA</i>	-0,15	0,54	-0,66	0,08
Cre07.g346050	<i>CTH1A</i>	0,03	1,08	-1,13	-0,03
Cre09.g396300	<i>PPX1</i>	-0,76	-0,13	-0,90	-0,21
Cre09.g409100	<i>UPS1/UROS/UROS1</i>	-0,66	0,96	-1,49	-0,02
Cre11.g467547	<i>GTS1</i>	-0,15	2,69	-2,66	0,23
Cre11.g467700	<i>UPD1/UROD1</i>	-1,29	1,17	-2,16	0,08
Cre12.g498550	<i>CHLM/MPM1</i>	-0,24	1,63	-1,99	-0,07
Cre12.g510050	<i>CTH1B</i>	-0,36	0,64	-0,94	0,11
Cre12.g510800	<i>CHL12</i>	-0,72	0,56	-1,52	-0,21
Cre16.g663900	<i>PBGD1</i>	-1,13	1,16	-2,14	0,23
<b>Degradación de clorofila</b>					
<b>Locus ID</b>	<b>Gen</b>	<b>WTN/WTA</b>	<b>WTN/<i>nit2N</i></b>	<b><i>nit2N/nit2A</i></b>	<b><i>nit2A/WTA</i></b>
Cre03.g148750	<i>CLH1</i>	-0,19	-1,26	1,02	0,02
Cre06.g278245	<i>PAO9</i>	0,52	-0,19	0,14	-0,50
Cre06.g305650	<i>PAO6</i>	-0,25	0,23	0,09	0,57
Cre10.g450550	<i>PAO3</i>	-0,01	0,14	-0,18	0,03
Cre11.g468700	<i>HCAR</i>	-0,33	0,04	-0,19	0,23
Cre11.g476500	<i>PAO7</i>	-0,43	0,07	-0,67	-0,09
Cre12.g484750	<i>CLH2</i>	-0,07	-0,29	0,10	-0,04
Cre12.g487500	<i>CGL61</i>	0,21	0,25	-0,31	-0,21
Cre12.g514700	<i>PPH</i>	-0,36	-0,18	-0,03	0,19
Cre12.g517700	<i>NYC1/SDR21</i>	-0,16	-1,55	1,55	0,19
Cre13.g583050	<i>PAO8</i>	0,69	1,19	-0,86	-0,32
Cre14.g608800	<i>SDR24</i>	-0,18	-0,07	-0,13	0,04
Cre17.g724600	<i>PAO2</i>	-0,29	-0,11	-0,22	0,09
Cre17.g724700	<i>PAO1</i>	-0,32	-0,09	-0,07	0,20

**Anexo III Tabla 2. Patrones de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y carotenos en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas**

<b>Biosíntesis de carotenos</b>					
<b>Locus ID</b>	<b>Gen</b>	<b>WTN/WTA</b>	<b>WTN/nit2N</b>	<b>nit2N/nit2A</b>	<b>nit2A/WTA</b>
Cre01.g050950	<i>GGR</i>	-0,79	0,87	-1,46	0,10
Cre02.g082550	<i>ZEO</i>	0,06	0,08	-0,12	-0,06
Cre02.g082550	<i>ZEP</i>	0,06	0,08	-0,12	-0,06
Cre02.g095092	<i>PSY</i>	0,11	0,02	-0,08	-0,12
Cre02.g142266	<i>CYP97A3</i>	-0,47	0,81	-1,26	0,07
Cre02.g145050	<i>CMK</i>	-0,41	-0,21	-0,57	-0,28
Cre03.g207000	<i>NSY</i>	-0,31	0,37	-0,95	-0,19
Cre03.g207700	<i>FPPS</i>	-0,57	-0,02	-0,83	-0,20
Cre04.g215000	<i>BKT</i>	-0,26	-0,36	-0,95	-0,29
Cre04.g215050	<i>CHYB</i>	-0,01	-0,03	-1,01	-0,90
Cre06.g255300	<i>NSY</i>	0,13	-0,40	0,14	-0,30
Cre06.g267600	<i>LCYE</i>	-0,12	0,23	-0,55	-0,09
Cre07.g314150	<i>ZDS</i>	-0,07	0,28	-0,44	-0,04
Cre07.g356350	<i>DXS</i>	-0,27	-0,05	-0,36	-0,09
Cre08.g358538	<i>LCYB</i>	-0,14	0,02	-0,28	-0,06
Cre08.g372950	<i>IDS</i>	-0,21	0,37	-0,50	0,13
Cre08.g373100	<i>CYP97C1</i>	-0,59	0,44	-1,09	0,01
Cre09.g388060	<i>VDE</i>	-0,35	-0,17	-0,14	0,09
Cre11.g467544	<i>IPI</i>	-0,37	-0,08	-0,35	0,02
Cre12.g484200	<i>GGPS</i>	-0,74	0,32	-1,13	-0,02
Cre12.g490350	<i>HDS</i>	-0,39	0,50	-1,02	-0,08
Cre12.g509650	<i>PDS</i>	-0,17	0,55	-0,76	0,01
Cre12.g546050	<i>DXR</i>	-0,52	0,44	-1,22	-0,21
Cre16.g651900	<i>CRI1/CRTISO</i>	0,69	-0,52	1,00	-0,15
Cre16.g678437	<i>CYP97A3</i>	0,07	0,46	-1,11	-0,55
Cre16.g679669	<i>CMS</i>	-0,85	0,49	-1,42	-0,01
Cre19.g750247	<i>ZISO</i>	-0,58	0,47	-0,95	0,14
Cre03.g152000	<i>MCS1</i>	1,4	0,08	1	-0,26

**Anexo III Tabla 3. Patrones de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y degradación de almidón en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas**

<b>Biosíntesis de almidón</b>						
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2</i> N	<i>nit2</i> N/ <i>nit2</i> A	<i>nit2</i> A/WTA	
Cre01.g012600	<i>GPM2</i>	-0,03	-1,00	1,10	0,17	
Cre03.g175400	<i>PGI1</i>	1,01	0,20	0,97	0,18	
Cre03.g181500	<i>STA1</i>	0,10	0,13	0,05	0,13	
Cre03.g185250	<i>SSS2</i>	-0,05	1,35	-0,95	0,29	
Cre03.g188250	<i>STA6</i>	0,30	-0,29	0,53	0,00	
Cre04.g215150	<i>SSS1</i>	0,23	-0,34	0,76	0,23	
Cre06.g270100	<i>SBE2</i>	0,10	-0,18	0,28	0,05	
Cre06.g282000	<i>STA3</i>	0,66	-0,73	1,40	0,03	
Cre06.g289850	<i>SBE1</i>	0,21	-0,07	0,33	0,09	
Cre10.g444700	<i>SBE3</i>	0,44	-0,41	0,92	0,12	
Cre12.g521700	<i>SSI1</i>	0,55	0,78	-0,84	-0,53	
Cre13.g579600	<i>SSS3</i>	-0,43	0,09	-0,39	0,18	
Cre13.g598750	<i>GPM1</i>	0,11	0,30	-0,30	-0,05	
Cre16.g663850	<i>SSS5</i>	0,18	-0,56	1,51	0,75	
Cre16.g665800	<i>SSS4</i>	0,06	-0,16	0,28	0,11	
Cre17.g721500	<i>STA2</i>	0,30	-0,34	0,29	-0,30	
Cre17.g721500	<i>SSI2</i>	0,30	-0,34	0,29	-0,30	
<b>Degradación de almidón</b>						
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2</i> N	<i>nit2</i> N/ <i>nit2</i> A	<i>nit2</i> A/WTA	
Cre02.g117500	<i>HXK1</i>	-0,07	-0,53	0,29	-0,11	
Cre03.g207713	<i>ISA3</i>	0,02	-0,18	0,40	0,24	
Cre07.g336950	<i>PHOA</i>	0,36	0,30	0,27	0,25	
Cre12.g488000	<i>INV1</i>	-0,63	-1,45	-0,04	-0,73	
Cre12.g488050	<i>INV2</i>	-0,50	-0,83	-1,44	-1,90	
Cre12.g552200	<i>PHOB</i>	0,29	0,33	0,29	0,37	
Cre17.g698850	<i>ISA2</i>	-0,22	0,03	0,00	0,29	

**Anexo III Tabla 4. Patrones de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de TAG y lípidos del tilacoide en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas**

Biosíntesis de TGA y lípidos del tilacoide					
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA
Cre01.g038550	<i>SQD2</i>	-0,11	0,30	-0,56	-0,09
Cre01.g045903	<i>DGAT1</i>	0,40	-0,95	1,33	0,02
Cre02.g079050	<i>DGTT5</i>	-0,04	-0,73	1,05	0,09
Cre02.g106400	<i>PDAT1</i>	0,27	-1,01	1,06	-0,16
Cre03.g193500	<i>PGD1</i>	0,799*	0,04	0,32	-0,37
Cre03.g205050	<i>DGTT4</i>	-0,51	-0,62	-0,54	-0,51
Cre06.g268200	<i>TGD1</i>	0,16	0,00	0,23	0,11
Cre06.g299050	<i>DGTT3</i>	0,07	0,03	-0,20	-0,18
Cre06.g310200	<i>DGAT3</i>	0,37	0,77*	-1,38	-0,84
Cre07.g324200	<i>BTA1</i>	-0,02	0,96*	-1,12	-0,08
Cre08.g377300	<i>DGAT2</i>	0,42	0,18	-0,16	-0,32
Cre09.g386912	<i>DGTT2</i>	-0,17	0,43	-0,52	0,13
Cre09.g405500	<i>MLDP1</i>	0,48	-0,30	0,82*	0,06
Cre12.g557750	<i>DGTT1</i>	0,30	-1,20	2,77	0,95
Cre13.g583600	<i>DGD1</i>	0,92*	0,78*	0,15	0,05
Cre13.g585301	<i>MGD1</i>	-0,42	1,96	-2,44	-0,02
Cre16.g654000	<i>SDQ1</i>	0,42	-0,89*	1,12	-0,12
Cre16.g658526	<i>TGD3</i>	0,00	0,23	-0,17	0,11
Cre16.g689150	<i>SQD3</i>	0,30	-0,21	0,67	0,11
Cre16.g694400	<i>TGD2</i>	-0,05	-0,28	0,10	-0,08

Anexo III Tabla 5. Patrones de expresión de genes relacionados con la gametogénesis en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas y autotróficas

Gametogénesis en TAP						
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA	
Cre01.g066100	<i>FUSM</i>					
Cre02.g109650	<i>GSP1</i>	-0,40	-0,86	0,02	-0,36	
Cre06.g252750	<i>FUS1</i>	-0,08	0,03	-0,09	0,05	
Cre06.g253000	<i>MTA1</i>	-0,04	0,91	0,02	0,27	
Cre06.g253050	<i>MTA3A</i>					
Cre06.g253750	<i>EZY2</i>					
Cre06.g255000	<i>SAD1</i>					
Cre06.g280600	<i>GEX1</i>	-0,10	0,36	-0,25	0,04	
Cre06.g285600	<i>MID</i>	-0,05	0,68	-1,48	-0,24	
Cre07.g328800	<i>NSG13</i>	1,26	-1,34	3,22	0,57	
Cre08.g374250	<i>SAG1</i>	-0,10	0,69	-0,77	0,02	
Cre08.g375400	<i>GSM1</i>	0,05	0,23	-0,69	-0,31	
Cre11.g481600	<i>GAS28</i>	0,12	-0,72	-0,17	-0,96	
Cre11.g481750	<i>GAS30</i>	0,33	0,23	0,15	-0,03	
Cre12.g509400	<i>RIR2B</i>	-0,17	1,67	-1,94	-0,03	
Cre13.g605200	<i>MMP29</i>	0,58	1,80	-0,46	0,62	
Cre16.g668800	<i>MTA4</i>	0,16	-0,44	0,45	-0,09	
Cre16.g668850	<i>MTA2</i>	-0,29	-1,00	0,68	0,08	
Cre16.g668900	<i>MTA3</i>	0,26	0,17	0,03	-0,01	
Cre16.g674852	<i>HAP2</i>	0,11	0,24	0,09	0,22	
Cre17.g708750	<i>NSG1</i>	-0,38	-1,58	0,15	-0,60	
Cre17.g718500	<i>MMP1</i>	0,08	0,04	0,59	0,57	
Gametogénesis en medio mínimo						
Locus ID	Gen	WTMN/WTA	WTMN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTMA	
Cre01.g066100	<i>FUSM</i>					
Cre02.g109650	<i>GSP1</i>	0,21	-0,53	-0,10	-0,78	
Cre06.g252750	<i>FUS1</i>	0,47	0,50	-0,13	0,00	
Cre06.g253000	<i>MTA1</i>	0,32	1,08	0,44	0,72	
Cre06.g253050	<i>MTA3A</i>					
Cre06.g253750	<i>EZY2</i>					
Cre06.g255000	<i>SAD1</i>					
Cre06.g280600	<i>GEX1</i>	0,26	0,43	-0,33	-0,30	
Cre06.g285600	<i>MID</i>	0,48	-0,85	0,78	-0,20	
Cre07.g328800	<i>NSG13</i>	1,26	-0,11	2,06	0,58	
Cre08.g374250	<i>SAG1</i>	-0,24	0,87	-0,92	0,24	
Cre08.g375400	<i>GSM1</i>	-0,05	-0,03	0,09	-1,84	
Cre11.g468359	<i>GAS31</i>	0,02	-0,75	0,40	0,12	
Cre11.g481600	<i>GAS28</i>	-0,02	-0,64	0,17	-0,40	
Cre11.g481750	<i>GAS30</i>	0,87	0,87	0,45	0,45	
Cre12.g509400	<i>RIR2B</i>	-1,51	0,67	-2,42	-0,18	
Cre13.g605200	<i>MMP29</i>	-0,95	1,04	-0,70	1,39	
Cre16.g668800	<i>MTA4</i>	0,59	0,15	0,31	-0,06	
Cre16.g668850	<i>MTA2</i>	0,53	-0,56	1,73	0,44	
Cre16.g668900	<i>MTA3</i>	0,11	0,07	-0,14	0,86	
Cre16.g674852	<i>HAP2</i>	-0,37	-0,10	0,30	-0,12	
Cre17.g708750	<i>NSG1</i>	1,27	-0,97	0,34	0,01	
Cre17.g718500	<i>MMP1</i>	-0,01	0,07	0,71	0,57	

**Anexo III Tabla 6. Patrones de expresión de genes relacionados con el metabolismo del NO en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones autotróficas y mixotróficas**

Condiciones autotróficas					
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2N</i>	<i>nit2N/nit2A</i>	<i>nit2A/WTA</i>
Cre01.g007950	<i>CYP55</i>	2,09	2,99	-0,85	-0,02
Cre08.g360550	<i>NIRK</i>	1,85	1,25	0,45	-0,24
Cre09.g389089	<i>ARC</i>	-0,01	-0,28	0,28	0,06
Cre09.g391450	<i>HCP1</i>	2,95	3,22	0,96	0,10
Cre09.g391650	<i>HCP4</i>	2,70	2,85	0,64	0,25
Cre09.g393506	<i>HCP3</i>	2,18	2,67	3,90	3,20
Cre12.g531900	<i>FLVA1</i>	-0,49	0,01	-0,85	-0,25
Cre12.g543350	<i>GSNOR2</i>	-0,01	-0,01	-0,13	-0,08
Cre12.g543400	<i>GSNOR1</i>	0,16	-0,86	2,07	0,77
Cre14.g615350	<i>THB2</i>	1,98	8,43	-0,03	0,65
Cre14.g615400	<i>THB1</i>	4,70	7,14	-0,78	1,30
Cre16.g691800	<i>FLVB1</i>	-0,19	0,40	-0,48	0,16
Cre17.g728550	<i>HCP2</i>	-0,38	-0,49	-0,43	-0,19
Condiciones mixotróficas					
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2N</i>	<i>nit2N/nit2A</i>	<i>nit2A/WTA</i>
Cre01.g007950	<i>CYP55</i>	2,45	0,52	-0,40	-2,13
Cre08.g360550	<i>NIRK</i>	2,12	1,26	0,99	0,20
Cre09.g389089	<i>ARC</i>	0,56	0,06	0,42	-0,01
Cre09.g391450	<i>HCP1</i>	3,54	2,50	0,43	1,23
Cre09.g391650	<i>HCP4</i>	2,44	2,65	0,88	1,52
Cre09.g393506	<i>HCP3</i>	3,43	3,91	4,08	4,26
Cre09.g393543	<i>HCP2</i>	0,78	0,15	1,75	1,12
Cre12.g531900	<i>FLVA1</i>	-0,24	-0,22	-0,28	-0,21
Cre12.g543350	<i>GSNOR2</i>	-0,12	0,03	-0,09	0,12
Cre12.g543400	<i>GSNOR1</i>	1,07	0,47	1,25	0,66
Cre14.g615350	<i>THB2</i>	10,56	9,54	0,39	-0,17
Cre14.g615400	<i>THB1</i>	3,62	5,49	0,01	1,92
Cre16.g691800	<i>FLVB1</i>	-0,21	0,28	-0,46	0,10

**Anexo III Tabla 7. Patrones de expresión de genes relacionados con la asimilación de N en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotrófica**

<b>Metabolismo del nitrógeno en medio TAP</b>					
<b>Locus ID</b>	<b>Gen</b>	<b>WTN/WTA</b>	<b>WTN/<i>nit2N</i></b>	<b><i>nit2N/nit2A</i></b>	<b><i>nit2A/WTA</i></b>
<b>Desaminación periplásmica de los aminoácidos</b>					
Cre12.g551353	<i>LAO1</i>	2,65	-2,73	1,92	0,08
Cre12.g551350	<i>LAO2/RIDA</i>	1,47	-3,07	4,29	0,34
Cre05.g246550	<i>LAO3</i>	-0,24	0,04	-0,20	0,12
<b>Asimilación de Arginina</b>					
Cre08.g360350	<i>ADI1</i>	1,19	2,37	-1,59	-0,57
Cre09.g416050	<i>AGS1</i>	0,99	-0,31	1,50	0,23
Cre01.g021251	<i>ARG7</i>	0,98	-0,48	1,51	0,09
<b>Asimilación de acetamida</b>					
Cre16.g691750	<i>AMI1</i>	5,29	-0,85	7,10	0,03
<b>Asimilación de Urea</b>					
Cre08.g360050	<i>DUR1</i>	4,34	-1,32	5,47	-0,28
Cre08.g360100	<i>DUR2</i>	1,61	-0,99	3,02	0,12
Cre08.g360200	<i>DUR3A</i>	4,73	1,10	2,73	0,32
Cre08.g360250	<i>DUR3B</i>	0,05	-0,54	0,86	0,29
Cre17.g703800	<i>DUR3C</i>	1,12	0,93	1,55	0,60
<b>Asimilación de Purinas</b>					
Cre10.g442800	<i>UAPA1/XUV6</i>	1,54	-5,48	7,59	0,12
Cre10.g442600	<i>UAPA2/XUV5</i>	5,55	-0,67	6,43	-0,10
Cre10.g433200	<i>UAPA3/XUV3</i>	2,11	-0,34	3,62	0,01
Cre10.g433250	<i>UAPA4/XUV4</i>	1,64	-0,72	4,05	0,05
Cre10.g448450	<i>UAPA5/XUV2</i>	-0,09	-1,05	0,50	0,01
Cre06.g260700	<i>UAPA6/XUV1</i>	5,57	-1,32	7,11	-0,01
Cre03.g161000	<i>ADA1</i>	-0,04	-0,58	0,22	-0,22
Cre05.g246377	<i>ADA2</i>	-0,31	-1,76	2,51	0,99
Cre12.g531700	<i>ADA3</i>	0,02	-1,03	1,10	0,11
Cre03.g145267	<i>GDA1</i>	2,87	0,19	1,56	-1,10
Cre16.g679150	<i>GDA2</i>	0,00	-0,46	0,30	-0,09
Cre12.g545101	<i>XDH1</i>	4,18	0,45	1,84	-1,78
Cre12.g504950	<i>UOX1 [UOX,UO]</i>	3,14	0,34	-0,05	-2,78
Cre17.g735950	<i>ALNS [HIUHase]</i>	1,13	0,35	0,59	-0,15
Cre13.g580700	<i>UglyAH [GIP1]</i>	1,20	0,19	0,21	-0,71
Cre01.g016200	<i>GIP1 [UglyAH]</i>	1,25	0,97	0,51	0,18
Cre06.g276700	<i>UAH</i>	1,40	0,84	0,51	-0,02
Cre08.g378650	<i>DAL3 [UglyLyase]</i>	0,11	0,66	-0,60	0,00
Cre13.g592050	<i>DAL1</i>	0,37	0,51	-0,66	-0,45
Cre13.g580700	<i>DAL2 [AAH]</i>	1,20	0,19	0,21	-0,71
<b>Catabolismo de pirimidinas</b>					
Cre13.g578750	<i>DHD</i>	0,94	-1,08	3,14	0,49
Cre02.g097000	<i>DHP1</i>	0,62	-1,14	1,81	0,09
Cre01.g022650	<i>3-UP</i>	0,75	-1,19	2,15	0,12
<b>Fijación de Amonio</b>					
Cre02.g113200	<i>GLN1</i>	1,15	-0,46	1,78	0,21
Cre12.g530650	<i>GLN2</i>	0,01	0,15	-0,20	-0,01
Cre12.g530600	<i>GLN3</i>	5,17	0,09	3,95	-1,14
Cre03.g207250	<i>GLN4</i>	1,32	-0,09	1,14	-0,21
Cre03.g146627	<i>GLN5</i>	0,30	-0,42	0,56	-0,10
Cre13.g592200	<i>GSN1</i>	-0,06	-0,47	0,40	0,03
Cre12.g514050	<i>GSF1</i>	0,21	0,41	-0,29	-0,05
Cre09.g388800	<i>GDH1</i>	0,21	-0,68	0,81	-0,12
Cre05.g232150	<i>GDH2</i>	0,16	-0,40	0,12	-0,37

<b>Metabolismo del nitrógeno en medio TAP</b>					
<b>Locus ID</b>	<b>Gen</b>	<b>WTN/WTA</b>	<b>WTN/nit2N</b>	<b>nit2N/nit2A</b>	<b>nit2A/WTA</b>
<b>Transportadores de Amonio</b>					
Cre03.g159254	<i>AMT1.1</i>	2,43	-4,08	5,70	-0,78
Cre14.g629920	<i>AMT1.2</i>	8,77	0,98	8,89	0,13
Cre06.g293051	<i>AMT1.3</i>	0,29	0,08	0,39	0,21
Cre13.g569850	<i>AMT1.4</i>	8,34	0,30	7,66	-0,39
Cre09.g400750	<i>AMT1.5</i>	4,52	-0,28	2,27	-2,23
Cre07.g355650	<i>AMT1.6</i>	-1,11	0,31	-1,64	-0,10
Cre02.g111050	<i>AMT1.7</i>	-0,89	0,05	-1,25	-0,25
Cre12.g531000	<i>AMT1.8</i>	2,71	0,49	2,47	-0,61
Cre06.g284100	<i>RHP1</i>	-2,99	1,22	-4,38	0,14
Cre06.g284150	<i>RHP2</i>	1,22	-1,36	2,51	-0,61
<b>Metabolismo de Nitrato/Nitrito</b>					
Cre09.g410950	<i>NIT1</i>	9,40	5,48	4,65	0,21
Cre09.g410750	<i>NI1</i>	5,13	3,82	3,35	0,54
<b>Transporte de Nitrate/Nitrite</b>					
Cre04.g224700	<i>NRT1.1</i>	0,74	0,66	-0,24	-0,26
Cre09.g410850	<i>NRT2.1</i>	9,80	5,57	4,47	0,07
Cre09.g410800	<i>NRT2.2</i>	3,27	7,00	1,76	0,18
Cre09.g396000	<i>NRT2.3</i>	1,65	7,45	-0,66	-0,07
Cre03.g150101	<i>NRT2.4</i>	0,01	-0,83	-0,53	-0,63
Cre03.g150151	<i>NRT2.5</i>	-0,19	-0,72	0,04	-0,05
Cre02.g110800	<i>NRT2.6</i>	2,19	-1,94	4,59	-0,09
Cre09.g411050	<i>NAR1.1*</i>	3,72	3,42	0,07	-0,31
Cre06.g309000	<i>NAR1.2 [LCIA]</i>	0,14	1,04	-1,27	-0,34
Cre04.g217915	<i>NAR1.3</i>	0,02	-0,29	1,06	0,78
Cre07.g335600	<i>NAR1.4</i>	0,03	-1,05	0,97	-0,05
Cre12.g541250	<i>NAR1.5</i>	-0,34	-0,75	0,21	-0,13
Cre01.g012050	<i>NAR1.6</i>	4,76	2,07	2,80	-0,13
Cre09.g410900	<i>NAR2</i>	9,60	6,79	3,49	0,21
<b>Síntesis del cofactor de Molibdeno</b>					
Cre04.g214050	<i>MOT1</i>	1,84	1,82	0,22	0,16
Cre13.g580150	<i>MOT2.1 MOT2A</i>	-0,44	-0,25	-0,34	-0,09
Cre16.g695500	<i>MOT2.2 MOT2B</i>	-0,58	-1,06	0,34	-0,06
Cre10.g451400	<i>CNX1E</i>	1,58	0,41	0,81	-0,33
Cre06.g282150	<i>CNX1G</i>	0,64	0,42	0,27	0,05
Cre13.g602901	<i>CNX2</i>	2,78	1,73	0,97	-0,09
Cre08.g361050	<i>CNX3</i>	0,03	0,48	-0,42	0,06
Cre09.g402034	<i>CNX5*</i>	1,32	2,12	-0,49	0,21
Cre09.g389089	<i>mARC</i>	-0,01	-0,28	0,28	0,06
Cre07.g322250	<i>CNX6</i>	1,49	1,17	0,25	-0,07
Cre08.g382545	<i>CNX7</i>	1,31	1,83	-0,38	0,10
Cre02.g142351	<i>ABA3</i>	-0,05	0,54	-0,49	0,15
Cre03.g152000	<i>MCS1</i>	1,40	0,08	1,00	-0,26
Cre09.g390050	<i>MOCOCP1</i>	0,31	-0,15	-0,40	-0,77

Anexo III Tabla 8. Patrones de expresión de genes relacionados con la asimilación de N en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones autotróficas

Metabolismo del nitrógeno en medio mínimo					
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2N</i>	<i>nit2N/nit2A</i>	<i>nit2A/WTA</i>
<b>Desaminación periplásmica de los aminoácidos</b>					
Cre12.g551353	<i>LAO1</i>	2,20	-1,78	3,70	-0,09
Cre12.g551350	<i>LAO2/RIDA</i>	3,69	-0,58	6,05	1,18
Cre05.g246550	<i>LAO3</i>	-0,74	-0,47	-0,27	0,03
<b>Asimilación de Arginina</b>					
Cre08.g360350	<i>ADI1</i>	-1,36	0,46	-2,25	-0,64
Cre09.g416050	<i>AGS1</i>	1,13	-0,30	1,18	-0,20
Cre01.g021251	<i>ARG7</i>	1,46	-0,15	1,44	-0,11
<b>Asimilación de acetamida</b>					
Cre16.g691750	<i>AMI1</i>	6,71	-0,78	6,34	-0,41
<b>Asimilación de Urea</b>					
Cre08.g360050	<i>DUR1</i>	9,12	-0,60	8,73	-0,14
Cre08.g360100	<i>DUR2</i>	3,53	-0,44	4,47	1,07
Cre08.g360200	<i>DUR3A</i>	6,69	-1,23	3,21	0,24
Cre08.g360250	<i>DUR3B</i>	0,91	0,08	1,00	0,23
Cre17.g703800	<i>DUR3C</i>	0,01	0,78	0,60	0,57
<b>Asimilación de Purinas</b>					
Cre10.g442800	<i>UAPA1/XUV6</i>	5,34	-2,97	5,71	-2,13
Cre10.g442600	<i>UAPA2/XUV5</i>	5,64	-0,92	8,36	0,99
Cre10.g433200	<i>UAPA3/XUV3</i>	3,48	-0,89	4,38	0,06
Cre10.g433250	<i>UAPA4/XUV4</i>	1,43	-0,87	4,47	0,20
Cre10.g448450	<i>UAPA5/XUV2</i>	-0,22	-0,92	4,22	0,24
Cre06.g260700	<i>UAPA6/XUV1</i>	6,37	-1,28	6,50	-0,72
Cre03.g161000	<i>ADA1</i>	0,41	-0,38	0,30	-0,41
Cre05.g246377	<i>ADA2</i>	2,98	-0,51	2,60	-0,74
Cre12.g531700	<i>ADA3</i>	1,22	0,05	1,10	-0,01
Cre03.g145267	<i>GDA1</i>	3,51	0,29	1,99	-1,16
Cre16.g679150	<i>GDA2</i>	0,25	0,08	0,51	0,40
Cre12.g545101	<i>XDH1</i>	5,03	-0,47	3,48	-1,78
Cre12.g504950	<i>UOX1 [UOX,UO]</i>	3,82	-0,31	1,27	-2,76
Cre17.g735950	<i>ALNS [HIUHase]</i>	1,43	-0,23	1,10	-0,44
Cre13.g580700	<i>UglyAH [GIP1]</i>	2,15	0,03	0,36	-1,58
Cre06.g290000	<i>GIP1 [UglyAH]</i>	4,11	-0,34	0,45	-3,73
Cre06.g276700	<i>UAH</i>	1,17	-0,06	1,21	0,05
Cre08.g378650	<i>DAL3 [UglyLyase]</i>	0,28	0,27	-0,03	0,02
Cre13.g592050	<i>DAL1</i>	0,19	-0,10	-0,61	-0,84
Cre13.g580700	<i>DAL2 [AAH]</i>	2,15	0,03	0,36	-1,58
<b>Catabolismo de pirimidinas</b>					
Cre13.g578750	<i>DHD</i>	2,36	-0,47	3,39	0,22
Cre02.g097000	<i>DHP1</i>	3,08	-0,10	2,61	-0,47
Cre01.g022650	<i>3-UP</i>	2,36	0,00	2,42	0,13
<b>Fijación de Amonio</b>					
Cre02.g113200	<i>GLN1</i>	1,46	-0,13	1,51	-0,02
Cre12.g530650	<i>GLN2</i>	-0,35	-0,17	-0,38	-0,14
Cre12.g530600	<i>GLN3</i>	3,93	-1,04	3,72	-1,28
Cre03.g207250	<i>GLN4</i>	1,39	-0,06	1,15	-0,23
Cre03.g146627	<i>GLN5</i>	0,46	-0,09	0,56	0,07
Cre13.g592200	<i>GSN1</i>	0,33	-0,25	0,10	-0,42
Cre12.g514050	<i>GSF1</i>	-0,28	-0,06	-0,68	-0,39
Cre09.g388800	<i>GDH1</i>	0,21	0,00	0,46	0,30
Cre05.g232150	<i>GDH2</i>	-0,22	-1,00	-0,17	-0,91

<b>Metabolismo del nitrógeno en medio mínimo</b>					
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA
<b>Transportadores de Amonio</b>					
Cre03.g159254	AMT1.1	4,85	-2,64	5,69	-1,83
Cre14.g629920	AMT1.2	6,33	-1,26	7,60	-0,16
Cre06.g293051	AMT1.3	0,04	0,23	0,20	0,44
Cre13.g569850	AMT1.4	8,19	0,09	6,48	-1,50
Cre09.g400750	AMT1.5	6,96	-0,17	4,18	-2,76
Cre07.g355650	AMT1.6	-1,15	0,59	-2,39	-0,57
Cre02.g111050	AMT1.7	-1,62	-0,36	-2,08	-0,77
Cre12.g531000	AMT1.8	5,76	-0,24	4,02	-1,36
Cre06.g284100	RHP1	-5,78	-1,78	-4,82	-1,04
Cre06.g284150	RHP2	0,91	-2,23	-1,22	-4,20
<b>Metabolismo de Nitrato/Nitrito</b>					
Cre09.g410950	NIT1	10,17	5,56	4,34	-0,12
Cre09.g410750	NII1	7,40	3,47	3,87	0,34
<b>Transporte de Nitrato/Nitrito</b>					
Cre04.g224700	NRT1.1	0,44	-0,03	-0,59	-0,98
Cre09.g410850	NRT2.1	10,09	5,52	4,64	0,01
Cre09.g410800	NRT2.2	9,66	7,97	1,47	0,08
Cre09.g396000	NRT2.3	10,99	10,57	-0,14	0,08
Cre03.g150101	NRT2.4	2,44	-0,79	0,70	-1,52
Cre03.g150151	NRT2.5	0,30	-1,33	0,94	-0,34
Cre02.g110800	NRT2.6	3,66	-0,98	4,67	-0,16
Cre09.g411050*	NAR1.1*	5,07	4,98	0,11	0,12
Cre06.g309000	NAR1.2 [LCIA]	-2,01	0,36	0,15	0,28
Cre04.g217915	NAR1.3	0,60	0,70	1,36	1,53
Cre07.g335600	NAR1.4	1,13	-0,12	0,78	-0,40
Cre12.g541250	NAR1.5	0,14	-0,44	0,57	0,05
Cre01.g012050	NAR1.6	8,36	4,39	3,43	-0,07
Cre09.g410900	NAR2	10,05	6,22	3,48	0,30
<b>Síntesis del cofactor de Molibdeno</b>					
Cre04.g214050	MOT1	2,48	2,43	0,06	0,11
Cre13.g580150	MOT2.1 MOT2A	-1,06	-0,12	-0,93	0,05
Cre16.g695500	MOT2.2 MOT2B	0,83	-0,80	0,94	-0,62
Cre10.g451400	CNX1E	1,70	0,83	0,61	-0,18
Cre06.g282150	CNX1G	-0,82	0,85	-0,69	1,03
Cre13.g602901	CNX2	3,61	1,40	1,13	-0,83
Cre08.g361050	CNX3	-0,43	0,40	-0,60	0,27
Cre09.g402034	CNX5*	0,70	1,57	-0,80	0,15
Cre09.g389089	mARC	0,56	0,06	0,42	-0,01
Cre07.g322250	CNX6	2,56	1,40	0,60	-0,40
Cre08.g382545	CNX7	1,71	2,41	-0,54	0,24
Cre02.g142351	ABA3	-0,04	0,50	0,34	0,93
Cre03.g152000	MCS1	1,48	0,07	1,72	0,32
Cre09.g390050	MOCOCP1	0,30	-0,92	-0,07	-1,21

**Anexo III Tabla 9. Patrones de expresión de los TF diferencialmente regulados en la estirpe WT en respuesta a NO<sub>3</sub>, en condiciones mixotróficas y autotróficas.** Dicha expresión se clasifica en tres categorías. Aquellos genes que aumentan su expresión tanto en mínimo como acetato, los que aumentan su expresión sólo en acetato y los que aumentan su expresión en mínimo. A la vez se compara con la expresión en el mutante *nit2*.

Expresión de TF regulados positivamente (datos de expresión en medio TAP)					
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA
<b>Aumentan su expresión en medio mínimo y TAP</b>					
Cre01.g011150	<i>bHLH3</i>	6,09	-0,49	7,49	0,05
Cre03.g149400	<i>RWP11</i>	1,11	-0,30	0,91	-0,45
Cre03.g177700	<i>NIT2</i>	1,55	-0,34	2,47	0,38
Cre03.g182700	<i>CrBbox1</i>	3,54	0,35	3,72	0,39
Cre04.g216200	<i>bHLH9</i>	1,19	-0,82	3,38	0,04
Cre12.g510350	<i>bZIP</i>	1,41	-1,66	1,69	-0,83
Cre12.g523000	<i>C3H10</i>	1,85	1,29	0,65	0,01
Cre12.g542500	<i>MOC1</i>	1,01	-1,28	2,63	0,31
Cre14.g620850	<i>NSG17</i>	1,62	1,11	0,38	-0,10
Cre16.g673250	<i>NRR1</i>	4,15	-0,92	6,10	-0,01
<b>Aumentan su expresión en TAP</b>					
Cre05.g238250	<i>bZIP</i>	0,95	1,32	-0,14	0,23
Cre07.g332250	<i>bHLH1</i>	1,88	0,50	2,97	0,70
Cre01.g034350	<i>MYBL13</i>	0,82	-1,71	2,91	0,16
<b>Aumentan su expresión en mínimo</b>					
Cre02.g085150	<i>SBP.4</i>	0,44	-0,89	0,76	-0,46
Cre02.g113450	<i>MYBL7</i>	0,09	-0,59	0,74	0,10
Cre02.g119800	<i>FHA.2</i>	-0,15	-1,07	0,33	-0,41
Cre03.g160600	<i>GATA1</i>	0,39	-1,76	2,76	0,56
Cre03.g212641	<i>TAZ.1</i>	0,22	-0,56	-0,25	-0,91
Cre04.g226400	<i>YC.1</i>	0,30	-1,05	1,40	0,08
Cre06.g297150	<i>RWP9</i>	0,31	-0,70	0,54	-0,36
Cre06.g310500	<i>bZIP</i>	0,18	-0,72	-0,26	-0,74
Cre07.g341800	<i>CGL107</i>	0,01	-0,51	0,47	0,01
Cre07.g344668	<i>bZIP</i>	-0,14	-1,51	1,30	0,07
Cre09.g408051	<i>mTERF.3</i>	0,19	-1,39	1,61	0,07
Cre10.g453500	<i>RWP15</i>	0,31	-0,19	1,36	0,38
Cre11.g467665	<i>TIG.1</i>	-0,02	-1,76	0,93	-0,60
Cre12.g495100	<i>PSR1</i>	0,41	-0,45	0,98	0,15
Cre12.g522400	<i>MYBL10</i>	-0,28	-1,47	0,18	-0,82
Cre12.g550250	<i>CPP.1</i>	-0,01	-1,11	0,48	-0,42
Cre12.g557300	<i>bZIP</i>	-0,16	-1,56	0,06	-1,09
Cre13.g572450	<i>ARR-B</i>	0,73	0,86	-0,63	-0,43
Cre13.g572450	<i>Orphans.8</i>	0,73	0,86	-0,63	-0,43
Cre14.g633789	<i>Myb like</i>	0,74	1,05	0,24	0,39
Cre16.g667900	<i>AP2.15</i>	-0,04	-0,64	-0,01	-0,42
Cre16.g671200	<i>bZIP</i>	0,06	-1,76	1,61	-0,04
Cre16.g677382	<i>MYBL5</i>	0,49	-1,36	1,34	-0,27

<b>Expresión de TF regulados positivamente (datos de expresión en medio mínimo)</b>						
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA	
<b>Aumentan su expresión en medio mínimo y TAP</b>						
Cre01.g011150	<i>bHLH3</i>	7,52	-0,27	8,24	0,32	
Cre03.g149400	<i>RWP11</i>	1,89	0,72	1,21	0,11	
Cre03.g177700	<i>NIT2</i>	1,68	0,05	2,73	1,08	
Cre03.g182700	<i>CrBbox1</i>	3,91	0,05	3,40	-0,34	
Cre04.g216200	<i>bHLH9</i>	4,02	-1,11	3,14	-0,26	
Cre12.g510350	<i>bZIP</i>	2,26	-1,32	2,15	-0,88	
Cre12.g523000	<i>C3H10</i>	2,54	-0,26	1,42	-1,15	
Cre12.g542500	<i>MOC1</i>	1,48	-0,14	3,05	1,48	
Cre14.g620850	<i>NSG17</i>	1,79	1,42	-0,26	-0,55	
Cre16.g673250	<i>NRR1</i>	7,58	-0,57	7,33	NA	
<b>Aumentan su expresión en TAP</b>						
Cre05.g238250	<i>bZIP</i>	-0,16	1,25	-0,64	0,84	
Cre07.g332250	<i>bHLH1</i>	-0,98	-0,21	-0,37	0,44	
<b>Aumentan su expresión en mínimo</b>						
Cre01.g034350	<i>MYBL13</i>	2,28	0,31	2,10	0,19	
Cre02.g085150	<i>SBP.4</i>	1,41	-0,25	1,24	-0,32	
Cre02.g113450	<i>MYBL7</i>	1,02	-0,41	1,32	-0,05	
Cre02.g119800	<i>FHA.2</i>	1,69	-0,85	0,96	-1,31	
Cre03.g160600	<i>GATA1</i>	1,91	-0,03	3,67	1,72	
Cre03.g212641	<i>TAZ.1</i>	1,03	-0,04	-0,07	-0,97	
Cre04.g226400	<i>YC.1</i>	1,02	-0,07	1,42	0,37	
Cre06.g297150	<i>RWP9</i>	1,07	0,39	0,61	0,01	
Cre06.g310500	<i>bZIP</i>	1,93	-0,59	-0,58	-1,20	
Cre07.g341800	<i>CGL107</i>	1,12	-0,37	0,70	-0,66	
Cre07.g344668	<i>bZIP</i>	1,64	-0,20	0,23	-0,63	
Cre09.g408051	<i>mTERF.3</i>	1,32	0,00	1,93	0,62	
Cre10.g453500	<i>RWP15</i>	2,85	0,32	1,51	-0,33	
Cre11.g467665	<i>TIG.1</i>	1,29	-0,78	0,87	-1,05	
Cre12.g495100	<i>PSR1</i>	1,23	0,09	2,17	1,07	
Cre12.g522400	<i>MYBL10</i>	1,23	-0,95	0,86	-1,22	
Cre12.g550250	<i>CPP.1</i>	1,36	-0,80	0,63	-1,27	
Cre12.g557300	<i>bZIP</i>	1,17	-1,73	0,39	-2,41	
Cre13.g572450	<i>ARR-B</i>	1,30	0,52	-0,09	-0,75	
Cre13.g572450	<i>Orphans.8</i>	1,30	0,52	-0,09	-0,75	
Cre14.g633789	<i>Myb like</i>	1,93	1,98	0,22	0,31	
Cre16.g667900	<i>AP2.15</i>	1,41	-0,32	0,97	-0,58	
Cre16.g671200	<i>bZIP</i>	1,91	-0,86	1,73	-0,63	
Cre16.g677382	<i>MYBL5</i>	1,71	-0,26	1,30	-0,53	

Expresión de TF regulados negativamente (datos de expresión en medio TAP)						
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA	
Cre06.g275350	<i>ROC40</i>	-1,05	-2,14	-1,28	-1,35	
Cre12.g507500		-1,07	-0,23	-1,53	-0,46	
Cre01.g003376		-0,01	1,21	-1,14	0,11	
Cre01.g014050		0,28	1,79	-1,48	0,07	
Cre03.g198800		-0,16	1,45	-0,60	0,62	
Cre04.g229948		-0,26	1,39	-1,75	-0,06	
Cre05.g240650	<i>DNJ32</i>	0,15	1,15	-1,18	-0,14	
Cre06.g275500	<i>AP2</i>	-0,37	-0,03	-0,53	0,08	
Cre06.g278136		-0,10	1,42	-1,23	0,20	
Cre11.g476200	<i>NZF1</i>	-0,16	-0,15	-0,23	-0,16	
Cre12.g489600		-0,13	0,74	-0,64	0,23	
Cre12.g501600	<i>BLZ8</i>	-0,94	0,66	-1,74	-0,07	
Cre12.g534450	<i>CGL86</i>	-0,34	0,41	-0,88	-0,09	
Cre15.g635100		0,17	2,61	-3,16	-0,67	
Cre16.g649433		-0,16	4,73	-5,37	-0,44	
Cre17.g746547	<i>bZIP</i>	-0,98	1,28	-1,87	0,43	

Expresión de TF regulados negativamente (datos de expresión en medio mínimo)						
Locus ID	Gen	WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	nit2A/WTA	
Cre06.g275350	<i>ROC40</i>	-1,35	-1,54	-0,50	-0,71	
Cre12.g507500		0,50	0,32	0,06	-0,02	
Cre01.g003376		-1,07	0,46	-1,99	-0,40	
Cre01.g014050		-2,44	0,97	-2,68	0,56	
Cre03.g198800		-1,32	-0,35	-0,69	0,20	
Cre04.g229948		-1,22	0,41	-1,83	-0,16	
Cre05.g240650	<i>DNJ32</i>	-1,18	1,19	-1,90	0,54	
Cre06.g275500	<i>AP2</i>	-1,22	-1,11	-0,61	-0,45	
Cre06.g278136		-1,58	0,74	-2,17	0,18	
Cre11.g476200	<i>NZF1</i>	-1,05	-0,34	-0,82	-0,07	
Cre12.g489600		-1,22	0,56	-1,23	0,59	
Cre12.g501600	<i>BLZ8</i>	-2,21	0,95	-2,61	0,61	
Cre12.g534450	<i>CGL86</i>	-1,93	-0,76	-1,00	0,06	
Cre15.g635100		-2,94	-2,04	-2,28	-1,50	
Cre16.g649433		-4,50	-1,71	-2,64	-0,94	
Cre17.g746547	<i>bZIP</i>	-2,49	0,95	-2,69	0,79	

**Anexo III Tabla 10. Patrones de expresión de los TF de la familia bZIP de Chlamydomonas en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas y autotróficas.**

Patrón de expresión de los TF <i>bZIP</i>				
En TAP				
ID	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2N</i>	<i>nit2N/nit2A</i>	WTA/ <i>nit2A</i>
Cre01.g043150	-0,07	0,12	-0,32	-0,03
Cre01.g051174	-0,23	0,22	-0,52	0,06
Cre05.g238250	0,95	1,32	-0,14	0,23
Cre06.g310500	0,18	-0,72	-0,26	-0,74
Cre07.g318050	0,34	0,53	-0,17	0,07
Cre07.g344668	-0,14	-1,51	1,30	0,07
Cre08.g364751	0,21	0,47	0,66	0,36
Cre10.g438850	0,04	0,25	-0,72	-0,44
Cre10.g454850	0,13	0,08	-0,13	-0,13
Cre12.g489000	0,15	-0,77	0,39	-0,39
Cre12.g501600	-0,94	0,66	-1,74	-0,07
Cre12.g510200	0,85	0,05	0,38	-0,35
Cre12.g510350	1,41	-1,66	1,69	-0,83
Cre12.g557300	-0,16	-1,56	0,06	-1,09
Cre13.g568350	-0,20	0,19	0,04	0,26
Cre16.g671200	0,06	-1,76	1,61	-0,04
Cre16.g675700	0,02	-0,15	-0,21	-0,30
Cre16.g692250	-0,05	-0,08	-0,45	-0,39
Cre17.g746547	-0,98	1,28	-1,87	0,43
Cre07.g321550	0,00	0,41	0,12	0,54
Cre09.g413050	0,06	-0,42	0,09	-0,29
Cre13.g590350	0,99	0,63	0,58	0,25

En MM				
ID	WTN/WTA	WTN/ <i>nit2N</i>	<i>nit2N/nit2A</i>	WTA/ <i>nit2A</i>
Cre01.g043150	-0,87	-0,53	-0,31	0,07
Cre01.g051174	-0,30	0,30	-0,76	-0,08
Cre05.g238250	-0,16	1,25	-0,64	0,84
Cre06.g310500	1,93	-0,59	-0,58	-1,20
Cre07.g318050	-0,21	0,16	-0,31	0,11
Cre07.g344668	1,64	-0,20	0,23	-0,63
Cre08.g364751	0,19	0,56	0,29	0,48
Cre10.g438850	-0,92	-0,42	-0,40	0,11
Cre10.g454850	-0,26	-0,14	-0,52	-0,32
Cre12.g489000	0,65	-0,32	0,51	-0,35
Cre12.g501600	-2,21	0,95	-2,61	0,61
Cre12.g510200	0,58	0,30	0,56	0,34
Cre12.g510350	2,26	-1,32	2,15	-0,88
Cre12.g557300	1,17	-1,73	0,39	-2,41
Cre13.g568350	0,13	0,10	0,28	0,25
Cre16.g671200	1,91	-0,86	1,73	-0,63
Cre16.g675700	-0,02	-0,22	0,02	-0,12
Cre16.g692250	-0,54	-0,33	-0,52	-0,25
Cre17.g746547	-2,49	0,95	-2,69	0,79
Cre07.g321550	0,18	0,42	0,19	0,49
Cre09.g413050	-0,27	-0,25	-0,18	-0,10
Cre13.g590350	-0,27	0,68	-0,34	0,66

**Anexo III Tabla 11. Patrones de expresión de los TF de la familia *bHLH* de *Chlamydomonas* en las estirpes WT y mutante *nit2* en condiciones mixotróficas y autotróficas.**

En TAP					
ID		WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	WTA/nit2A
<b>BIM</b>					
Cre14.g620850f <i>bHLH5 (NSG17)</i>		<b>1,62</b>	<b>1,11</b>	0,38	-0,10
<b>IRL (Iron response)</b>					
Cre05.g241636f <i>bHLH7</i>		0,31	0,46	-0,89	-0,67
<b>Específicos de clorofitas</b>					
Cre01.g011150f <i>bHLH3</i>		<b>6,09</b>	-0,49	<b>7,49</b>	0,05
Cre04.g216200f <i>bHLH9</i>		<b>1,19</b>	-0,82	<b>3,38</b>	0,04
Cre07.g332250f <i>bHLH1</i>		<b>1,88</b>	0,50	<b>2,97</b>	0,70
Cre07.g349152f <i>bHLH2</i>		0,24	0,16	-0,53	-0,50
Cre07.g353555f <i>bHLH6</i>		0,15	0,39	0,69	0,79
Cre02.g109683f <i>bHLH4</i>		-0,27	-0,97	0,67	0,05
Cre04.g224600f <i>bHLH8</i>		0,48	0,15	0,05	-0,23
Cre04.g216204f <i>bHLH10</i>					
<b>En MM</b>					
ID		WTN/WTA	WTN/nit2N	nit2N/nit2A	WTA/nit2A
<b>BIM</b>					
Cre14.g620850f <i>bHLH5 (NSG17)</i>		<b>1,79</b>	<b>1,42</b>	-0,26	-0,55
<b>IRL (Iron response)</b>					
Cre05.g241636f <i>bHLH7</i>		-0,89	-0,07	-0,88	-0,02
<b>Específicos de clorofitas</b>					
Cre01.g011150f <i>bHLH3</i>		<b>7,52</b>	-0,27	<b>8,24</b>	0,32
Cre04.g216200f <i>bHLH9</i>		<b>4,02</b>	<b>-1,11</b>	<b>3,14</b>	-0,26
Cre07.g332250f <i>bHLH1</i>		-0,98	-0,21	-0,37	0,44
Cre07.g349152f <i>bHLH2</i>		-0,06	-0,09	-0,78	-0,72
Cre07.g353555f <i>bHLH6</i>		0,80	<b>1,63</b>	<b>1,06</b>	<b>1,79</b>
Cre02.g109683f <i>bHLH4</i>		0,57	-0,43	0,49	-0,44
Cre04.g224600f <i>bHLH8</i>		0,03	0,10	<b>-1,43</b>	-1,28
Cre04.g216204f <i>bHLH10</i>					

**Anexo III Tabla 12. Motivos de unión a TFs presentes en los los promotores de TFs diferencialmente regulados en la estirpe WT en respuesta a nitrato**

Factores de Transcripción regulados positivamente									
TAP y MM									
Locus ID	TF	NIT2	NSG17	BLZ8	MYBL13	MYBL5	PSR1	bZIP (bLZ2)	CrebZIP14
Cre03.g177700	<i>NIT2</i>		✓	✓				✓	✓
Cre01.g011150	<i>bHLH3</i>	✓	✓			✓			✓
Cre03.g149400	<i>RWP11</i>								
Cre04.g216200	<i>bHLH9</i>	✓		✓			✓	✓	
Cre12.g523000	<i>C3H.10</i>					✓	✓		
Cre12.g542500	<i>MOC1</i>						✓		
Cre14.g620850	<i>NSG17</i>							✓	✓
Cre16.g673250	<i>NRR1</i>			✓	✓		✓	✓	
Cre03.g182700	<i>Bbox</i>		✓						
Cre12.g510350	<i>bZIP</i>								
TAP									
Cre07.g332250	<i>bHLH1</i>								
Cre05.g238250	<i>bZIP (bLZ2)</i>								
MM									
Cre13.g572450	<i>Orphans.8</i>		✓	✓	✓				
Cre01.g034350	<i>MYBL13</i>	✓							✓
Cre02.g085150	<i>SBP.4</i>			✓	✓				
Cre02.g113450	<i>MYBL7</i>								
Cre02.g119800	<i>FHA.2</i>	✓							
Cre03.g160600	<i>GATA1</i>	✓							✓
Cre03.g212641	<i>TAZ.1</i>	✓							
Cre04.g226400	<i>YC.1</i>			✓				✓	
Cre06.g297150	<i>RWP9</i>	✓							
Cre07.g341800	<i>CGL107</i>			✓		✓			✓
Cre09.g408051	<i>mTERF.3</i>							✓	
Cre10.g453500	<i>RWP.1</i>								
Cre11.g467665	<i>TIG.1</i>		✓		✓				
Cre12.g495100	<i>PSR1</i>	✓	✓				✓		
Cre12.g522400	<i>MYBL10</i>	✓	✓	✓	✓				
Cre12.g550250	<i>CPP.1</i>						✓		
Cre12.g557300	<i>bZIP6</i>			✓					
Cre16.g667900	<i>AP2.15</i>			✓					✓
Cre16.g677382	<i>MYBL5</i>			✓					
Cre06.g310500	<i>bZIP</i>	✓						✓	
Cre07.g344668	<i>bZIP</i>			✓					
Cre13.g572450	<i>ARR-B</i>		✓	✓	✓				
Cre14.g633789	<i>Myb like</i>			✓					
Cre16.g671200	<i>bZIP</i>			✓					

Continuación de la Tabla 12.

Factores de Transcripción regulados negativamente									
TAP y MM									
Locus ID	TF	NIT2	NSG17	BLZ8	MYBL13	MYBL5	PSR1	bZIP (bLZ2)	CrebZIP14
Cre06.g275350	ROC40					✓		✓	
Cre12.g501600	bLZ8			✓			✓		
Cre17.g746547	bZIP2					✓			
TAP									
Cre12.g507500			✓			✓			
MM									
Cre12.g489600			✓	✓					
Cre06.g275500			✓						
Cre01.g014050		✓							
Cre12.g534450	CGL86								
Cre11.g476200	NZF1							✓	
Cre04.g229948							✓		
Cre03.g198800		✓					✓		
Cre12.g501600	bLZ8			✓			✓		
Cre15.g635100									
Cre16.g649433					✓				
Cre01.g003376					✓				
Cre17.g746547	bZIP2					✓			
Cre05.g240650	DNJ32		✓	✓					
Cre06.g278136									

**Anexo III Tabla 13. Motivos de unión a TFs identificados en los promotores en genes de la asimilación de nitrato, nitrógeno orgánico, núcleo de genes regulados positivamente por nitrato y NIT2 y núcleo de genes que se regulan negativamente por nitrato y NIT2**

MOTIVOS DE UNIÓN A LOS TF INDICADOS PRESENTES EN EL NÚCLEO. GENES REGULADOS POSITIVAMENTE EN TAP Y MM Y DEPENDIENTES DE NIT2									
Locus ID	Gen	NIT2	NSG17	BLZ8	MYBL13	MYBL5	PSR1	bLZ2	bZIP14
Cre01.g012050	NAR1.6								
Cre02.g089311									
Cre03.g152300						✓			
Cre04.g214050	MOT1								
Cre05.g234656		✓				✓			
Cre06.g277450			✓						
Cre06.g303050	NIT3	✓				✓		✓	✓
Cre07.g322250	CNX6	✓		✓	✓	✓			✓
Cre07.g348350	PWR8			✓					
Cre08.g360550	NIRK						✓		
Cre08.g378150	GLD2		✓						
Cre08.g382545	CNX7								✓
Cre09.g391450	HCP1								
Cre09.g391650	HCP4		✓	✓					
Cre09.g393506	HCP3								
Cre09.g395950	AOX1				✓	✓	✓	✓	
Cre09.g396000	NRT2.3				✓	✓	✓		
Cre09.g401145				✓				✓	
Cre09.g405750	CAH8						✓		
Cre09.g410050									
Cre09.g410750	NII1			✓		✓			✓
Cre09.g410800	NRT2.2		✓						
Cre09.g410850	NRT2.1	✓	✓	✓					
Cre09.g410900	NAR2	✓	✓	✓					
Cre09.g410950	NIT1	✓			✓				
Cre10.g432950			✓						✓

Cre11.g467535	MCP26		✓	✓	✓		
Cre11.g477550			✓				
Cre12.g500600	VMA21						
Cre12.g513900							
Cre12.g526800	GND1	✓					
Cre12.g532800					✓		
Cre12.g540351	SELW2		✓	✓	✓		
Cre12.g545550		✓	✓			✓	
Cre12.g553350	LCI6		✓				
Cre13.g572500	CGL14		✓	✓			
Cre13.g602901	CNX2	✓					
Cre14.g615350	THB2						
Cre14.g615400	THB1	✓	✓				
Cre14.g620850	NSG17						✓
Cre14.g624800		✓	✓				
Cre14.g632860						✓	
Cre15.g641400							
Cre16.g654050			✓				
Cre16.g658400	FDX2			✓			
Cre16.g658850		✓			✓		

**MOTIVOS DE UNIÓN A LOS TF INDICADOS Y PRESENTES EN EL NÚCLEO. GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE EN TAP Y MM Y DEPENDIENTES DE NIT2**

Cre01.g008250			✓		✓		
Cre01.g012700	KCN6		✓		✓	✓	✓
Cre03.g159254	AMT1.1	✓				✓	✓
Cre06.g260700	UAPA6		✓	✓	✓	✓	
Cre09.g389050	MAW4		✓			✓	
Cre10.g442800	UAPA1		✓	✓		✓	✓
Cre12.g510350							
Cre12.g551352	LAO1		✓				

**MOTIVOS DE UNIÓN A LOS TF INDICADOS PRESENTES EN OTROS GENES DE LA ASIMILACIÓN/METABOLISMO DE NITRATO**

Cre13.g580150	MOT2	✓			✓			
Cre10.g451400	CNX1E							
Cre06.g282150	CNX1G						✓	
Cre08.g361050	CNX3	✓			✓			
Cre09.g402034	CNX5							
Cre09.g390050	MCP1				✓			
Cre09.g389089	ARC							
Cre12.g543400	GSNOR1		✓	✓				✓
Cre12.g543350	GSNOR2							
Cre01.g015000	NAGK1		✓					
Cre07.g357350	PII		✓	✓				
Cre09.g393543	HCP2	✓		✓	✓			
Cre01.g007950	CYP55	✓					✓	
Cre03.g150101	NRT2.4						✓	✓
Cre03.g150151	NRT2.5	✓			✓	✓		✓
Cre02.g110800	NRT2.6	✓		✓	✓			
Cre04.g224700	NRT1.1							✓
Cre09.g801078	NAR1.1		✓		✓		✓	
Cre06.g309000	NAR1.2							
Cre04.g217915	NAR1.3		✓					
Cre07.g335600	NAR1.4				✓			
Cre12.g541250	NAR1.5		✓	✓				
Cre01.g012050	NAR1.6							

**MOTIVOS DE UNIÓN A LOS TF INDICADOS PRESENTES EN GENES PARA LA ASIMINACIÓN DE NITROGENO ORGÁNICO**

Cre08.g360200	DUR3A		✓	✓		✓	✓	
Cre08.g360250	DUR3B				✓			
Cre17.g703800	DUR3C							

Cre08.g360350	ADI1		✓					✓	✓
Cre03.g145267	GDA								
Cre08.g360050	DUR1	✓	✓		✓	✓	✓		✓
Cre08.g360100	DUR2				✓				
Cre10.g442800	UAPA1		✓		✓			✓	✓
Cre10.g442600	UAPA2		✓						
Cre10.g433200	UAPA3	✓				✓		✓	✓
Cre10.g433250	UAPA4	✓				✓		✓	✓
Cre10.g448450	UAPA5	✓		✓	✓	✓		✓	
Cre06.g260700	UAPA6			✓	✓	✓			
Cre12.g504950	UOX1					✓			
Cre12.g545101	XDH1								
Cre13.g592050	DAL1	✓							
Cre13.g580700	DAL2					✓			
Cre12.g551352	LAO1		✓						
Cre12.g551350	RIDA		✓						
Cre03.g159254	AMT1.1	✓						✓	✓
Cre14.g629920	AMT1.2		✓						
Cre12.g530600	GLN3			✓					

