



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Identificación de factores de transcripción de *Solanum
lycopersicum* L. implicados en la eficiencia en el uso del
nitrógeno

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Carrascosa Soriano, Marta

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a: Molina Romero, Rosa Victoria

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

Alumna: Marta Carrascosa Soriano

Tutor: Sergio González Nebauer

Cotutora: Rosa Victoria Molina Romero

Valencia, Julio 2022

Título

Identificación de factores de transcripción de *Solanum Lycopersicum L.* implicados en la eficiencia de uso de nitrógeno.

Resumen

La creciente demanda de alimentos de la población mundial en crecimiento exponencial y la emergencia del cambio climático, hacen necesario maximizar la producción agrícola en condiciones sostenibles. En la actualidad, sólo el 47% del nitrógeno aportado por la fertilización es asimilado por los cultivos. Esta práctica contamina de forma continua la geosfera, hidrosfera y atmósfera, con graves consecuencias para el medio ambiente, como la pérdida de la salubridad del agua y de biodiversidad acuática, así como el aumento de los gases de efecto invernadero y el calentamiento global. Datos globales recogidos por la FAO niegan la existencia de una relación directa entre la fertilización y el rendimiento agrícola y ponen de manifiesto la necesidad de priorizar la mejora de la eficiencia de uso de nitrógeno (NUE) de las especies de cultivo intensivo como única vía sostenible hacia un rendimiento agrícola superior.

El conocimiento fisiológico de la NUE se restringe a pocas especies, principalmente a *Arabidopsis thaliana*. En tomate, una de las principales especies hortícolas a nivel mundial, este conocimiento es escaso. El presente trabajo pretende analizar la relación de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4*, descritos en *A. thaliana*, por su papel en la respuesta primaria a nitrato, con la respuesta de tomate a la deficiencia de nitrógeno. Con este objetivo, se analizó su expresión mediante RT-qPCR en cuatro entradas del banco de germoplasma (MM, CV32, CV70 y CV82) del COMAV con diferencias en la NUE y la producción, tras su cultivo en dos niveles de fertilización nitrogenada, aporte suficiente (100 N) y aporte limitante (50 N) de nitrógeno. Asimismo, se evaluó el crecimiento vegetativo de los cultivares, mediante el análisis de la biomasa, la altura, parámetros fotosintéticos (F_v/F_m y $\Phi PSII$) y el SPAD, para estudiar su relación con la expresión diferencial de *NLP9* y *TGA4* entre los dos niveles de fertilización.

Los diferentes cultivares estudiados varían en la respuesta a la limitación en el aporte de nitrógeno. Los cultivares MM y CV82 mostraron un menor descenso del crecimiento vegetativo, mientras que el cultivar CV32 se vio más afectado por la deficiencia de nitrógeno.

Se ha observado una gran variación en la expresión de los genes *TGA4* y *NLP9* entre los cultivares, y en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. No se ha observado una relación entre la expresión del gen *NLP9* con la biomasa o la NUE de las plantas.

Se ha observado la inducción por nitrógeno de *TGA4* en los cultivares con mayor NUE en producción, MM y CV70, lo que podría sugerir su implicación en los procesos implicados en la NUE y la posibilidad de emplear este gen como marcador para la selección de genotipos con NUE superior. Asimismo, su expresión se ha relacionado, a nivel ambiental, con el aumento de la biomasa de estos cultivares.

Palabras clave

Agricultura sostenible, nitrógeno, fertilizantes, rendimiento agrícola, eficiencia de uso de nitrógeno (NUE), *Solanum Lycopersicum L.*, factores de transcripción.

Student: Marta Carrascosa Soriano

Professor: Sergio González Nebauer

Co-professor: Rosa Victoria Molina Romero

Valencia, July 2022

Title

Identification of *Solanum lycopersicum* L. transcription factors involved in nitrogen use efficiency.

Summary

The growing demand for food from the world's exponentially growing population and the emergence of climate change make it necessary to maximize agricultural production under sustainable conditions. Currently, only 47% of the nitrogen provided by fertilization is assimilated by crops. This practice continuously pollutes the geosphere, hydrosphere and atmosphere, with serious consequences for the environment, such as the loss of water health and aquatic biodiversity, as well as the increase in greenhouse gases and global warming. Global data collected by FAO deny the existence of a direct relationship between fertilization and agricultural yield and highlight the need to prioritize improving the nitrogen use efficiency (NUE) of intensively cultivated species as the only sustainable pathway to superior agricultural yield.

Physiological knowledge of NUE is restricted to a few species, mainly *Arabidopsis thaliana*. In tomato, one of the main horticultural species worldwide, this knowledge is scarce. The present work aims to analyze the relationship of the transcription factors *NLP9* and *TGA4*, described in *A. thaliana*, for their role in the primary response to nitrate, with the tomato response to nitrogen deficiency. With this objective, its expression was analyzed by RT-qPCR in four entries of the germplasm bank (MM, CV32, CV70 and CV82) of the COMAV with differences in the NUE and production, after its cultivation in two levels of nitrogen fertilization, sufficient (100 N) and limiting (50 N) nitrogen supply. Likewise, the vegetative growth of the cultivars was evaluated, through the analysis of biomass, height, photosynthetic parameters (F_v/F_m and Φ_{PSII}) and SPAD, to study their relationship with the differential expression of *NLP9* and *TGA4* between the two levels of fertilization.

The different cultivars studied vary in the response to the limitation in nitrogen input. The MM and CV82 cultivars showed a smaller decrease in vegetative growth, while the CV32 cultivar was more affected by nitrogen deficiency.

Great variation has been observed in the expression of the *TGA4* and *NLP9* genes between cultivars, and in response to nitrogen deficiency. No relationship has been observed between the expression of the *NLP9* gene with biomass or the NUE of plants.

Nitrogen induction of *TGA4* has been observed in cultivars with higher NUE in production, MM and CV70, which could suggest its involvement in the processes involved in NUE and the possibility of using this gene as a marker for the selection of genotypes with superior NUE. Likewise, its expression has been related, at the environmental level, to the increase in the biomass of these cultivars.

Keywords

Sustainable agriculture, nitrogen, fertilizers, agricultural yield, nitrogen use efficiency (NUE), *Solanum Lycopersicum* L., transcription factors.

AGRADECIMIENTOS

No podría empezar esta sección sin agradecer a mi madre el cariño, las enseñanzas, el esfuerzo y la dedicación con la que me crio y me hizo como persona. Su ejemplo y recuerdo es mi motor e inspiración para continuar y dar siempre lo mejor de mí.

Gracias a mis tíos y a mi prima por enseñarme que su hogar siempre fue el mío, sin importar la distancia o el tiempo que mediara entre nosotros. Vuestro calor, apoyo, ayuda y comprensión han sostenido mis pasos en mis momentos de mayor flaqueza y han hecho posible que hoy llegue a la meta con el menor de los rasguños.

Tampoco puedo olvidar a mi segunda familia, mis amigos. Gracias a mis compañeras de piso y amigos de Valencia, a Patricia, a Valentina, a Victoria, a Carla, a Elena, a María y a Javier, por llenar mi paso por esta ciudad de recuerdos inolvidables y hacer de ella mi segundo hogar, a la que siempre querré regresar. Gracias a mis amigos de Úbeda y compañeros de vida, a Soledad, a Javier, a Joserra y a Natalia por creer siempre en mí, estar en todo momento y enseñarme que para nuestra amistad la distancia no significa nada.

Por último, pero no por ello menos importante, gracias a Victoria por ser la mejor compañera de laboratorio que podría tener, estoy muy orgullosa de haber crecido a tu lado como científica y persona, gracias por tu paciencia y ayuda en todo momento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. NUE.....	3
1.2. TRANSPORTADORES DE NITRÓGENO ORGÁNICO E INORGÁNICO	4
1.3. PERCEPCIÓN DEL NITRÓGENO EXTERNO	4
1.4. REGULACIÓN LOCAL DEL TRANSPORTE DE NITRÓGENO	4
1.1.1. <i>Regulación de la absorción de nitrato</i>	4
1.1.2. <i>Regulación de la absorción de amonio</i>	5
1.1.3. <i>Regulación de la absorción de aminoácidos</i>	6
1.1.4. <i>Regulación de la absorción de urea</i>	6
1.5. PERCEPCIÓN DEL ESTATUS INTERNO DE NITRÓGENO Y SEÑALIZACIÓN SISTÉMICA	7
1.6. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA RESPUESTA A NITRÓGENO	9
1.6.1. <i>Familia RWP-RK</i>	10
1.6.2. <i>Familia bZIP</i>	12
1.6.3. <i>Familia TGA</i>	12
1.6.4. <i>Familia TCP</i>	13
1.7. ESTUDIO DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA EFICIENCIA DE USO DE NITRÓGENO EN ESPECIES DE CULTIVO INTENSIVO: CLAVE PARA UNA AGRICULTURA SOSTENIBLE.....	14
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	15
3.1.1. <i>Cultivares</i>	15
3.1.2. <i>Condiciones de cultivo</i>	16
3.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS	16
3.2.1. <i>Determinación del contenido en clorofilas</i>	17
3.2.2. <i>Determinación de la fluorescencia de las clorofilas</i>	17
3.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO	18
3.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN <i>NLP9</i> Y <i>TGA4</i>	18
3.4.1. <i>Muestreo y triturado</i>	18
3.4.2. <i>Extracción de RNA</i>	18
3.4.3. <i>Retrotranscripción (RT-PCR)</i>	18
3.4.4. <i>Diseño in silico de cebadores específicos</i>	19
3.4.5. <i>RT-qPCR para el análisis de expresión de NLP9 y TGA4</i>	20
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
4. RESULTADOS	21
4.1. VARIACIÓN ENTRE CULTIVARES EN LA RESPUESTA A LA DISMINUCIÓN DEL APORTE DE NITRÓGENO PARA CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO	21
4.2. VARIACIÓN ENTRE CULTIVARES EN LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN <i>NLP9</i> Y <i>TGA4</i> EN RESPUESTA A LA DISMINUCIÓN DEL APORTE DE NITRÓGENO.....	24
4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	25
4.4. CORRELACIONES ENTRE LA EXPRESIÓN DE <i>NLP9</i> Y <i>TGA4</i> Y LOS PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS Y DE CRECIMIENTO VEGETATIVO	28
5. DISCUSIÓN	29

5.1. RESPUESTA A LA DISMINUCIÓN EN EL APORTE DE NITRÓGENO DE LOS CULTIVARES MM, CV32, CV70 Y CV82 DE TOMATE Y SU RELACIÓN CON LA NUE	29
5.2. CORRELACIONES DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN <i>NLP9</i> Y <i>TGA4</i> CON LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO VEGETATIVO.....	31
5.2.1. <i>Expresión diferencial de NLP9 en el cultivar MM y su relación con la biomasa y el SPAD</i>	31
5.2.2. <i>Expresión diferencial de TGA4 en los cultivares MM y 70 y su relación con la biomasa</i>	32
6. CONCLUSIONES.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Relación entre el rendimiento agrícola, expresado como el contenido proteico de las cosechas ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), y la fertilización total ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) en los sistemas agrícolas a nivel mundial entre los años 1961 y 2009. Fuente: Lassaletta L et al, 2014. <i>Environmental Research Letters</i>	2
Figura 1.2. Evolución del nitrógeno total aportado (Tg N) por las distintas fuentes de fertilización empleadas en los sistemas agrícolas a nivel mundial. Fuente: Lassaletta L et al, 2014. <i>Environmental Research Letters</i>	3
Figura 1.3. Evolución de la eficiencia de uso de nitrógeno (NUE) en los sistemas agrícolas a nivel global. Fuente: Lassaletta L et al, 2014. <i>Environmental Research Letters</i>	3
Figura 1.4. Integración de la respuesta local y sistémica a nitrógeno. Fuente: José M Alvarez et al., 2012. <i>Current Opinion in Plant Biology</i>	9
Figura 1.5. Modelo de señalización integrado por los módulos NRT1–CPK–NLP y NRT1–SPX–NLP, propuesto para la activación de la respuesta primaria a nitrato (PNR). Fuente: Maghiaoui et al. 2020. <i>Journal of Experimental Botany</i>	11
Figura 1.6. Señalización sistémica de nitrógeno ejercida por los péptidos CEPs e inducida por la interacción HBI1-TCP20. Fuente: Xiaoqian Chu et al., 2021. <i>Journal of Integrative Plant Biology</i>	13
Figura 3.1. Producción (g de fruto/planta) y ‘nitrogen use efficiency’ NUE (g N asimilado /g de N aportado) de las variedades MM, CV32, CV70 y CV82.	15
Figura 4.1. Peso fresco tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N).....	22
Figura 4.2. Altura tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N)	22
Figura 4.3. Rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII}) tras 20 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N).....	23
Figura 4.4. SPAD tras 20 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N).	23
Figura 4.5. Expresión relativa de NLP9 tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N).	24
Figura 4.6. Expresión relativa de TGA4 tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N).	25
Figura 4.7. Diagrama de pesos de las componentes 1 y 2.	26
Figura 4.8. Diagrama de pesos de las componentes 1 y 3.	26
Figura 4.9. Diagrama de dispersión de las réplicas de los genotipos en función de las componentes 1 y 2.	27
Figura 4.10. Diagrama de dispersión de las réplicas de los genotipos en función de las componentes 1 y 3.	28
Figura 4.11. Correlaciones de los datos de expresión relativa de TGA4 y la biomasa de los cultivares MM y 70 en 50 N y 100 N.	28
Figura 4.12. Correlaciones de los datos de expresión relativa de NLP9 y los parámetros de crecimiento vegetativo.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 3.1. Composición de las soluciones nutritivas, la completa 100N (7,5 mM N, 100N) y la limitante (3,75 mM N, 50N).</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 3.2. Mix de reactivos para la transcripción reversa.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 3.3. Temperaturas de incubación para la reacción de transcripción reversa.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 3.4. Protocolo de la RT-qPCR.....</i>	<i>20</i>

1. Introducción

El nitrógeno es un macronutriente clave de la nutrición mineral de las plantas, forma parte de biomoléculas tan importantes para la vida como las proteínas, los ácidos nucleicos y la clorofila. Aun siendo el elemento más abundante en la atmósfera, hidrosfera y biosfera, su biodisponibilidad es muy reducida debido a que se encuentra principalmente en forma molecular (N_2), forma muy estable, poco reactiva y, por lo tanto, no asimilable por la mayoría de las plantas. Junto con el agua, es el principal factor limitante de la productividad de los cultivos (Louarn *et al.*, 2021). En el siglo XX, la aplicación de nitrógeno mediante fertilizantes sintéticos permitió ajustar el rendimiento de los cultivos a la creciente demanda de alimentos, y a la adopción de dietas ricas en proteína en los países en desarrollo. En la actualidad, el crecimiento exponencial de la población mundial explica la expansión anual del uso de los fertilizantes, la cual en el 2019 ya excedía los 170 Mt, y que se prevé que aumente hasta los 236 Mt en 2050, año en el que población mundial habrá alcanzado los 9 billones de habitantes (Mogollón *et al.*, 2018).

Mediante la producción y uso de fertilizantes, los humanos alteran el ciclo biogeoquímico natural del nitrógeno fijando grandes cantidades de nitrógeno atmosférico a los suelos en forma de nitrógeno reactivo (N_r). Los fertilizantes nitrogenados más empleados en nuestros cultivos son nitrato amónico-cálcico, nitrato amónico, nitrosulfato amónico, sulfato amónico y urea (Anuario estadístico 2015, MAGRAMA).

En la actualidad, sólo el 47% del nitrógeno reactivo presente en el suelo, mayoritariamente aportado por los fertilizantes nitrogenados, es asimilado a productos cosechados a escala global (Lassaletta *et al.*, 2014). El nitrógeno restante se acumula en la rizosfera, principalmente en forma de ion amonio o ion nitrato. Los procesos de nitrificación y desnitrificación, que devolverían de forma natural ese nitrógeno a la atmósfera en su estado nativo (N_2), son procesos lentos, ocupan un tiempo en el que se puede producir el transporte del nitrógeno reactivo a la hidrosfera o a la atmósfera.

Los nitratos, compuestos por iones de mayor movilidad, no son adsorbidos por los compuestos coloidales del suelo, y pueden ser arrastrados hasta los cauces y reservorios superficiales, o bien lixiviar a las aguas subterráneas dependiendo del régimen de lluvias y de la textura de los suelos. En la hidrosfera, el nitrato no solo reduce la salubridad del agua, con nocivos efectos sobre la salud humana, sino que también provoca la pérdida de biodiversidad acuática (Gaspar *et al.*, 2011). Al concentrarse provoca la eutrofización del medio, esto es, fertiliza el medio y estimula la proliferación de algas, otras plantas y microorganismos acuáticos. Como resultado aumenta el consumo de oxígeno y disminuye la incidencia de la radiación solar, aspectos que influyen negativamente a la supervivencia del resto de organismos acuáticos (Bouwman *et al.*, 2013).

Las emisiones gaseosas de la producción agrícola son responsables de un cuarto del total de las emisiones globales de gases de efecto invernadero (GHG) y con ello del calentamiento global (Laborde *et al.*, 2021). Parte de estas emisiones resultan del escape a la atmósfera del nitrógeno reactivo aportado por los fertilizantes. Mediante la actividad microbiana del suelo y los procesos de nitrificación y desnitrificación, el nitrógeno reactivo del suelo puede escapar a la atmósfera en forma de nitrógeno molecular u óxidos de nitrógeno (NO_x): óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). También se puede producir la volatilización de gas amoníaco.

La emisión de nitrógeno reactivo a la atmósfera empeora la calidad del aire, afecta a la química del ozono, y contribuye al efecto invernadero. De hecho, el óxido nitroso, cuya emisión es fundamentalmente debida a la aplicación de fertilizantes orgánicos y sintéticos, es un gas de efecto invernadero más nocivo que el CO_2 pues, aun encontrándose en concentraciones menores en la atmósfera, posee mayor capacidad de calentamiento global, esto es, mayor capacidad para absorber la radiación reflejada por la superficie terrestre. Según información aportada por el Grupo Intergubernamental de expertos sobre el cambio climático de las Naciones Unidas (IPCC), la concentración de óxido nitroso en la atmósfera ha aumentado en un 16% desde 1750 (Moro, M. 2019).

El previsto aumento de la fertilización con nitrógeno sintético no es suficiente para asegurar un aumento proporcional de la producción agrícola global en el futuro. Un análisis de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) que relaciona el rendimiento agrícola y la fertilización de 124 países, representativos del 99,6% de la superficie de cultivo global, entre el 1961 y el 2009, lo demuestra (Lassaletta *et al.*, 2014). En él el rendimiento agrícola se expresa como contenido de nitrógeno o contenido proteico de las cosechas ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) y la fertilización ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) comprende el nitrógeno reactivo aportado al suelo por el abono, los fertilizantes sintéticos, la fijación simbiótica y la deposición natural. En la mayoría de los países, raramente se observa una relación lineal entre ambos parámetros, en su lugar los datos se ajustan a una función exponencial negativa que evidencia la existencia de un valor de rendimiento máximo (Y máx.) a partir del cual el incremento de la fertilización no obtiene respuesta de la producción (figura 1.1.).

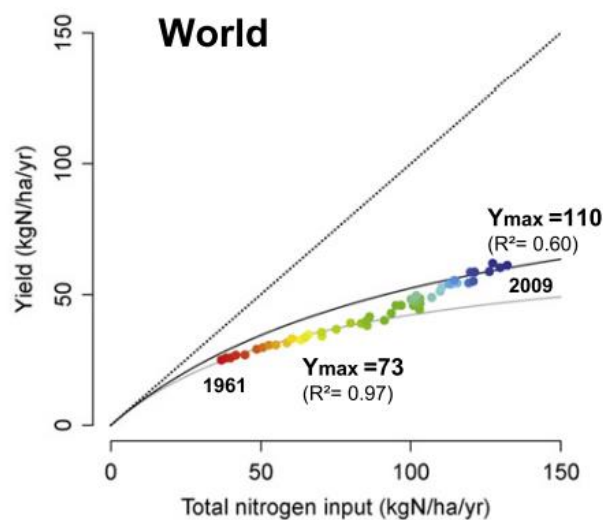


Figura 1.1. Relación entre el rendimiento agrícola, expresado como el contenido proteico de las cosechas ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), y la fertilización total ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) en los sistemas agrícolas a nivel mundial entre los años 1961 y 2009. Fuente: Lassaletta L *et al.*, 2014. *Environmental Research Letters*.

Desde los sesenta hasta la actualidad, el uso de los fertilizantes sintéticos a escala global ha aumentado en un factor de nueve, presentándose como la principal fuente de fertilización, mucho mayor que la producida por la fijación biológica, los abonos o la deposición natural (figura 1.2). Sin embargo, no es hasta los años ochenta cuando se produce un cambio de tendencia en la relación entre la fertilización y el rendimiento agrícola global: el rendimiento máximo (Y máx.)

aumenta de aproximadamente $70 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ a $110 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (figura 1.1.). Este cambio no se explica por el aumento de la fertilización sintética, sino por la estabilización de la eficiencia de uso de nitrógeno de los cultivos (NUE), entendiéndose esta como la relación entre la fertilización total y el rendimiento agrícola de los sistemas agrícolas globales. La NUE que había descendido de 68% al 45% entre 1961 y 1980, se estabiliza al 47% durante los siguientes 30 años, hasta la fecha que abarca el estudio (figura 1.3.).

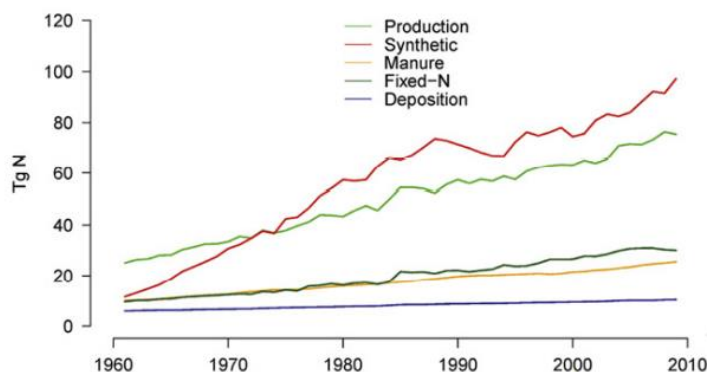


Figura 1.2. Evolución del nitrógeno total aportado (Tg N) por las distintas fuentes de fertilización empleadas en los sistemas agrícolas a nivel mundial. Fuente: Lassaletta L et al, 2014. *Environmental Research Letters*.

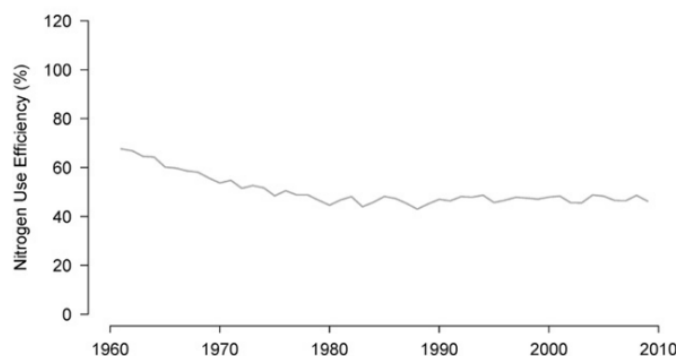


Figura 1.3. Evolución de la eficiencia de uso de nitrógeno (NUE) en los sistemas agrícolas a nivel global. Fuente: Lassaletta L et al, 2014. *Environmental Research Letters*.

De los resultados se deduce que el aumento de la fertilización sintética tendrá un mayor impacto negativo a nivel medioambiental que positivo sobre la producción agrícola, a no ser que se consiga mejorar la eficiencia de uso del nitrógeno (NUE) de los sistemas agrícolas (Lassaletta et al., 2014).

1.1. NUE

La eficiencia de uso de nitrógeno (NUE) es una medida de cuanto nitrógeno aportado en la fertilización es utilizado por la planta. A su vez, está compuesta por la eficiencia de absorción del nitrógeno y la eficiencia de transformación de este en grano o eficiencia de utilización (Plett

et al., 2017). Es un parámetro complejo, puesto que depende del desarrollo de diversos procesos fisiológicos como la adquisición de nitrógeno, la asimilación, el almacenamiento, la removilización y la distribución entre los distintos órganos de la planta.

Dada su complejidad, la NUE depende de un gran número de genes diferentes. En primer lugar, proteínas sensoras capaces de percibir y activar una respuesta al nitrógeno del medio, en segundo lugar los factores de transcripción que median las cascadas de señalización que desencadenan las primeras y en tercer lugar, la amplia gama de dianas génicas que regulan estos: transportadores de nitrógeno, genes relacionados con los procesos de asimilación del nitrógeno, otros factores de transcripción, genes relacionados con el control de la mitosis y la modulación de la arquitectura radicular.

1.2. Transportadores de nitrógeno orgánico e inorgánico

Los principales suministros de nitrógeno en los suelos agrícolas son los nitratos y la urea (Renau-Morata *et al.*, 2021). En las raíces se han identificado una gran variedad de transportadores de nitrógeno orgánico (aminoácidos, proteínas y péptidos) e inorgánico (nitrato, amonio y urea) con diferentes afinidades y especificidades de sustrato. Los principales se agrupan en las siguientes familias de transportadores: los transportadores de la familia *AMT* y acuaporinas median el transporte de amonio; los de las familias *NPF/NRT1*, *NRT2* y *CLC*, el transporte de nitrato; los transportadores de las familias *DUR3* y acuaporinas, el transporte de urea, y los transportadores de la superfamilia *APC* y de la familia *UmamiT*, el transporte de aminoácidos, siendo esta la fuente más investigada en cuanto a absorción de nitrógeno orgánico (Tegeeder *et al.*, 2018). La enorme diversidad de transportadores mencionada permite mantener el suministro de nitrógeno ante cambios en la composición del medio y en condiciones de estrés.

1.3. Percepción del nitrógeno externo

El paso previo a la adquisición del nitrógeno del medio es la percepción del estatus externo de nitrógeno por las células de la epidermis de la raíz. En ellas se encuentran proteínas sensoras, a menudo transportadores de amonio y nitrato, que reciben el nombre de transceptores por su actividad dual de detección y señalización del estatus externo de nitrógeno, así como de transporte de éste hacia al interior de las células. De esta forma, las plantas son capaces de responder a pequeñas fluctuaciones del nitrógeno biodisponible en el medio mediante la activación de complejas redes de regulación para optimizar su utilización, tanto a nivel de absorción como de asimilación. Las consecuencias se observan a nivel local y global: cambian los patrones de crecimiento de la raíz, el desarrollo de la planta y se ajusta la expresión de los genes transportadores de nitrógeno en respuesta a la concentración y composición de la fuente de nitrógeno del medio (Xuan *et al.*, 2017).

La demanda de nitrógeno interna, determinada por el estatus intrínseco de nitrógeno de la planta, también es percibida y regula la absorción de nitrógeno en las raíces. Sin embargo, esta regulación es más desconocida que la ejercida por el nitrógeno del medio (Liu *et al.*, 2017).

1.4. Regulación local del transporte de nitrógeno

1.1.1. Regulación de la absorción de nitrato

El nitrato del medio no sólo es un nutriente sino también una señal que regula la transcripción de sus propios transportadores, en concreto de los transportadores *NPF6.3/NRT1.1*, *NPF7.3/NRT1.5*, *NPF7.2/NRT1.8*, *NRT2.1* y *NRT2.2*. La regulación transcripcional de los transportadores de nitrógeno a menudo es compleja y multifactorial, por ejemplo, en el caso

del amonio y el nitrato, el fotoperiodo también regula la transcripción de sus transportadores (Tegeeder *et al.*, 2018).

El sensor de nitrato por excelencia es el transceptor *AtNRT1.1/AtNPF6.3/CHL1* descrito en *A. thaliana*. Se trata de un transportador de nitrato de afinidad dual, característica única de este transportador, y del sensor de la señalización por nitrato (Maghiaoui *et al.*, 2020).

En cuanto al transporte de nitrato, este receptor modula su afinidad en respuesta a la concentración externa de nitrato, a bajas concentraciones recluta a la quinasa *CIPK23* que, acompañada con el sensor de calcio *CBL1/9*, fosforila al transportador su residuo de treonina 101, permitiendo adoptar el estado de alta afinidad por nitrato. A altas concentraciones de nitrato, se produce la desfosforilación de este residuo y el receptor cambia al estado de baja afinidad por nitrato. El estado de fosforilación de *AtNRT1.1* activa diferentes rutas de señalización. La forma no fosforilada activa de forma más efectiva la respuesta primaria a nitrato (Maghiaoui *et al.*, 2020).

En cuanto a la señalización, el transceptor actúa en cuatro mecanismos de señalización desencadenados por cambios en la conformación de la proteína *AtNRT1.1*. en respuesta a diferentes concentraciones de nitrato en el medio. Como resultado se obtienen diversas respuestas fisiológicas y morfológicas: respuesta primaria a nitrato a altas concentraciones; inducción y represión de diferentes clusters de genes de respuesta a nitrógeno a altas concentraciones; represión de la formación de raíces laterales a niveles bajos de nitrato; represión del receptor *AtNRT2.1* por retroalimentación a largo plazo desencadenado por la presencia de amonio o aminoácidos en el medio junto con nitrato. Este último mecanismo destaca por señalar la interacción entre las diferentes fuentes de nitrógeno del medio y su capacidad para afectar a la expresión de los transportadores de nitrato (Maghiaoui *et al.*, 2020).

Aunque el mecanismo de transducción de la señal todavía se está investigando, ya se conoce la participación del calcio como segundo mensajero, así como algunas de las proteínas quinasas dependientes de calcio (*CPK10*, *CPK30* y *CPK32*) y algunos los de factores de transcripción involucrados en la respuesta a nitrato: *SLP9*, *TGA1/4* y *NLP7*. El rápido transporte de estos factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo celular permite responder de forma inmediata a la señal por nitrato. En *A. thaliana* el factor de transcripción *NLP7* se activa por fosforilación de una *CPK* y se transporta al núcleo en tan solo 3 minutos desde que se transfieren las plantas de un medio desprovisto de nitrato a un medio con nitrato (Zhang *et al.*, 2020).

Además de la regulación por el nitrato externo, la actividad de los transportadores de nitrato también puede estar regulada por el estatus interno de nitrógeno de la planta. Evidencia de ello es la regulación epigenética del transportador *NRT2.1*: ante una provisión alta de nitrógeno, el componente *HNI9* (alelo del gen *IWS1*) de la RNA polimerasa II, regulador de la metilación de las histonas, introduce metilaciones en la cromatina de *NRT2.1*, silenciando su actividad mediante la supresión de elementos cis del promotor (Xuan *et al.*, 2017).

1.1.2. Regulación de la absorción de amonio

En el caso del amonio, al igual que ocurría con el nitrato, su concentración en el medio es percibida por transceptores de amonio que intervienen en la regulación transcripcional de sus transportadores mediante la activación de factores de transcripción de genes de respuesta a amonio. Otros factores, además del amonio externo, median la regulación transcripcional de los transportadores *AMT*: brasinoesteroides (Tegeeder *et al.*, 2018), la glutamina citosólica, el

fotoperiodo, la simbiosis con micorrizas, la concentración de CO₂ atmosférico y el inicio de la senescencia de las hojas (Hao *et al.*, 2020).

Los factores de transcripción relacionados con la regulación de los transportadores AMTs descubiertos hasta la fecha resultan de estudios transcriptómicos en *A. thaliana* y *Oryza sativa*, y son diversos: *OsIDD10*, *OsDOF18*, *OsDof25* en *S. Oryzae*, y *OsDof25* y *HY5* en *A. thaliana* (Hao *et al.*, 2020).

Además de la regulación transcripcional, estos transportadores también están regulados a nivel postranscripcional y postraducciona mediante fosforilación dependiente de amonio. La quinasa *CIPK23* fosforila *AtAMT1;1* y *AtAMT1;2* e inhibe el transporte de amonio (Tegeder *et al.*, 2018).

En cuanto a los sensores de amonio, se propone a *AMT1;1* como potencial transceptor de amonio. Estudios en *A. thaliana* han demostrado que el transporte de amonio con *AMT1;1* está regulado alostéricamente por la fosforilación de su dominio C-terminal. *AMT1;1* es un complejo homotrimérico formado por tres proteínas, cada una forma un poro e interacciona en su dominio C-terminal con el poro del monómero contiguo, produciendo la transactivación del transporte de amonio. En déficit de amonio, la treonina T460 del dominio C-terminal de cada monómero se encuentra defosforilada tal que se produce la transactivación, y *AMT1;1* transporta amonio. Por el contrario, el exceso de amonio produce la fosforilación del residuo T460, lo cual cancela la interacción entre los monómeros, la transactivación del complejo y con ello la actividad de *AMT1;1* (Liu *et al.*, 2017).

Se ha demostrado, además, que el transportador *AMT1;1* regula de forma específica la respuesta al amonio extracelular puesto que su fosforilación no atiende a cambios en la concentración de los productos de asimilación del amonio (Liu *et al.*, 2017).

De forma paralela a *AMT1;1*, *AMT1;3* también podría actuar como transceptor. Aunque su actividad no este regulada por fosforilación, cambia de forma específica con la concentración de amonio externo: los oligómeros del transportador desaparecen de la membrana plasmática a altas concentraciones de amonio mientras que, en su ausencia, tienen un tiempo de residencia relativamente alto en la misma. En cuanto a la señalización, aún desconocida, *AMT1;3* coordina la respuesta de las raíces a la concentración de amonio (Liu *et al.*, 2017).

1.1.3. Regulación de la absorción de aminoácidos

Es menos conocida, la información disponible se limita a estudios transcripcionales.

Se conoce que su expresión es dependiente de célula, específica de tejido, regulada a nivel de desarrollo y afectada por factores exógenos, bióticos y abióticos, y endógenos, como el estado redox de la planta (Tegeder *et al.*, 2018).

1.1.4. Regulación de la absorción de urea

La urea es el fertilizante más ampliamente utilizado en la agricultura a escala global (<http://faostat.fao.org>). En los suelos agrícolas, la concentración de urea generalmente es baja porque es hidrolizada rápidamente por la ureasa microbiana a amoníaco. Por ello, durante un buen tiempo se pensó que la fertilización con urea aportaba nitrógeno a los cultivos principalmente en forma de amonio. Esta idea cambió cuando se identificaron transportadores de alta afinidad por la urea y se descubrió que la mayoría de los tejidos de las plantas presentan actividad ureasa endógena, evidencias que ponen de manifiesto la capacidad de las plantas de

usar la urea de forma directa como fuente de nitrógeno. De hecho, la urea es una molécula principal en la translocación y el reciclaje del nitrógeno en las plantas (Muratore *et al.*, 2021).

El primer transportador de urea fue identificado en *A.thaliana*, *DUR3*, un simportador de alta afinidad que permite la absorción de la urea del medio en contra de gradiente mediante simporte con protones. Estudios transcriptómicos y fisiológicos en la especie modelo desvelaron la regulación del transportador *DUR3*. Su expresión se mantiene alta en medio carente de nitrógeno, es inducida con el aporte de urea, y reprimida por el nitrógeno inorgánico, con el aporte de amonio o nitrato al medio. La represión por nitrógeno inorgánico posiblemente se deba al mayor rendimiento de las formas inorgánicas como fuente de nitrógeno (Muratore *et al.*, 2021). *DUR3* también podría estar relacionado con el transporte interno de urea pues se expresa cerca del xilema de la raíz y en el tallo y en un experimento se observó que las plantas mutantes para el gen de la ureasa acumulaban grandes cantidades de urea en el tallo tras ser cultivadas en un medio con urea (Witte *et al.*, 2011).

Tras su caracterización en *A. thaliana*, se identificaron ortólogos de *AtDUR3* de copia única en todo el linaje verde, desde las algas hasta especies de plantas superiores como el maíz, y en tomate. En tomate se observaron, además, cambios en la expresión del transportador entre cultivares con diferente NUE (Witte *et al.*, 2011).

El transporte pasivo de urea a concentraciones mayores es mediado por transportadores de baja afinidad pertenecientes a la familia de proteínas *MIP* ('*major intrinsic proteins*'), también conocidas como acuaporinas (Witte *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no se ha descrito ningún sensor de urea y se desconoce como ocurre la regulación de sus transportadores.

1.5. Percepción del estatus interno de nitrógeno y señalización sistémica

Para poder ajustar de forma precisa el transporte de nitrógeno a las demandas internas del metabolismo, crecimiento y desarrollo, las plantas deben integrar las señales externas de biodisponibilidad de nitrógeno con las señales internas que informan sobre el estatus de nitrógeno de los órganos. Análisis de estudios transcriptómicos en tiempo real, en *A.thaliana*, mostraron como en primer lugar la planta desarrolla una respuesta local a las señales sobre la biodisponibilidad de nitrato del medio y, más tarde, integra el estatus de nitrógeno interno y desarrolla la respuesta sistémica (figura 1.4.).

Sin embargo, a diferencia de la señalización a nivel local en las raíces, comentada en los apartados anteriores, poco se conoce sobre los metabolitos nitrogenados percibidos como señal del estatus interno de nitrógeno, las rutas de señalización que los detectan y los elementos moleculares que participan en la señalización a nivel sistémico para regular la absorción de nitrógeno en las raíces, de acuerdo con la demanda interna.

La regulación sistémica de la absorción de nitrato ha sido extensamente estudiada como un modelo para entender la señalización sistémica a nitrógeno mediante experimentos tipo '*split-root*'. Este diseño experimental consiste en repartir las raíces de la planta para su crecimiento en dos medios con condiciones nutricionales diferentes. Datos experimentales muestran como la exposición a una alta concentración de nitrato en un lado del diseño provoca la represión de la absorción de nitrato en el lado no tratado, efecto resultado de la señalización sistémica que ajusta de forma específica los sistemas de absorción de nitrato al aumento del estatus de nitrógeno interno de la planta.

La señalización a nivel sistémico parece estar mediada por diferentes tipos moleculares (figura 1.4.). En primer lugar, el nitrato molecular parece ser una de las señales de comunicación entre la raíz y el tallo sobre el estatus interno de nitrógeno. El estudio fenotípico de mutantes de la nitrato reductasa (*NR*) en el mismo experimento '*split-root*' anterior mostró una inhibición más fuerte en los mutantes del desarrollo de las raíces laterales. En la misma línea, otro experimento mostró como, mientras la señalización local se mantenía, la señalización sistémica se perdía en plantas decapitadas, lo que pone de manifiesto la importancia de la comunicación entre el tallo y la raíz para el desarrollo de una respuesta completa a nitrógeno (Ruffel S *et al.*, 2011). Además del nitrato, otros metabolitos nitrogenados como las reservas de aminoácidos también podrían funcionar como señales sistémicas de control de la respuesta a nitrógeno (Álvarez *et al.*, 2012).

En segundo lugar, microRNAs que se encuentran habitualmente en el sistema vascular, también parecen mediar la señalización sistémica. De hecho, los microRNAs que regulan componentes de las auxinas dependen de productos de la reducción y la asimilación del nitrato. Ejemplos de ello son los módulos *miR393/AFB3* y *miR167/ARF8* que coordinan el desarrollo de las raíces con la disponibilidad de nitrógeno (Álvarez *et al.*, 2012).

En tercer lugar, otras candidatas a señales sistémicas son fitohormonas como las auxinas, cuyo papel en la señalización desde el tallo del desarrollo lateral de las raíces ha sido bien descrito, y las citoquininas (*CK*), cuyo papel como señal sistémica era desconocido hasta hace poco. En concreto, se observó como la expresión de genes de respuesta sistémica a nitrógeno se veía fuertemente alterada en un mutante triple de isopentenil transferasas, enzimas de biosíntesis de citoquininas (Álvarez *et al.*, 2012).

En cuarto lugar, encontramos factores de transcripción móviles como *HY5*, factor de transcripción tipo *bZIP* que se produce en el tallo y es transportado por el floema hasta la raíz, donde promueve la absorción de nitrógeno mediante su unión directa al promotor del transportador de alta afinidad *AtNRT2.1*. Además de su participación en la señalización sistémica de nitrógeno, *HY5* regula el balance de C/N en la planta. Su capacidad de unión depende del nivel de foto-asimilados en el tallo.

En último lugar, péptidos pequeños como la hormona peptídica *CEP* ('*C-terminally Encoded Peptide*'), que actúa como una alarma interna de insuficiencia de nitrógeno, regulando la absorción y el desarrollo de las raíces y por su lado opuesto el péptido *CLE* ('*Clavata3/ESR-related*') que funciona como una alarma interna de saciedad, reprime la formación de nódulos simbióticos en leguminosas cuando hay abastecimiento suficiente de nitrógeno. Ambos péptidos se producen, en la raíz, se excretan al sistema vascular y encuentran sus receptores tipo *LRR-RLK* ('*leucine-rich repeat receptor-like kinase*') en el tallo. En concreto el péptido *CEP* encuentra su receptor *CEPR* en el sistema vascular de las hojas. Los componentes aguas abajo de la señalización por *CEP*, *CEPD1* y *CEPD2*, son transportados de vuelta a las raíces donde activan al transportador de nitrato de alta afinidad *AtNRT2.1* (Ohkubo *et al.*, 2017).

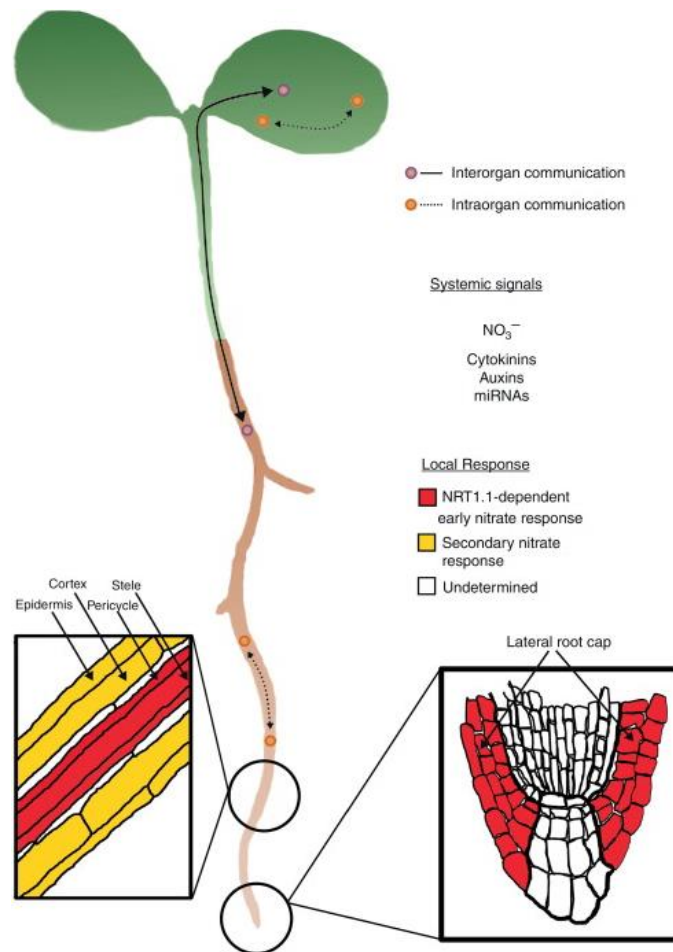


Figura 1.4. Integración de la respuesta local y sistémica a nitrógeno.
Fuente: José M Alvarez et al., 2012. *Current Opinion in Plant Biology*.

1.6. Factores de transcripción en la respuesta a nitrógeno

La mayoría de los factores de transcripción relacionados con la NUE trabajan en complejas redes de señalización en las que interaccionan de forma múltiple entre ellos, para conseguir coordinar de forma efectiva la respuesta a nitrógeno. A nivel de regulación transcripcional de la respuesta a nitrógeno, se han identificado, principalmente en *A.thaliana*, factores de transcripción pertenecientes a diversas familias, capaces de interactuar con regiones reguladoras de genes de respuesta a nitrato, y modular su expresión. Los mejor estudiados pertenecen a las familias *bZIP* (*TGA*, *HY5*, *HYH*), *TCP* (*TCP20*) y *NLP* (*NLP6/7/8*), incluida dentro de la familia *RWP-RK* (Maurya et al., 2020). Sus efectos reguladores se observan a corto y a largo plazo, clasificados en las conocidas como respuesta primaria (PNR) y respuesta secundaria a nitrato. La respuesta primaria se desencadena extremadamente rápido, minutos después de la señal de nitrato, y se encarga de ajustar los sistemas de transporte (regulación de la expresión de genes transportadores de nitrato) y el metabolismo (regulación de la expresión de enzimas de asimilación) para la correcta absorción y asimilación del nitrato del medio. La respuesta secundaria acontece días después con la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, especialmente del sistema radicular que muestra una elevada plasticidad en respuesta a nitrato (Maghiaoui et al., 2020).

1.6.1. Familia RWP-RK

La familia de factores de transcripción *RWP-RK*, ha sido descrita por su función conservada de regulación de genes de respuesta a nitrógeno, en especies separadas en la evolución. Los primeros genes de la familia, denominados *NIT2*, fueron descubiertos en una especie de alga verde (*Chlamydomonas reinhardtii*). Más tarde fueron descritos en plantas superiores, en leguminosas, donde se agruparon en la familia *NLP* ('NODULE INCEPTION (NIN)-like protein') y resultaron imprescindibles para el desarrollo de los nódulos de fijación. En la actualidad se han descrito ortólogos de la familia *NLP* en especies de plantas no fijadoras de nitrógeno (p.ej. *A. thaliana*, arroz, trigo, maíz y *Brassica*) involucrados en la señalización por nitrato y promoción de su absorción (Maurya *et al.*, 2020).

1.6.1.1. Familia NLP

En *A.thaliana* la familia *NLP* comprende nueve miembros. Aunque, en cuanto a la señalización, solo se han caracterizado tres de ellos, *NLP6*, *NLP7* y *NLP8*, todos los factores de transcripción de la familia *NLP* son capaces de unirse a elementos reguladores tipo cis de respuesta a nitrato, evidencia que parece señalar la función común de señalización por nitrato (Maghiaoui *et al.*, 2020). Mas allá, un estudio fenotípico reciente de mutantes *nlp* sencillos y múltiples relacionó por primera vez otros miembros de la familia *NLP*, entre ellos *NLP9*, con la activación de genes de respuesta a nitrato y la promoción del crecimiento vegetativo dependiente de nitrato (Konishi *et al.*, 2021).

NLP6/7 son elementos principales en la respuesta primaria a nitrato, forman parte de la cascada de señalización del sensor *NRT1.1*. La señalización consiste en la activación postraduccional de la actividad de los factores de transcripción *NLP*. Hasta la fecha existen dos modelos que explican la señalización, diferenciados por la presencia del calcio como segundo mensajero. En ambos modelos la PNR es activada por la forma no fosforilada del sensor *NRT1.1*.

El primero consiste en un módulo *NRT1.1-CPK-NLP* en el que el sensor *NRT1.1* activado por nitrato induce el influjo de calcio al interior celular mediante la activación de una fosfolipasa C (*PLC*) y el aumento intracelular de la concentración de IP3 (1,4,5-inositol trifosfato), el cual induce la apertura de los canales de calcio. La acumulación de calcio intracelular activa un grupo de proteínas quinasas dependientes de calcio (*CPK*) que fosforilan y activan los factores de transcripción *NLP*. La fosforilación de los *NLPs* impulsa su retención nuclear y la activación de los genes de la PNR. Sin embargo, aún desconoce como el sensor *NRT1.1* induce el pico de calcio intracelular, la fosfolipasa C que media el proceso y su relación funcional con el sensor *NRT1.1* (Maghiaoui *et al.*, 2020).

El segundo modelo, propuesto en *O. sativa* consiste en un módulo *NRT1-SPX-NLP* mediante el cual la activación (retención nuclear) de los factores de transcripción *NLP* por el sensor *OsNRT1* activado por nitrato, ocurre mediante la degradación del represor de *OsNLP3*, *OsSPX4*. En presencia de nitrato, el sensor activado se une a *OsSPX4* y el complejo recluta una ubiquitina ligasa (*NBIP1*) que ubiquitina y promueve la degradación de *OsSPX4*, liberando a *OsNLP3* (Maghiaoui *et al.*, 2020).

Los modelos propuestos no son excluyentes, podrían co-existir (figura 1.5.). Los inositoles polifosfato podrían ser la conexión puesto que las proteínas *SPX* son sensores de estos y su percepción podría alterar la interacción *SPX-NLP*. Además, en *A.thaliana* se han descrito las proteínas *SPX*, lo que puede indicar que el modelo *NRT1-SPX-NLP* también estuviera activo en esta especie (Maghiaoui *et al.*, 2020).

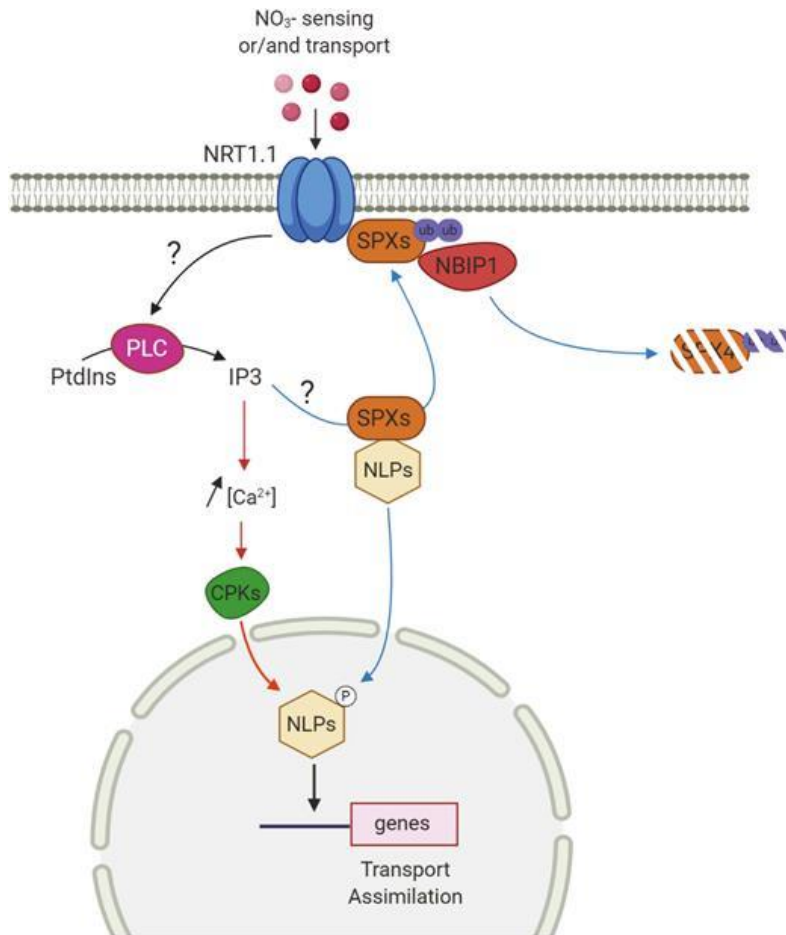


Figura 1.5. Modelo de señalización integrado por los módulos NRT1-CPK-NLP y NRT1-SPX-NLP, propuesto para la activación de la respuesta primaria a nitrato (PNR). NRT1.1: transcceptor de nitrato de afinidad dual, SPX: proteína represora del factor de transcripción NLP3, NBIP1: ubiquitina ligasa, PLC: fosfolipasa C, IP3: 1,4,5-inositol trifosfato, NLP: factor de transcripción de respuesta a nitrato, CPK: quinasa dependiente de calcio. Fuente: Maghiaoui et al. 2020. *Journal of Experimental Botany*.

Los genes diana de los factores de transcripción *NLP* son diversos, desde otros factores de transcripción de respuesta a nitrógeno, hasta genes relacionados con el control de la arquitectura de las raíces, la asimilación de nitrógeno y su absorción. Los *NLP* también regulan la expresión de los genes *NIGT*, factores de transcripción involucrados en la respuesta secundaria a nitrato, con efectos opuestos a los descritos en la respuesta primaria (PNR): represión de los transportadores de nitrato de alta afinidad *NRT2.1*, *NRT2.4* y *NRT2.5* y de otros genes de respuesta a nitrato, incluidos algunos de los activados por el sensor *NRT1.1*. Un ejemplo de la respuesta secundario a nitrato mediada por la cascada de señalización negativa *NLP-NIGT* es la fuerte activación inicial en presencia de nitrato del transportador *NRT2.1* y su represión a largo plazo, tras varias horas o días (Maghiaoui et al., 2020). La expresión de distintos miembros de la familia *NLP* se ha relacionado con la NUE en *Arabidopsis thaliana*, maíz y arroz (Ge et al., 2019b). Sin embargo, la obtención de cultivares con NUE superior mediante la ingeniería genética aplicada a los factores de transcripción *NLP* se limita en la actualidad a un cultivo, el arroz (Wu et al., 2020).

1.6.2. Familia bZIP

La familia de factores de transcripción *bZIP*, denominada así por la presencia de un dominio de dimerización tipo cremallera de leucina (*ZIP*) y un dominio básico de unión a DNA, se encuentra enormemente diversificada en eucariotas. En plantas, los factores de transcripción *bZIP* desempeñan diversas funciones relacionadas con la fisiología y el desarrollo. Se considera una de las principales familias de factores de transcripción reguladoras de los cambios en el desarrollo en respuesta a nitrato, refiriendo con ello a la modulación de la arquitectura de las raíces, al control de la homeostasis de nitrógeno y carbono y, más recientemente, a la señalización por nitrógeno.

1.6.3. Familia TGA

Recientemente, se ha descubierto en *A.thaliana*, que *TGA1* y *TGA4*, pertenecientes al grupo TGA de la familia *bZIP* por la presencia de un dominio TGACG de unión a DNA, participan, con roles redundantes, en la respuesta primaria a nitrato, en concreto en la regulación del desarrollo de las raíces laterales y el aumento de la densidad de los pelos radicales. Más allá, otro estudio en las raíces de *A. thaliana*, señala a *TGA1* como un regulador principal de la señalización por nitrógeno. En éste, se identificaron un total de 584 dianas de *TGA1*, 92 de las cuales eran factores de transcripción reguladores de genes relacionados con la absorción de nitrato, la asimilación de nitrógeno, y la traducción de proteínas. Un ejemplo es la inducción de *CAPPARICE (CPC)*, factor de transcripción que activa la diferenciación de los pelos radicales. Así la actividad de *TGA1* sería clave para la homeostasis de nitrógeno mediante el ajuste fino del metabolismo a la disponibilidad de nitrógeno externo mediante la inducción de múltiples cascadas de transcripción dependientes de nitrógeno (Maurya *et al.*, 2020).

Por otra parte, *HY5* y su homólogo *HYH* son reguladores de la fotomorfogénesis, esto es, la regulación del desarrollo de la planta y el crecimiento ejercida por la luz. Estos factores de transcripción se encuentran aguas abajo de fotorreceptores y modulan la transcripción de genes relacionados con la elongación y proliferación celular, el desarrollo de los cloroplastos, la acumulación de pigmentos y la asimilación y absorción de nitrógeno, azufre, cobre y carbono, mediante su unión a elementos de respuesta a la luz (LREs) en los promotores.

HYR y *HYH*, activados por la luz, intervienen en la señalización por nitrógeno. Por un lado, regulan positivamente la expresión de genes clave en la asimilación del nitrato, la nitrato reductasa (*NIA2*) y la nitrito reductasa (*NIR1*). Por el contrario, inhiben la expresión del transportador de nitrato (*NRT1.1*) y del transportador de amonio (*AMT1;2*). Además, como se ha comentado anteriormente, en la señalización sistémica de nitrógeno *HY5* regula, en respuesta a la luz y al aumento de fotoasimilados en el tallo, el balance del carbono asimilado en la fotosíntesis y la absorción de nitrato en las raíces, actuando como un elemento móvil en el floema que se produce en el tallo y se transloca a las raíces, donde promueve la absorción de nitrógeno mediante la inducción de su propio gen y del transportador de nitrato de alta afinidad *AtNRT2.1*. Además, en el tallo promueve la asimilación y traslocación de carbono (Gangappa *et al.*, 2016).

Sin embargo, aún se necesita más investigación para conocer los mecanismos de transducción de señal y el funcionamiento detallado de estos factores de transcripción para poder implementarlos en la obtención de cultivares con NUE superior.

1.6.4. Familia TCP

La familia de factores de transcripción TCP, exclusiva de plantas, se relaciona con el control del crecimiento vegetativo, función que parece estar conservada entre especies. Está compuesta por dos clases con funciones opuestas, la clase I se relaciona con la activación y la clase II con la represión. A lo largo de las fases del desarrollo de la planta *TCP20*, miembro de la clase I, se expresa en diferentes tejidos y regula la expresión de genes involucrados en la senescencia de las hojas, la división, expansión y diferenciación celular. Adicionalmente, *TCP20* es capaz de unirse a 100 genes de respuesta a nitrato, evidencia que sugiere su implicación en la señalización por nitrato. Experimentos tipo 'split-root' mostraron que *TCP20* funciona en la señalización sistémica y local que dirige la respuesta de 'búsqueda de nitrato', el crecimiento preferencial del sistema radicular hacia los medios ricos en nitrato, y la inhibición de la absorción en los medios pobres en nitrato. Para ello, *TCP20* interacciona en las raíces sometidas a deficiencia de nitrato, con el factor de transcripción *HBI1* y ambos promocionan la expresión de los péptidos *CEP* que al ser reconocidos por sus receptores en el tallo desencadenan la producción de *CEPDs*, señales móviles por el floema que se transportan a la raíz donde promueven la absorción de nitrato en los medios ricos en este, mediante la inducción del transportador *NRT2.1* (figura 1.6.) (Chu *et al.*, 2021).

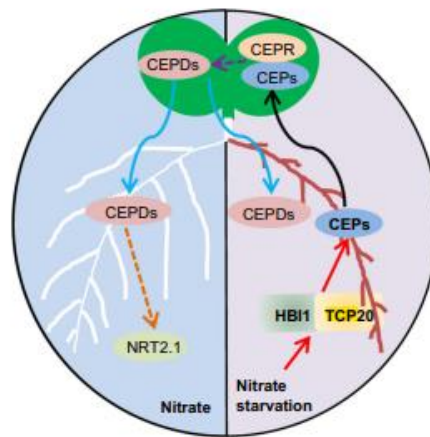


Figura 1.6. Señalización sistémica de nitrógeno ejercida por los péptidos CEPs e inducida por la interacción HBI1-TCP20. NRT2.1: transportador de nitrato de alta afinidad, CEPD: polipéptido móvil por el floema de señalización aguas debajo de CEP, CEPR: receptor de CEP ubicado en el sistema vascular de las hojas, CEP: hormona peptídica de alarma interna de insuficiencia de nitrógeno, HBI1 y TCP20: factores de transcripción. Fuente: Xiaoqian Chu *et al.*, 2021. *Journal of Integrative Plant Biology*.

Recientemente, se ha descrito el papel de *TCP20* en la respuesta primaria a nitrato. La interacción entre el regulador transcripcional *NLP6/7* y *TCP20* constituye un módulo regulatorio que ajusta la asimilación y señalización de nitrato al control del ciclo celular y el crecimiento de la raíz para contrarrestar el estrés causado por la deficiencia de nitrato. Así, en deficiencia de nitrato, los heterodímeros *NLP6/7-TCP20* se acumulan en el núcleo donde se unen al promotor de la nitrato reductasa (*NIA*) y del transportador *NRT1.1*, promoviendo su expresión. De forma simultánea, ejercen el control de la expresión del marcador de la mitosis *CYCB1;1*, necesario para la transición de la fase G2 a la M. En deficiencia de nitrógeno, los mutantes simples y dobles de *nlp6/7* y *TCP20* mostraron la desregulación de la expresión de *CYCB1;1* en la raíz, lo que a nivel fenotípico resultó en el fin prematuro del ciclo celular y la consecuente reducción del crecimiento de la raíz, el tamaño del meristemo apical de la raíz y el número de células de éste (Guan *et al.*, 2017).

Sin embargo, puesto que la relación de *TCP20* con la respuesta a nitrato era desconocida hasta hace pocos años, aún no se ha empleado este factor de transcripción como diana en la obtención de cultivares con mejor eficiencia de uso de nitrógeno, objetivo de alto interés dada la importancia del módulo *NLP6/7/TCP20* en la respuesta a nitrato (Maurya *et al.*, 2020).

1.7. Estudio de las bases genéticas de la eficiencia de uso de nitrógeno en especies de cultivo intensivo: clave para una agricultura sostenible

La mayoría del conocimiento sobre las bases moleculares y fisiológicas de los procesos determinantes de la eficiencia de uso de nitrógeno (NUE), como lo es su absorción, surge de la investigación en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y algunos cultivos como el arroz, el trigo, la colza y la patata. Para poder aplicar la biotecnología al diseño de cultivares con mejor NUE, cuyo cultivo permita aumentar la producción agrícola y satisfacer la creciente demanda de alimentos global en el marco de la agricultura sostenible, esto es, minimizando el uso de fertilizantes, es imprescindible expandir este conocimiento a las especies de cultivo intensivo como es el caso del tomate (*Solanum lycopersicum L.*). El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial. En el 2019 se produjeron más de 180 millones de toneladas para consumo fresco y procesado. Mas allá, se trata de un cultivo clave para la economía del mediterráneo, donde constituye la mayor área de cultivo en invernadero de Almería (10.331 ha; Anuario de Estadística Agraria 2018). Su popularidad en la alimentación mundial deriva de su rica composición nutricional, pues constituye una excelente fuente de licopeno, minerales como el potasio y el folato, betacarotenos, compuestos fenólicos, xantofilas y vitaminas como los tocoferoles (vitamina E) y la vitamina C.

Sin embargo, las características moleculares y fisiológicas de la NUE en tomate están poco estudiadas. Aunque se han identificado transportadores de nitrógeno homólogos a los descritos en *A. thaliana*, como *SIDUR3* y los pertenecientes a las familias *NRT1*, *NRT2*, y *AMT* (*LeNRT1.1*, *LeNRT1.2*, *LeNRT2.1*, *LeNRT2.2* y *LeAMT1*), solo algunos han sido caracterizados, apenas se han descrito los elementos de señalización aguas abajo y la regulación de su expresión a nivel local, y aún menos a nivel sistémico. Por ello, hasta ahora las diferencias de NUE observadas entre cultivares se han atribuido a diferencias morfológicas como el grosor o la longitud de la raíz y a la expresión diferencial de transportadores como *SINRT2.1/NAR2.1* y *SINRT2.3* (Renau-Morata *et al.*, 2021).

2. Objetivos

En un trabajo previo del Departamento de Producción Vegetal de la UPV se identificó la variación de la expresión de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4* en respuesta al nitrógeno en el cultivar de tomate comercial 'Moneymaker'. En el presente TFG se estudia la relación de la expresión de estos genes con la respuesta a la deficiencia de nitrógeno y el crecimiento vegetativo en tomate empleando cultivares con NUE contrastante. Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio de la variación entre cultivares de parámetros relacionados con el crecimiento vegetativo (biomasa, altura, contenido en clorofilas, rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII})) y de su respuesta a la deficiencia de nitrógeno.
2. Análisis de la variación de la expresión de los genes *NLP9* y *TGA4* en hojas entre genotipos y en respuesta a la limitación del aporte de nitrógeno.

3. Estudio de las correlaciones entre los parámetros de crecimiento y la expresión de los genes *TGA4* y *NLP9*.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención del material vegetal

3.1.1. Cultivares

Los cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) elegidos en este trabajo fueron el cultivar comercial 'Moneymaker' (MM), empleado como cultivar de referencia, y los cultivares tipo cuarenteno (CV70), cagón (CV32) y pequeño de colgar (CV82), procedentes del banco de germoplasma del COMAV. Todos ellos habían mostrado diferencias significativas en cuanto a la producción de fruto y a la NUE y sus diferentes componentes en condiciones de cultivo en invernadero de ciclo completo en tratamiento diferencial de nitrógeno (8 y 4 mM). Los datos, aún sin publicar, fueron obtenidos por el Departamento de Producción Vegetal de la UPV y la NUE se determinó según Weih et al., 2005 (figura 3.1.).

Resultados previos obtenidos por el grupo de investigación, han mostrado que la variedad tipo cuarenteno (CV70) y la variedad comercial (MM) se caracterizan por presentar los valores de producción y NUE más elevados en condiciones limitantes y suficientes en el aporte de nitrógeno. Asimismo, mostraron valores de reducción de NUE similares e intermedios, menores que los de la variedad CV32 y mayores que los de la variedad CV82.

Cabe destacar que la variedad CV70 presentó una producción de fruto mayor al resto de cultivares, incluido en cultivar comercial (MM), en ambas condiciones de aporte de nitrógeno.

La variedad tipo cagón (CV32) presentó la mayor reducción de la NUE de condiciones suficientes a limitantes del aporte de nitrógeno. Aunque en condiciones suficientes presentó una NUE elevada, equivalente al CV70, en condiciones limitantes presentó la NUE más reducida.

La variedad pequeño de colgar (CV82) se caracterizó por presentar el valor más bajo de NUE en aporte completo de nitrógeno. Sin embargo, presentó la menor reducción de NUE entre ambos niveles de fertilización de forma que, aunque en condiciones suficientes presenta una NUE notablemente inferior al resto de cultivares, en condiciones limitantes de aporte de nitrógeno presenta un valor de NUE muy próximo al cultivar CV32.

En cuanto a la producción, los cultivares CV32 y CV82, presentaron valores próximos, solo con una ligera superioridad del CV32 en ambas condiciones de cultivo, y notablemente reducidos respecto a los cultivares de mayor NUE y producción, MM y CV70.

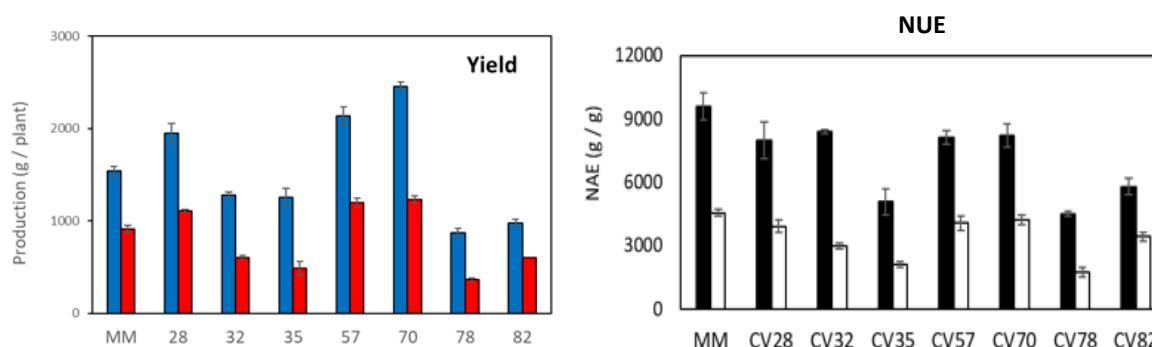


Figura 3.1. Producción (g de fruto/planta) y 'Nitrogen Use Efficiency' NUE (g N asimilado /g de N aportado) de las variedades MM, CV32, CV70 y CV82.

3.1.2 Condiciones de cultivo

Las semillas de los distintos cultivares previamente esterilizadas, se sembraron de forma individual y ordenada en los cuadrantes de semilleros con fibra de coco. Los semilleros se recubrieron de film y se guardaron en la cámara de cultivo en la que se mantuvo a 25/18 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (día/noche). Los semilleros se regaron con solución nutritiva completa (Hoagland y Arnon 1950) durante tres semanas. El film se retiró tras la germinación para aclimatar las plántulas. Al cabo de tres semanas las plántulas, de tres o cuatro hojas se trasplantaron a macetas de 1L con fibra de coco y se entutoraron. En la cámara de cultivo se dispusieron dos plántulas por maceta, diez por genotipo y tratamiento, un total de 100 plántulas.

A partir del día del trasplante a maceta se aplicaron dos niveles de fertilización nitrogenada, una solución de aporte completo de nitrógeno (7,5 mM, 100N) y otra solución de aporte limitante, en concreto con la mitad del aporte de nitrógeno que la anterior (3,75 mM, 50N). La solución nutritiva completa se formuló en base a la solución de Hoagland y Arnon (1950) y la de aporte limitante en base a la dilución de las fuentes de nitrógeno de la primera a la mitad y la adición de otras sales para compensar la reducción en nutrientes distintos al nitrógeno fruto de la dilución (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Composición de las soluciones nutritivas, la completa 100N (7,5 mM N, 100N) y la limitante (3,75 mM N, 50N).

Macronutrientes	Stock (M)	100N (mL/L solución)	50N (mL/L solución)
NH ₄ (H ₂ PO ₄)	1	0,5	0,25
KNO ₃	1	3	1,5
Ca(NO ₃) ₂	1	2	1
MgSO ₄	1	1	1
KH ₂ PO ₄	1	0	0,25
K ₂ SO ₄	0,5	0	1
KCl	1	0	0,25
CaCl ₂	1	0	1
Micronutrientes	Stock (M)	100N (mL/L solución)	50N (mL/L solución)
Fe	1	0,5	0,5
Micros	1	0,5	0,5

La fertilización consistió en el riego de cada planta con 100 mL de las soluciones nutritivas de una a dos veces por semana para garantizar la humedad permanente del sustrato y el aporte de nutrientes. El cultivo en cámara se prolongó durante tres semanas más, hasta registrar diferencias en el crecimiento entre tratamientos de las plantas del genotipo de referencia MM, momento en el que se procedió con el muestreo. Durante el cultivo en cámara se realizaron varias medidas de altura y parámetros fotosintéticos que permitieron hacer un seguimiento de estas diferencias y decidir el momento óptimo para el muestreo.

3.2. Determinación de parámetros fotosintéticos

En la última semana de fertilización diferencial, cuando ya se observaban diferencias en cuanto a crecimiento y verdor entre las plantas crecidas en los dos niveles de fertilización nitrogenada,

se realizaron medidas en cámara de cultivo de fluorescencia y contenido en clorofilas para estudiar la relación del estrés por nitrógeno con las diferencias observadas.

3.2.1. Determinación del contenido en clorofilas

La concentración de clorofila es un buen indicador del estado nutricional de la planta y de su disponibilidad de nitrógeno. Su determinación se realizó en los folíolos terminales de todas las hojas de todas las plantas. Para la determinación se utilizó el dispositivo SPAD-502 (Minolta) que mide la absorción de la muestra a 650nm y 940nm y con ello proporciona de forma rápida y no destructiva una medida relativa de la concentración de clorofila en la muestra.

3.2.2. Determinación de la fluorescencia de las clorofilas

La fluorescencia es un indicador del nivel de estrés de la planta. En condiciones de estrés el rendimiento del fotosistema 2 (PSII) se ve disminuido y aumentan los procesos no fotoquímicos encargados de disipar en forma de calor o reemitir en forma de fluorescencia el exceso de energía lumínica recibido por las moléculas de clorofila para evitar el daño a los fotosistemas. Con el objetivo de analizar el estrés causado por el aporte limitante de nitrógeno (50 N) se midió, en la primera hoja madura de cada planta (la tercera o cuarta desde el ápice), el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) con un medidor de fluorescencia de clorofilas MINIPAM (Walz, Alemania) y la eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII}) con un dispositivo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

El rendimiento cuántico máximo del PSII mide el rendimiento cuántico si todos los centros de reacción del PSII estuviesen abiertos. Consiste en el ratio entre la fluorescencia variable (F_v) o diferencia entre la fluorescencia máxima (F_m) y la fluorescencia mínima (F_o), y la fluorescencia máxima (F_m). La fluorescencia mínima (F_o) se midió tras un periodo de 15 minutos de adaptación de la hoja a la oscuridad mediante la exposición a una luz suave, no aprovechable para la fotosíntesis. En general, en condiciones de estrés se reduce el número de centros reactivos disponibles del PSII y aumenta la fluorescencia mínima. La fluorescencia máxima se midió tras exponer a la hoja a un flash intenso de luz de duración limitada, estímulo que produce la reducción progresiva de todos los centros reactivos disponibles y el aumento puntual, durante los primeros segundos de la exposición, del rendimiento de fluorescencia de las clorofilas. Este fenómeno, conocido como 'quenching' se debe al desvío respecto al PSII del flujo de electrones consecuencia de la activación por parte de la luz de la apertura de los estomas y de la actividad de los enzimas del metabolismo del carbono. En condiciones de estrés aumenta la fluorescencia mínima (F_o), se reduce con ello la fluorescencia variable (F_v) y en última instancia el ratio F_v/F_m , reflejo de la reducción del rendimiento cuántico máximo del PSII. Los valores óptimos se encuentran alrededor de 0.83 para la mayoría de las especies. Valores inferiores indican fenómenos de fotoinhibición en plantas sometidas a estrés (Maxwell K., Johnson G. N. 2000).

Por otro lado, la eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII}) mide la proporción de la luz absorbida por la clorofila del PSII destinada a los procesos fotoquímicos y aporta una medida estimada del flujo de transporte electrónico y la fotosíntesis total (Maxwell K., Johnson G. N. 2000). La medida se realizó en condiciones de estado estacionario y a 400 ppm CO₂ e intensidad de luz saturante (1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

3.3. Determinación de parámetros relacionados con el crecimiento vegetativo

Se realizaron dos medidas de altura de todas las plantas en cámara de cultivo, en la primera y segunda semana del tratamiento diferencial. El día del muestreo se realizó una medida de peso fresco de todas las plantas.

3.4. Análisis de expresión de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4*

La expresión génica de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4* se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los cebadores específicos empleados fueron diseñados *in silico* y evaluados respecto a la eficiencia y la concentración de uso. Como material de partida para ambos análisis se empleó cDNA que se obtuvo de la extracción del RNA y de la retrotranscripción del mismo.

La RT-qPCR se realizó en dos fases, en una primera reacción de retrotranscripción el RNA extraído se convirtió a DNA complementario (cDNA) que se empleó, en una segunda reacción, como molde para la PCR cuantitativa (qPCR). El cDNA obtenido tras la retrotranscripción se usó además para las pruebas de eficiencia y concentración de los cebadores diseñados. Tanto para la retrotranscripción como para la RT-qPCR se utilizó el kit 'PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)' y los protocolos de Takara.

3.4.1 Muestreo y triturado

De las diez plantas por genotipo y tratamiento se seleccionaron nueve y se muestrearon las hojas jóvenes de la siguiente manera: se obtuvo una hoja joven por planta y cada tres plantas se generó una réplica biológica. Las tres hojas por réplica biológica se guardaron en sobres de papel albal previamente rotulados con el genotipo, tratamiento y réplica. El material se trituró con nitrógeno líquido y se guardó en el congelador a -80°C.

3.4.2. Extracción de RNA

En primer lugar, se pesaron 300 mg de muestra de cada réplica para la extracción y se separó la cantidad pesada en eppendorfs de 2 mL nuevos y rotulados. La extracción de RNA se realizó siguiendo el protocolo del kit de extracción de RNA de plantas 'Total RNA Mini Kit' de IBI Scientific. Las extracciones se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor.

La concentración de RNA purificado y su pureza se cuantificó con Nanodrop (Agilent, EE. UU.). Las muestras que obtuvieron una concentración menor a 200 ng/μl o que obtuvieron unos ratios de absorbancia 260 nm/280 nm y/o 260 nm/230 nm inferiores a 2 o superiores a 2,2, se descartaron y volvieron a extraer.

3.4.3. Retrotranscripción (RT-PCR)

El protocolo de transcripción reversa seguido fue el recomendado para el análisis qPCR de Silver Green intercalante de Takara. El principio de la reacción es la síntesis de cDNA a partir del RNA de la muestra, usado como molde, mediante la amplificación asistida por el enzima retrotranscriptasa PrimeScript, los cebadores OligodT y hexámeros aleatorios de DNA.

Con el objetivo de obtener cDNA suficiente para las pruebas de concentración y eficiencia de los cebadores diseñados para la qPCR así como para la PCR cuantitativa (qPCR) de ambos factores

de transcripción se transcribió un total de 1,5 µg de RNA por muestra. La retrotranscripción se completó en el termociclador T100 (Biorad, España).

Tabla 3.2. Mix de reactivos para la transcripción reversa.

Por reacción	
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	1,5mL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0,75mL
Oligo dT Primer (50mM)	0,75mL
Random 6 mers (100mM)	0,75mL

Tabla 3.3. Temperaturas de incubación para la reacción de transcripción reversa

37°C	15 min	Transcripción reversa
85°C	5 sec	Inactivación de transcriptasa reversa
4°C		

3.4.4. Diseño *in silico* de cebadores específicos

Los cebadores específicos de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4* de *Solanum lycopersicum* L. para la PCR cuantitativa (qPCR) fueron diseñados con la interfaz Primer-BLAST del NCBI que combina el programa Primer3 con BLAST (Ye J et al., 2012). Entre las parejas de cebadores generadas por Primer-BLAST se seleccionaron aquellas situadas fuera de dominios conservados, lo cual se probó con la interfaz CD-Search de búsqueda de dominios proteicos conservados del NCBI y hacia el extremo 3' del gen, de especial importancia al haberse realizado la síntesis del cDNA con oligo dTs (Marchler-Bauer A et al., 2004). En cuanto al contenido en citosina y guanina, se seleccionaron las parejas de cebadores cuyo valor se encontraba entre el 50 y 60% de la secuencia, era similar entre ambos miembros de la pareja y prevalente en las últimas cinco bases del extremo 3', con el objetivo de incrementar la afinidad de unión de los cebadores al cDNA. En lo que respecta a la longitud y la temperatura de anillamiento de los cebadores se seleccionaron las parejas con longitudes más cercanas a 20 pares de bases y con temperaturas de anillamiento próximas entre los dos miembros de la pareja (diferencia menor a un grado) y al mismo tiempo más cercanas al valor óptimo de 62°C, respectivamente. En cuanto a la longitud de los amplicones se seleccionaron las parejas de cebadores que generaban amplicones de tamaño más reducido comprendido entre las 70 y 200 pares de bases. También se tuvo en cuenta en esta selección la complementariedad entre los cebadores de cada pareja y el grado de auto-complementariedad de cada cebador para evitar la hibridación entre los cebadores de la pareja y la formación horquillas. Las propiedades de complementariedad se evaluaron con el programa accesible en línea OligoCalc que permite obtener además información sobre otras propiedades físicas de las secuencias de DNA o RNA introducidas como la temperatura de anillamiento, el peso molecular o el coeficiente de absorbancia (Kibbe W. A. et al., 2007).

El paso final en el diseño de las parejas de cebadores consistió en comprobar si producían los amplicones esperados en la reacción de amplificación con el genoma del tomate mediante la herramienta accesible en línea PCR *in silico* de la red Sol Genomics, una base de datos dedicada a la información genómica de la familia de las Solanáceas (Fernandez-Pozo N et al., 2015).

3.4.4.1. Pruebas de concentración de uso y eficiencia de las parejas de cebadores diseñadas

Las parejas de cebadores diseñados, una por gen, fueron encargadas a Condalab (Madrid, España) Se realizaron, para cada pareja de cebadores, en primer lugar, una prueba de

concentración de uso, a 200 y a 300 nM, y en segundo lugar una prueba de eficiencia de amplificación. Para ambas pruebas se generó un mix de cDNA a 100 ng/μl a partir de 1 μl del cDNA de cada muestra.

La prueba de concentración consistió en una RT-qPCR en la que se probaron las dos concentraciones de estudio para cada pareja de cebadores con tres réplicas técnicas por pareja y concentración. La qPCR se realizó en una placa de qPCR de 96 pocillos de la que se usaron un total de 12 pocillos. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 μL, de los cuales 4 μL fueron cebadores y agua, 5 μL el mix SYBR Green y 1 μL el mix de cDNA. El mix SYBR Green contiene los dNTPs y la polimerasa necesarios para la amplificación y el fluoróforo SYBR para la detección. La reacción de amplificación se completó en una hora y cuarto en un termociclador CFX Connect Real-Time System (Biorad, España) según el protocolo de la qPCR de Silver Green intercalante de Takara (tabla 3.4.). Los resultados se evaluaron en función del número de ciclos umbral (C_t) obtenidos con cada concentración de uso, siendo este el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar la fase exponencial de la curva de amplificación. La concentración de 300 nM resultó ser la óptima para el análisis de expresión posterior. La concentración de 200 nM mostró C_t s demasiado elevadas en algunas de las réplicas, fruto de una escasa o inexistente amplificación.

Tabla 3.4. Protocolo de la RT-qPCR

1 ciclo	95°C	30 s	Desnaturalización inicial
40 ciclos	95°C	5 s	PCR
	60°C	30 s	
	Disociación		

En segundo lugar, se evaluó la eficiencia de amplificación de las parejas de cebadores diseñadas a la concentración de 300 nM. Para ello se prepararon cinco diluciones seriadas por un factor de dilución $\frac{1}{4}$ a partir del mix de cDNA a 100 ng/μl y se realizó otra RT-PCR con tres réplicas por concentración de cDNA. Se siguió el mismo protocolo y se utilizaron los mismos volúmenes para los reactivos que en la prueba anterior. Las rectas de eficiencia se obtuvieron con el programa BioRad y mostraron valores de eficiencia, pendiente y R^2 comprendidos en los valores de referencia.

3.4.5. RT-qPCR para el análisis de expresión de *NLP9* y *TGA4*

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) permite cuantificar la expresión génica en un estado fisiológico determinado de la muestra y seguir el transcurso de la señal de amplificación durante la reacción. El protocolo de Takara seguido en todo momento para el análisis RT-qPCR fue el protocolo 'SYBR Green intercalante'. En él se emplea el fluoróforo SYBR Green para la detección de los amplicones generados durante la reacción de amplificación dada su capacidad de interaccionar con la hendidura menor de las moléculas de DNA bicatenario y asociarse a ellas generando una señal proporcional al número de amplicones. La concentración de cDNA presente en la muestra se cuantificó en base a su relación de proporción inversa con el valor de número de ciclos de amplificación umbral (C_t).

La RT-qPCR para el análisis de expresión de los factores de transcripción *TGA4* y *NLP9* contó con el cDNA extraído de las veinticuatro muestras procedentes de las tres réplicas biológicas por

genotipo, con un total de cuatro genotipos (MM, CV32, CV70 y CV82), y por tratamiento, suficiente (100 N) o limitante (50 N) en el aporte de nitrógeno. Se realizaron dos réplicas técnicas por réplica biológica y se utilizaron un total de 48 pocillos de la placa. La reacción de amplificación se completó en un termociclador CFX Connect Real-Time System (Biorad, España) según el protocolo de la qPCR de Silver Green intercalante de Takara (tabla 3.4.).

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurión XVIII (Statgraphics).

Los datos registrados el último día de cada medida de los parámetros de crecimiento vegetativo (biomasa, altura de la planta, SPAD, Φ PSII y F_v/F_m) y los datos de expresión génica relativa de *TGA4* y *NLP9* se emplearon en un análisis de la varianza (ANOVA) para analizar las diferencias en las respuestas a la disminución en el aporte de nitrógeno de los cultivares de estudio.

Asimismo, se estudió la agrupación de las plantas respecto a los parámetros de estudio y la respuesta a nitrógeno mediante un análisis de componentes principales (PCA). Se trabajó con los ratios, en tanto por ciento, de los parámetros medidos en los dos niveles de fertilización nitrogenada ($\frac{50N}{100N}$ %).

Por último, con el objetivo final de estudiar la relación en la expresión de los factores de transcripción *TGA4* y *NLP9* con la eficiencia en uso del nitrógeno (NUE) se realizó un análisis de correlaciones entre los parámetros de crecimiento vegetativo y los valores de expresión.

4. Resultados

4.1. Variación entre cultivares en la respuesta a la disminución del aporte de nitrógeno para caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo

Para llevar a cabo el análisis de la variación entre cultivares en su respuesta a la disminución del aporte de nitrógeno, y posteriormente relacionarla con la variación en la expresión génica de los factores de transcripción de interés, se estudiaron los siguientes caracteres: Biomasa, altura de la planta, SPAD eficiencia efectiva (Φ PSII), y rendimiento cuántico máximo del fotosistema dos (F_v/F_m).

Todos los genotipos muestran una pronunciada reducción de la biomasa en condiciones de aporte limitante de nitrógeno (50 N). Asimismo, existen diferencias genotípicas, tanto en condiciones óptimas como limitantes, y no existe interacción entre genotipo y tratamiento. El cultivar MM es aquél que presenta una mayor biomasa en ambas condiciones de cultivo y el cultivar 70 tiene menor biomasa tanto en aporte completo como deficitario de nitrógeno (figura 4.1.).

Al analizar la altura de las plantas, observamos que si bien existe variación entre cultivares para ambos niveles de nitrógeno, se da un efecto de interacción. Es de destacar la diferente respuesta entre los genotipos al tratamiento. Así, la limitación en N no afecta a la altura de la planta en los cultivares MM y 70, pero tiene un efecto muy significativo en el cultivar 32, y algo menos pronunciado en el cultivar 82 (figura 4.2.).

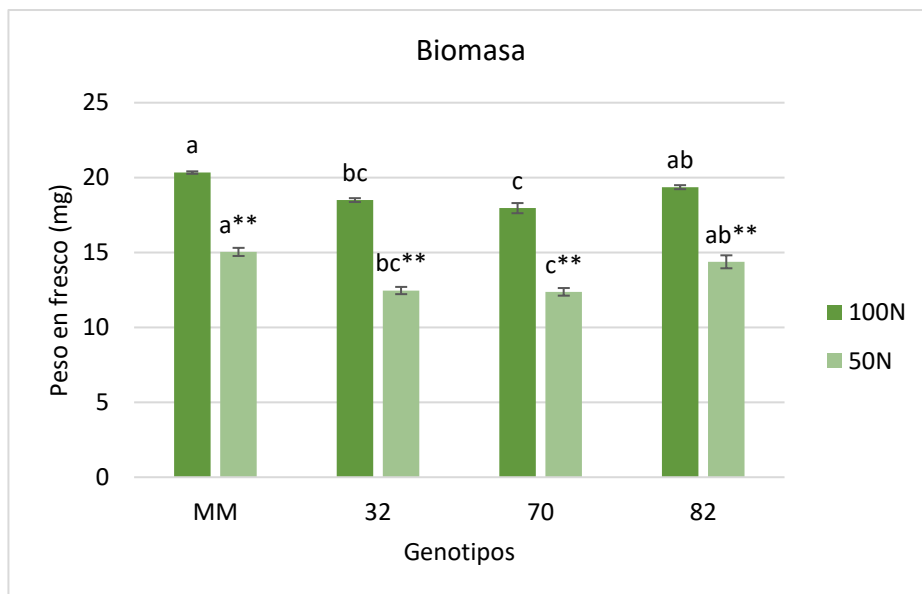


Figura 4.1. Peso fresco tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N). Las letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre tratamientos para cada genotipo. *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

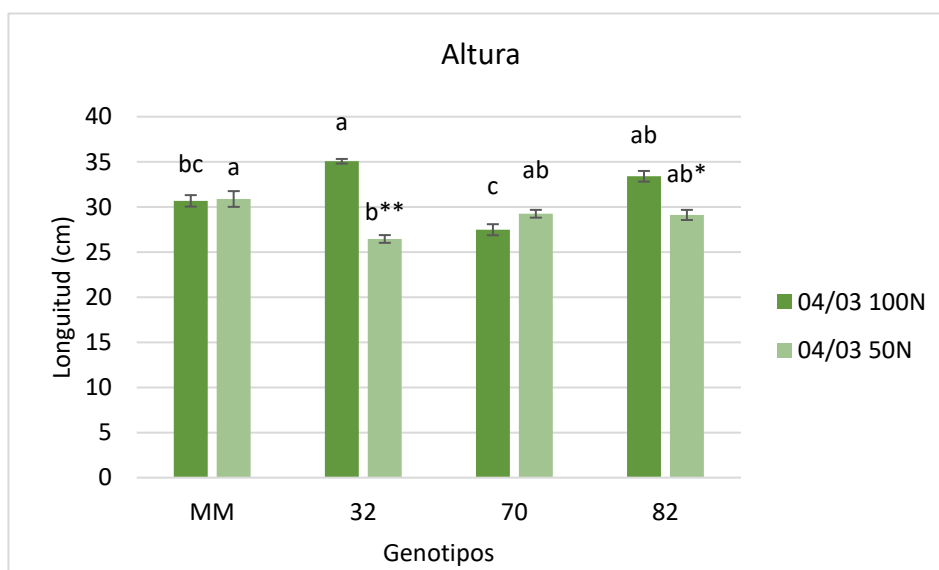


Figura 4.2. Altura tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N). Las letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre tratamientos para cada genotipo. *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

En cuanto a los parámetros fotosintéticos rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII}), sólo se aprecia variación genotípica cuando se reduce el aporte de nitrógeno. En estas condiciones, para ambos parámetros, el valor más elevado lo obtiene el cultivar MM. F_v/F_m es similar en el resto de los genotipos, mientras que Φ_{PSII} presenta un valor más bajo que el resto de genotipos, el del cultivar 32. Sólo los cultivares 82 y 70 muestran un descenso de F_v/F_m al disminuir el aporte de nitrógeno de 100 N a 50 N. La eficiencia efectiva del PSII sólo varía entre ambos tratamientos de fertilización, en el cultivar MM en el que, curiosamente, aumenta la tasa de transporte electrónico cuando el aporte de nitrógeno es comprometido (Figura 4.3.).

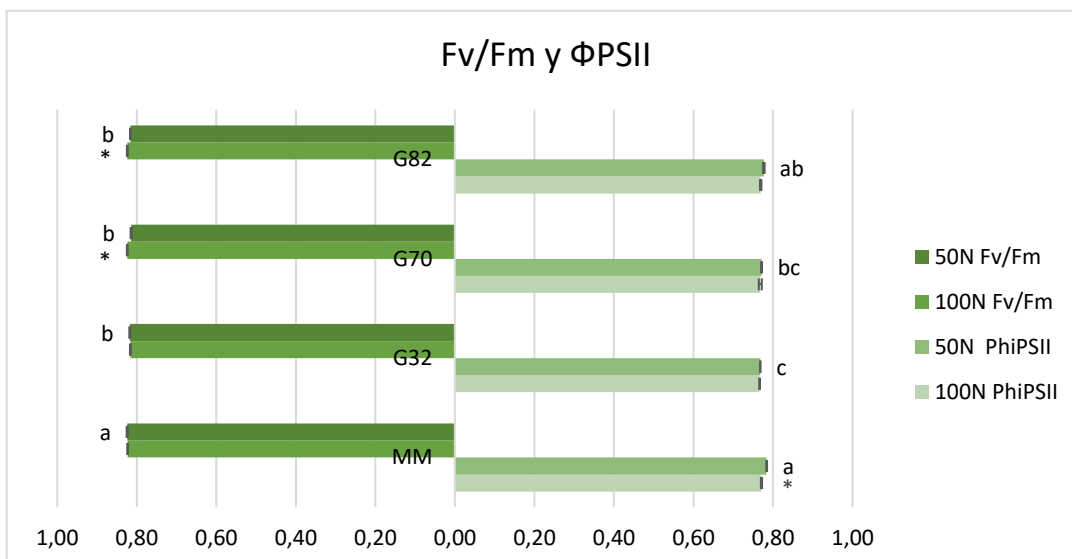


Figura 4.3. Rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII}) tras 20 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N). Las letras distintas indican las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre tratamientos para cada genotipo. *($P < 0.05$); **($P < 0.01$).

El contenido en clorofilas o SPAD se ve claramente disminuido cuando se reduce el aporte de nitrógeno en los cultivares 32 y MM, mientras que en los cultivares 82 y 70 no se observa respuesta significativa del SPAD al nitrógeno. En ambos niveles de fertilización, se observa variación genotípica, y se da un efecto de interacción genotipo y tratamiento. Cuando el aporte de nitrógeno es completo los cultivares MM y 32 muestran los valores más elevados de SPAD. En condiciones limitantes de N, el cultivar 82 presenta el valor máximo de SPAD (figura 4.4.).

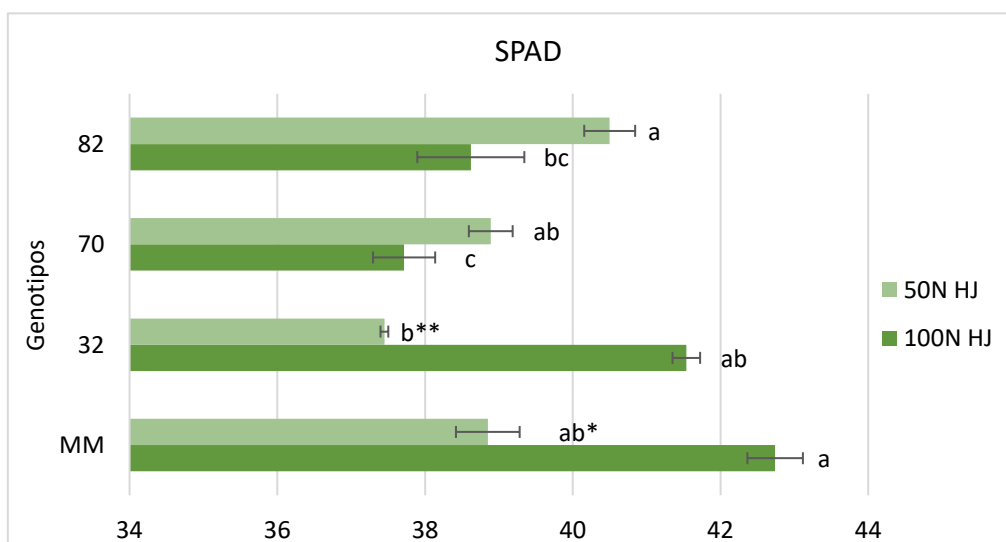


Figura 4.4. SPAD tras 20 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N). Las letras distintas indican las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre tratamientos para cada genotipo. *($P < 0.05$); **($P < 0.01$).

4.2. Variación entre cultivares en la expresión de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4* en respuesta a la disminución del aporte de nitrógeno

La expresión relativa de *NLP9* muestra diferencias entre cultivares en ambos niveles de nitrógeno y se observa un efecto de interacción entre el genotipo y el tratamiento. Destacan los cultivares MM y 70, con los valores mínimos y máximos de expresión en aporte completo de nitrógeno, respectivamente. En aporte limitante las diferencias entre genotipos se deben únicamente al valor inferior al resto de cultivares que muestra el cultivar 70. Asimismo, los diferentes cultivares presentan una respuesta dispar de la expresión de *NLP9* a la reducción del nitrógeno. Los cultivares MM y 70 son los únicos que muestran respuesta: en el cultivar MM se observa la inducción de la expresión y en el cultivar 70, por el contrario, una fuerte reducción de la expresión cuando se limita el aporte de nitrógeno (figura 4.5.).

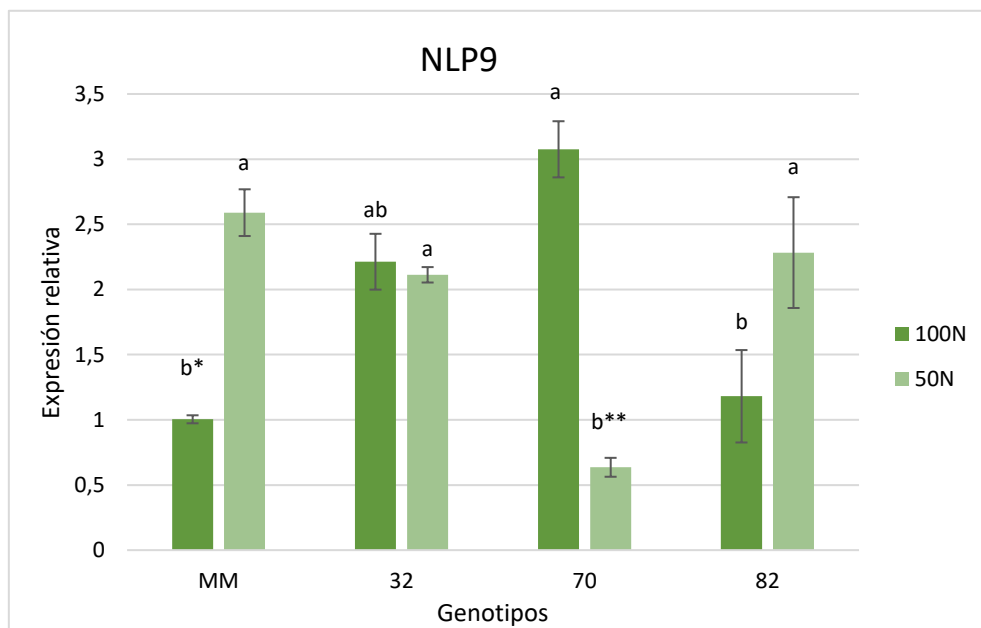


Figura 4.5. Expresión relativa de *NLP9* tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N). Las letras distintas indican las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre tratamientos para cada genotipo. *($P < 0.05$); **($P < 0.01$).

Los resultados de expresión de *TGA4* sólo presentan variación genotípica cuando el aporte de nitrógeno es completo. Los valores máximos de expresión los presenta el cultivar MM, mientras que el resto de cultivares muestran valores de expresión similares entre sí. De nuevo, son los cultivares MM y 70 los únicos que muestran variación en la expresión de *TGA4* entre las dos condiciones de cultivo, mostrando ambos la inducción de la expresión en aporte completo de nitrógeno, de mayor cuantía en el cultivar MM (figura 4.6.).

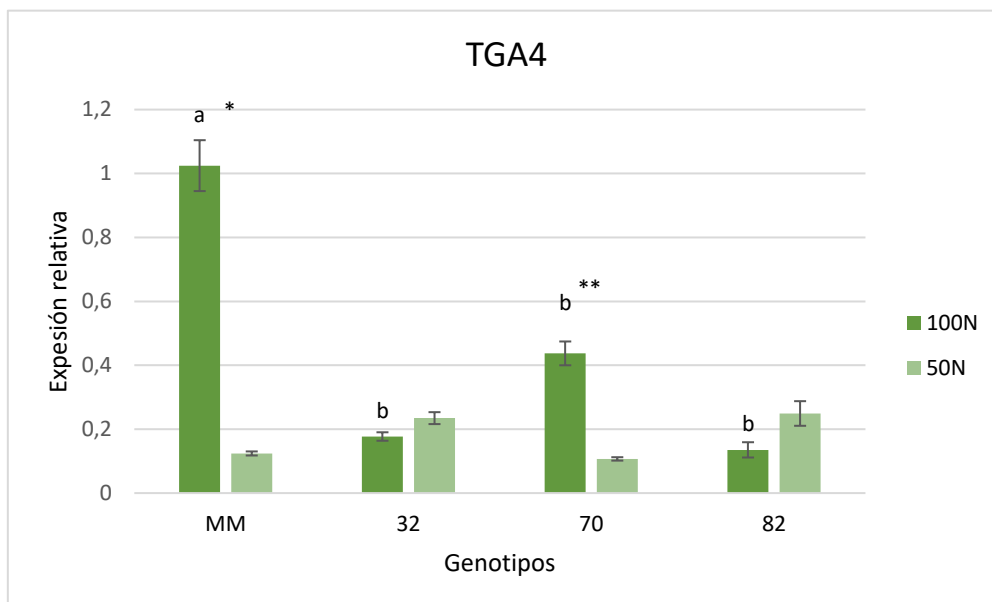


Figura 4.6. Expresión relativa de TGA4 tras 21 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte completo (7,5 mM, 100N) y aporte limitante (3,75 mM N, 50N). Las letras distintas indican las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre tratamientos para cada genotipo. *($P < 0.05$); **($P < 0.01$).

4.3. Análisis de componentes principales (PCA)

Con el objetivo de estudiar la agrupación de la respuesta a nitrógeno de las plantas en función del genotipo, en base a los siete caracteres estudiados (SPAD, altura, biomasa, rendimiento cuántico máximo y eficiencia efectiva del PSII, expresión relativa de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4*), se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los ratios ($\frac{50N}{100N}$ %). El análisis PCA permitió agrupar las réplicas de los genotipos en el espacio determinado por las componentes principales, siendo estas las direcciones en el espacio de las variables definidas por las combinaciones lineales de las siete variables capaces de explicar la mayor variabilidad de los datos.

Las tres primeras componentes principales permitieron explicar el 80,7% de la variabilidad total de los datos. La composición de las componentes viene determinada por los valores de los pesos de las variables mostrados en los diagramas de pesos de las componentes (figura 4.7.; figura 4.8.).

La primera componente, que explica por sí sola el 38,63% de la varianza total, presenta una correlación elevada y positiva con los ratios de eficiencia efectiva del PSII (Φ_{PSII}) y de biomasa (figura 4.7.).

En la segunda componente, que explica el 25,07% de la varianza total, tienen un peso elevado los ratios de rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y de altura, con los que se correlaciona de forma positiva. Asimismo, existe una correlación elevada pero negativa para la variación de la expresión relativa de *TGA4* (figura 4.7.).

En la tercera componente, que explica el 17,02% de la varianza total, tienen mucho peso las variables expresión relativa de *NLP9* y *SPAD* con cuyos ratios mantiene una correlación positiva y negativa, respectivamente (figura 4.8.).

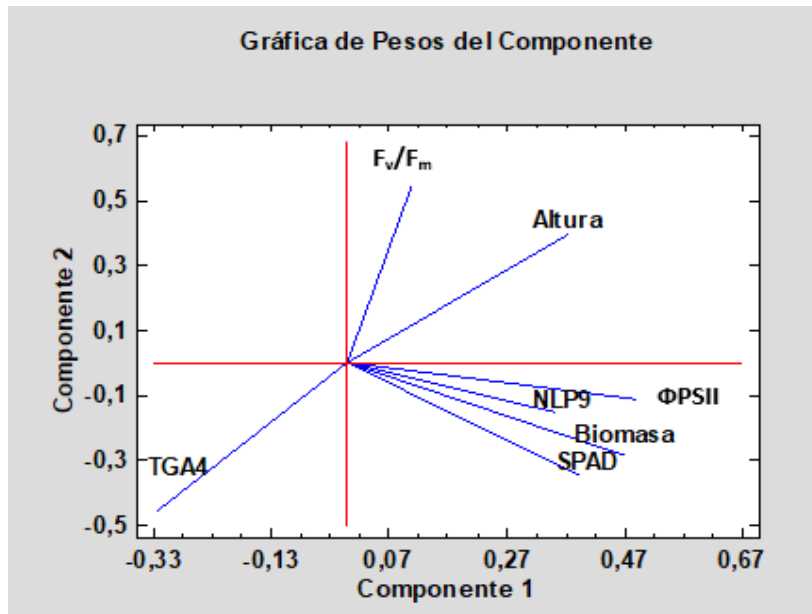


Figura 4.7. Diagrama de pesos de las componentes 1 y 2.

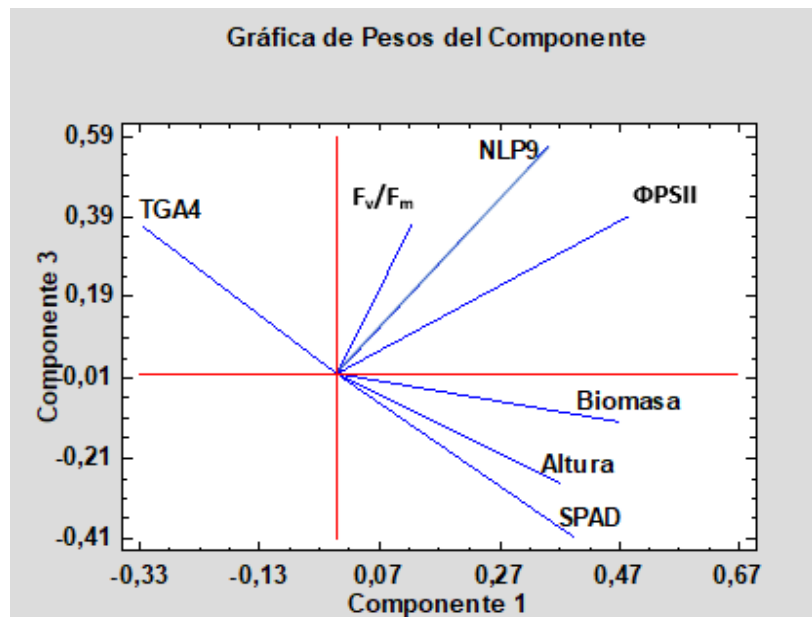


Figura 4.8. Diagrama de pesos de las componentes 1 y 3.

La agrupación de los genotipos en torno a las componentes principales se muestra en los diagramas de dispersión (figura 4.9.; figura 4.10.). Los resultados indican una agrupación de la respuesta de las plantas en función del genotipo. Teniendo en cuenta las correlaciones de las variables con las distintas componentes, así como los diagramas de dispersión, podemos observar las siguientes diferencias.

El cultivar MM, se encuentra entre los que presentan una menor reducción de la biomasa y de la eficiencia efectiva del PSII, en aporte limitante de nitrógeno, junto con el cultivar 82. Además, presenta una menor disminución de la altura, del rendimiento cuántico máximo y de la expresión relativa de *NLP9*. Sin embargo, presenta una importante reducción de la expresión relativa de *TGA4* y del SPAD.

El cultivar 82 se agrupa entorno a las dos primeras componentes. Los resultados muestran una baja reducción en biomasa y eficiencia efectiva del PSII, la menor reducción de la expresión de *TGA4* así como la mayor reducción de rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y la altura.

El cultivar 32 no se agrupa entorno a la segunda componente. La agrupación entorno a las componentes primera y tercera muestra que el cultivar 32 es aquél con una mayor reducción de la biomasa, de la eficiencia efectiva del PSII (Φ PSII) y de la altura. También muestra la mayor reducción del SPAD junto con el cultivar MM. La expresión de ambos factores de transcripción no se ve afectada por la reducción en el aporte de nitrógeno.

El cultivar 70 muestra una gran variación en relación con la primera y la segunda componente. Las réplicas únicamente se agrupan alrededor de la tercera componente. Los resultados indican una menor reducción del SPAD respecto a los cultivares 32 y MM y de forma opuesta, una mayor disminución de la expresión de *NLP9* al disminuir el aporte de nitrógeno respecto a los mismos cultivares.

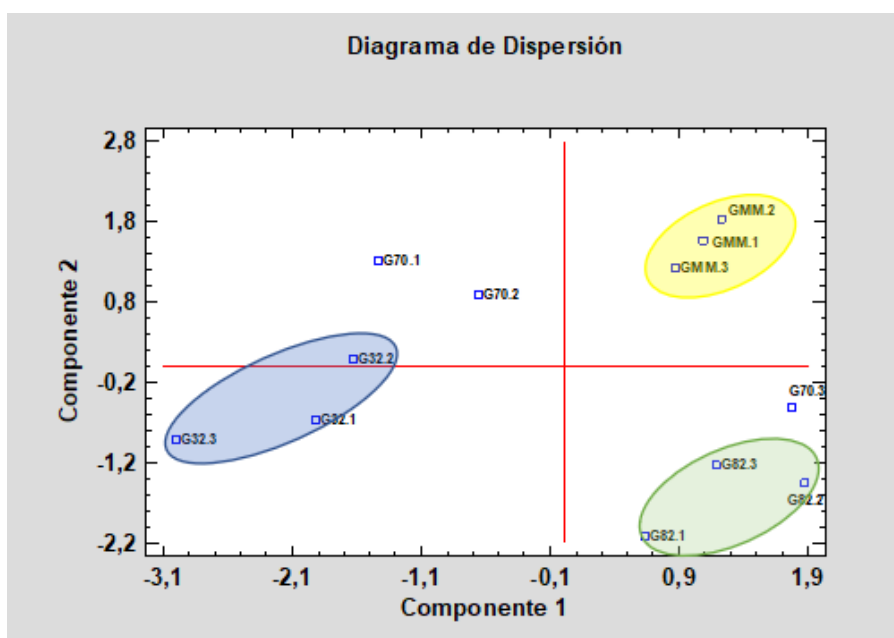


Figura 4.9. Diagrama de dispersión de las réplicas de los genotipos en función de las componentes 1 y 2.

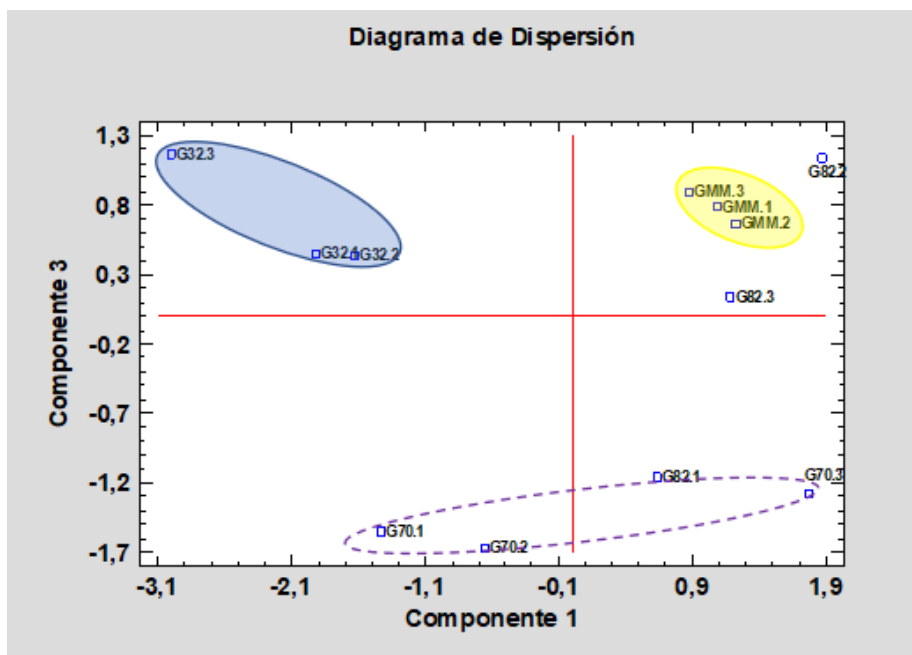


Figura 4.10. Diagrama de dispersión de las réplicas de los genotipos en función de las componentes 1 y 3.

4.4. Correlaciones entre la expresión de *NLP9* y *TGA4* y los parámetros fotosintéticos y de crecimiento vegetativo

Con el objetivo de relacionar los cambios en la expresión de *NLP9* y *TGA4* con alguna de las variables medidas se obtuvieron las correlaciones momento producto de Pearson o coeficientes de correlación R, entre los datos de expresión de los genes y los parámetros de crecimiento vegetativo medidos en los dos niveles de fertilización nitrogenada. Este tipo de correlación mide la fuerza de la relación lineal entre las variables, con un rango de -1 a +1, dependiendo si la relación entre las variables es positiva o negativa. Las correlaciones se obtuvieron con los datos que mostraron variabilidad en la expresión de los factores de transcripción de interés: los datos del cultivo de los diferentes genotipos en aporte completo de nitrógeno y los datos de los genotipos MM y CV70 en ambos niveles de fertilización nitrogenada.

El estudio de correlaciones entre la expresión de los genes de interés y los parámetros de crecimiento vegetativo estudiados nos revela que la disminución en la expresión de *TGA4*, que se presenta en los cultivares 70 y MM, debida fundamentalmente a la variación en el contenido en nitrógeno, está correlacionada principalmente con la reducción de la biomasa (figura 4.11.).

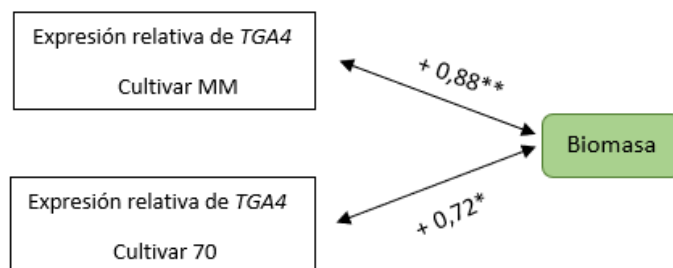


Figura 4.11. Correlaciones de los datos de expresión relativa de *TGA4* y la biomasa de los cultivares MM y 70 en 50 N y 100 N. Se muestra el valor del coeficiente de correlación R entre las variables relacionadas por las flechas. Los asteriscos indican la significancia estadística de la correlación. $^*(P<0.05)$; $^{**}(P<0.01)$.

La correlación de la expresión de *NLP9* con la disminución de la biomasa presenta resultados distintos en función del genotipo. Así, en el cultivar MM su expresión se correlaciona de forma negativa con la biomasa. Esta correlación se conserva a nivel de genotipo en el medio de aporte completo de nitrógeno. Sin embargo, en el genotipo 70 esta correlación es positiva.

Por último, en el cultivar MM el aumento de la expresión de *NLP9* se correlaciona de forma aislada con la reducción del SPAD en aporte completo de nitrógeno (figura 4.12.).

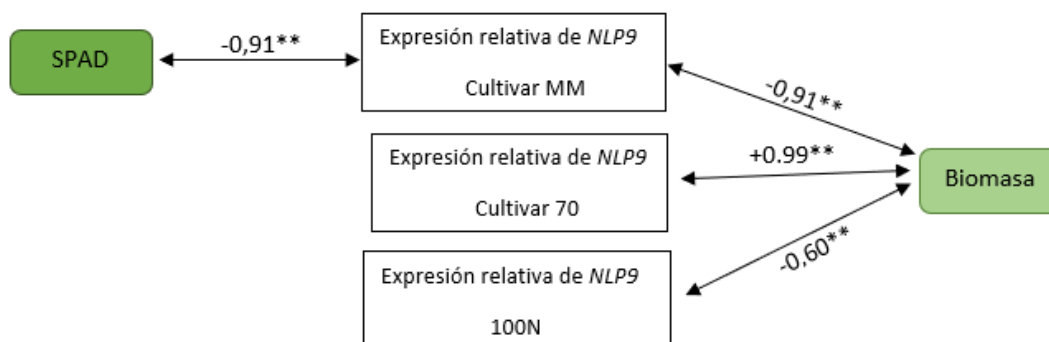


Figura 4.12. Correlaciones de los datos de expresión relativa de *NLP9* y los parámetros de crecimiento vegetativo. Se muestra el valor del coeficiente de correlación *R* entre las variables relacionadas por las flechas. Los asteriscos indican la significancia estadística de la correlación. *($P < 0.05$); **($P < 0.01$).

5. Discusión

La crisis climática actual pone el foco en la transición hacia una agricultura sostenible. La mejora de la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) de las especies de cultivo intensivo, como el tomate, permitiría reducir la contaminación por la fertilización nitrogenada sin que ello conlleve afectar al rendimiento de los cultivos, y su capacidad para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos. Es de interés ahondar en el conocimiento de las bases moleculares de la NUE en tomate, sobre el cual pueda aplicarse la mejora vegetal a la obtención de cultivares con NUE superior. Con este objetivo, el presente trabajo estudia la posible relación de los factores de transcripción *TGA4* y *NLP9*, descritos en *Arabidopsis thaliana* por su papel principal en la respuesta primaria a nitrato, con la NUE en tomate.

Para ello, se analizó la respuesta en el crecimiento vegetativo y en la expresión de los factores de transcripción de interés a la reducción en el aporte de nitrógeno en cuatro cultivares diferenciados por la NUE y la producción. El planteamiento experimental permitió caracterizar la respuesta a nitrógeno de los cultivares de estudio y relacionar la expresión de los genes *TGA4* y *NLP9* con la respuesta de los parámetros de crecimiento vegetativo.

5.1. Respuesta a la disminución en el aporte de nitrógeno de los cultivares MM, CV32, CV70 y CV82 de tomate y su relación con la NUE

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes cuantitativamente para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. La deficiencia de nitrógeno compromete el crecimiento vegetativo y la productividad de los cultivos por la disminución de la fotosíntesis y el nivel de fotoasimilados, principal constituyente de la biomasa de los cultivos (Mu et al., 2021). Los resultados de los

parámetros de crecimiento vegetativo obtenidos para los cuatro cultivares de estudio confirman los efectos esperados de la deficiencia de nitrógeno, siendo estos además distintos entre cultivares. El cultivar comercial MM, aquel con NUE más elevada, produjo más biomasa que el resto de cultivares en ambos niveles de fertilización. Asimismo, el cultivar MM junto con el 70, el segundo de mayor NUE, no vieron afectada la altura de las plantas al reducir el aporte de nitrógeno, mientras que los cultivares 32 y 82, de NUE inferior, mostraron una reducción significativa de la altura. Sin embargo, a pesar de su elevada NUE, el cultivar 70 obtuvo los menores valores de biomasa, y el cultivar 82 fue el segundo que más biomasa produjo, y que menos vio reducida su biomasa al limitar el aporte de nitrógeno. De estos datos se concluye que no existe correlación entre el mayor crecimiento vegetativo y la mayor NUE basada en producción. No existen trabajos que describan esta relación en tomate.

Dado que en las plantas C3 como el tomate, alrededor del 60-80% del nitrógeno de la hoja se invierte en el aparato fotosintético, la deficiencia de nitrógeno tiene un efecto directo en la reducción del contenido en clorofilas y de la tasa fotosintética (Kumar et al., 2002). Destaca el cultivar 82, que, a diferencia de los cultivares MM y 32, no vio disminuido el valor de SPAD en aporte limitante de nitrógeno y obtuvo el valor más elevado en esta condición. Se ha demostrado que la limitación del aporte de nitrógeno provoca, en plantas C3, la reducción del rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y la eficiencia efectiva del fotosistema dos (Φ_{PSII}), principalmente por la pérdida de las clorofilas y de la actividad de la Rubisco. Sin embargo, esta relación es muy sensible a efectos ambientales, como cambios en la temperatura o en la radiación que pueden aumentar la tasa fotosintética (Correia et al., 2005).

Los resultados de los parámetros fotosintéticos sugieren la existencia de otros factores que afectaran al funcionamiento del PSII diferentes de la reducción de las clorofilas, puesto que los cultivares 70 y 82 que vieron reducidos sus valores de F_v/F_m no mostraron la reducción en el contenido en clorofilas. Es más, el cultivar MM vio aumentada la tasa de transporte electrónico (Φ_{PSII}) en aporte limitante de nitrógeno, cuando el contenido en clorofilas se redujo aproximadamente un 10% en esta condición. En este caso, la ligera reducción de las clorofilas podría haber posibilitado una absorción de luz más equilibrada en los fotosistemas al reducir el tamaño de la antena colectora, aumentando con ello la eficiencia fotosintética (Φ_{PSII}). Una limitación principal de la eficiencia fotosintética es la saturación que provoca la luz solar de las antenas colectoras, que absorben más fotones de los que puede emplear el sistema fotosintético en la fijación del carbono. Una hoja de una planta C3 se satura con aproximadamente un cuarto del total de luz solar recibida, y la energía en exceso es disipada, para evitar el daño foto-oxidativo, mediante diversos mecanismos, principalmente mediante el desarrollo de sistemas de foto-protección, que terminan por reducir la eficiencia fotosintética (Gu et al., 2017).

Se aprecia además como la tasa de transporte electrónico (Φ_{PSII}), podría ser un marcador de la biomasa de los cultivares. Los cultivares MM y 82, aquellos que menos vieron reducido la efectiva del fotosistema dos (Φ_{PSII}) al reducir el aporte de nitrógeno y que obtuvieron los valores más altos en esta condición, mostraron menor reducción de la biomasa y fueron los que más biomasa produjeron en ambos niveles de nitrógeno.

En definitiva, los cultivares MM y 82 fueron los que mejor consiguieron mantener el crecimiento vegetativo, mientras que el cultivar 32 fue el más afectado cuando se comprometió el aporte de nitrógeno. Los resultados no se relacionan con los valores de NUE registrados para estos cultivares, puesto que el cultivar 82, de baja NUE, mostró mejor respuesta a la deficiencia de nitrógeno que el cultivar 70, de alta NUE.

5.2. Correlaciones de la expresión de los factores de transcripción *NLP9* y *TGA4* con los parámetros de crecimiento vegetativo

La variación de la expresión de los genes *NLP9* y *TGA4* en respuesta a la reducción del aporte de nitrógeno se da únicamente en los cultivares de mayor NUE, MM y 70, hecho que pudiera indicar el papel de estos genes en la respuesta a nitrógeno y la NUE en tomate.

5.2.1. Expresión diferencial de *NLP9* en el cultivar MM y su relación con la biomasa y el SPAD

Los factores de transcripción *NLP*, altamente conservados en las especies vegetales, participan en la señalización por nitrato y en la regulación de la expresión de genes de respuesta a nitrato relacionados con su absorción y asimilación. Aunque el conocimiento de esta familia génica en tomate aún es escaso, se han identificado seis miembros de la familia *NLP* diferenciados por el tejido en el que se expresan y por la variación de su expresión en respuesta a nitrato. En concreto *NLP9* mostró su inducción en hoja en aporte limitante de nitrógeno (Liu et al., 2021; Renau-Morata et al., 2021). Respecto a su función en tomate sólo se conoce que este factor de transcripción interacciona con el promotor de la enzima nitrato reductasa *SINR*, involucrada en la asimilación del nitrógeno y que no influye en el crecimiento vegetativo (Konishi et al., 2021). El análisis del mutante simple de *NLP9* en *Arabidopsis thaliana* no mostró reducción del crecimiento vegetativo, en comparación con el genotipo salvaje, en deficiencia de nitrógeno (Konishi et al., 2021).

El análisis de expresión de *NLP9* del presente trabajo confirmó su inducción en el cultivar MM en aporte limitante de nitrógeno. Estos resultados podrían indicar un funcionamiento distinto de este factor de transcripción al descrito en *Arabidopsis thaliana*, pues mientras que en la especie modelo la actividad *NLP9*, comprendida en la respuesta primaria a nitrato, es activada por la señal de nitrato a nivel postraduccional (Maurya, J et al., 2020), en tomate se observa una regulación a nivel transcripcional y en respuesta a la deficiencia de nitrato. El mismo patrón de expresión se observa para algunos miembros de la familia *NLP* en arroz (Jagadhesan et al., 2020).

Los resultados de expresión de *NLP9* del cultivar 70, muestran una respuesta opuesta a la anteriormente descrita en la misma especie, aunque toda la evidencia existente muestra la inducción de este gen en tomate en aporte de nitrógeno limitante. Sería necesario un trabajo adicional para comprobar estos resultados.

En el cultivar MM la expresión de *NLP9* se correlacionó de forma negativa con la biomasa, correlación que se mantuvo al estudiar la variación entre genotipos en aporte suficiente de nitrógeno. Aquellos con mayor expresión de *NLP9* mostraron los menores valores de biomasa. Dado que la pérdida de función de *NLP9* no se relacionó con la variación del crecimiento vegetativo en el análisis de mutantes (Konishi et al., 2021) y que la reducción en el aporte de nitrógeno se relaciona con la disminución de la biomasa en todos los cultivares, incluidos aquellos en los que no varía la expresión de *NLP9*, podemos concluir que *NLP9* no está directamente relacionado con el crecimiento vegetativo en tomate.

Por otro lado, la expresión de *NLP9* en el cultivar MM se correlacionó de forma negativa con el contenido en clorofilas. Esto podría relacionarse con la activación de una respuesta de movilización del nitrógeno interno por parte de *NLP9* mediante la activación de alguna enzima relacionada con la degradación de las clorofilas. La degradación de los compuestos nitrogenados de la planta, especialmente los relacionados con la fotosíntesis como las clorofilas y la Rubisco, es un mecanismo de obtención y reutilización de nitrógeno común en plantas ante un estado de deficiencia de este (Machado et al., 2022).

5.2.2. Expresión diferencial de *TGA4* en los cultivares MM y 70 y su relación con la biomasa

En *A. thaliana*, *TGA4* media la respuesta primaria a nitrato. En respuesta al nitrato del medio, se induce a nivel transcripcional y regula la expresión de los transportadores de nitrato de alta afinidad *NRT2.1* y *NRT2.2*, y la activación de la diferenciación de los pelos radiculares y el aumento de la densidad radicular (Álvarez et al., 2014). La expresión de este factor de transcripción en otras especies, incluido tomate, aún no ha sido descrita.

Según los resultados de los cultivares MM y 70 de tomate, la expresión de *TGA4* se induce en respuesta a nitrato, y esta correlacionada con el aumento de la biomasa de estos cultivares, relación que podría deberse al aumento de la densidad radicular o bien a una mayor absorción o asimilación de nitrógeno en condiciones de aporte suficiente. Cabe destacar que la mayor inducción se produce en el cultivar MM, cultivar de mayor NUE y crecimiento vegetativo.

Sería de interés medir la biomasa radicular y la expresión de los transportadores *NRT2.1* y *NRT2.2* en los cultivares MM y 70 en aporte completo y limitante de nitrógeno, para determinar su correlación con la expresión de *TGA4*. Con el mismo fin podrían obtenerse mutantes de *TGA4* y analizar el efecto sobre los parámetros mencionados. La correlación positiva de la expresión de *TGA4* con alguno de estos parámetros podría indicar una función similar a la descrita para este factor de transcripción en *A. thaliana* y su relación directa con la NUE en tomate. En tal caso, el gen *TGA4* podría emplearse en mejora vegetal como un gen marcador para la selección de genotipos con NUE superior.

6. Conclusiones

El estudio ha mostrado la variabilidad en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno entre los cuatro cultivares de NUE contrastante del trabajo. Los cultivares MM y 82 fueron aquellos que menos redujeron su crecimiento vegetativo en deficiencia de nitrógeno. El cultivar 32 fue el cultivar que se vio más afectado por la bajada de nitrógeno.

No se ha observado una correlación entre el desarrollo vegetativo y la NUE a nivel de producción.

Existe variación en la expresión de los genes *TGA4* y *NLP9* entre cultivares y en respuesta al nitrógeno.

No se ha observado una relación entre la expresión de gen *NLP9* con el crecimiento vegetativo o la NUE de las plantas.

El gen *TGA4* mostró una mayor expresión en respuesta a nitrógeno en los cultivares MM y 70, que presentan una mayor NUE y producción. En estos cultivares, la inducción de *TGA4* se relacionó a nivel ambiental con el aumento de la biomasa. Este gen podría estar relacionado con la NUE en tomate, y por lo tanto ser de interés como marcador aplicado a la mejora genética vegetal para futuros trabajos.

7. Bibliografía

- AMEL MAGHIAOUI, ALAIN GOJON, LIÊN BACH, NRT1.1-centered nitrate signaling in plants, *Journal of Experimental Botany*, Volume 71, Issue 20, 22 October 2020, Pages 6226–6237, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa361>
- BOUWMAN, L., GOLDEWIJK, K. K., VAN DER HOEK, K. W., BEUSEN, A. H. W., VAN VUUREN, D. P., WILLEMS, J., RUFINO, M. C., & STEHFEST, E. (2013). Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900-2050 period. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(52), 20882–20887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012878108>
- CHU, X., LI, M., ZHANG, S., FAN, M., HAN, C., XIANG, F., LI, G., WANG, Y., XIANG, C.B., WANG, J.G., AND BAI, M.Y. (2021). HBI1-TCP20 interaction positively regulates the CEPs-mediated systemic nitrate acquisition. *J. Integr. Plant Biol.* 63: 902–912.
- CLAUS-PETER WITTE, Urea metabolism in plants, *Plant Science*, Volume 180, Issue 3, 2011, Pages 431-438, ISSN 0168-9452, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>
- CORREIRA CM, MOUTHINO-PEREIRA JM, COUTINHO FJ, BJÖRN LO, TORRES-PEREIRA JMG. (2005) Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study. *Eur J Agronomy*. 2005;22:337-347.
- DARREN PLETT, TREVOR GARNETT, MAMORU OKAMOTO, Chapter 6 - Molecular genetics to discover and improve nitrogen use efficiency in crop plants, Editor(s): Mohammad Anwar Hossain, Takehiro Kamiya, David J. Burritt, Lam-Son Phan Tran, Toru Fujiwara, *Plant Macronutrient Use Efficiency*, Academic Press, 2017, Pages 93-122, ISBN 9780128113080. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811308-0.00006-5>
- FERNANDEZ-POZO N, MENDA N, EDWARDS JD, SAHA S, TECLÉ IY, STRICKLER SR, BOMBARELY A, FISHER-YORK T, PUJAR A, FOERSTER H, YAN A, MUELLER LA. The Sol Genomics Network (SGN) from genotype to phenotype to breeding. (2015) *Nucleic Acids Res.* Volume 43 (Database issue):D1036-41. PubMed
- GANGAPPA, S. N., & BOTTO, J. F. (2016). The multifaceted roles of HY5 in plant growth and development. *Molecular plant*, 9(10), 1353-1365.
- GE, M., WANG, Y., LIU, Y., JIANG, L., HE, B., NING, L., DU, H., LV, Y., ZHOU, L., LIN, F., ZHANG, T., LIANG, S., LU, H., ZHAO, H., 2019B. The NIN-like protein 5 (*ZmNLP5*) transcription factor is involved in modulating the nitrogen response in maize. *Plant J.* 5, 1–16. <https://doi.org/10.1111/tpj.14628>
- GUAN, P., RIPOLL, J. J., WANG, R., VUONG, L., BAILEY-STEINITZ, L. J., YE, D., & CRAWFORD, N. M. (2017). Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2419-2424.
- HAO, D.-L.; ZHOU, J.-Y.; YANG, S.-Y.; QI, W.; YANG, K.-J.; SU, Y.-H. Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 3557. <https://doi.org/10.3390/ijms21103557>
- J.G., Z.Z., Z.L., Y.C., Z.W., & H.Z. (2017). Rice (*Oryza sativa* L.) with reduced chlorophyll content exhibit higher photosynthetic rate and efficiency, improved canopy light distribution, and greater yields than normally pigmented plants. *Field Crops Research*, 200(ISSN 0378–4290), 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.10.008>
- JOSÉ M ALVAREZ, ELENA A VIDAL, RODRIGO A GUTIÉRREZ, Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 15, Issue 2, 2012, Pages 185-191, ISSN 1369-5266, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.009>.

- JYOTI MAURYA, TIRTHANKAR BANDYOPADHYAY, MANOJ PRASAD, Transcriptional regulators of nitrate metabolism: Key players in improving nitrogen use in crops, *Journal of Biotechnology*, Volume 324, 2020, Pages 121-133, ISSN 0168-1656, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.001>.
- KIBBE W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W43–W46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>].
- LABORDE, D., MAMUN, A., MARTIN, W., PIÑEIRO, V., & VOS, R. (2021). Agricultural subsidies and global greenhouse gas emissions. *Nature communications*, 12(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22703-1>
- LASSALETTA, L., BILLEN, G., GRIZZETTI, B., ANGLADE, J., & GARNIER, J. (2014). 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters*, 9(10), 105011. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/10/105011>
- LIU, M., ZHI, X., WANG, Y. ET AL. Genome-wide survey and expression analysis of NIN-like Protein (NLP) genes reveals its potential roles in the response to nitrate signaling in tomato. *BMC Plant Biol* 21, 347 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03116-0>
- LOUARN, G., BEDOUSSAC, L., GAUDIO, N., JOURNET, E. P., MOREAU, D., STEEN JENSEN, E., & JUSTES, E. (2021). Plant nitrogen nutrition status in intercrops— a review of concepts and methods. *European Journal of Agronomy*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126229>
- MACHADO, J., FERNANDES, A. P. G., FERNANDES, T. R., HEUVELINK, E., VASCONCELOS, M. W., & CARVALHO, S. M. P. (2022). Drought and nitrogen stress effects and tolerance mechanisms in tomato: a review. *Plant Nutrition and Food Security in the Era of Climate Change*, 315–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822916-3.00014-7>
- MARCHLER-BAUER A, BRYANT SH. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*;32(Web Server issue):W327-31. [PubMed PMID: 15215404]
- MARTÍNEZ GASPAR, F., DAMARIS, L., OJEDA BARRIOS, O., HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, A., MARTÍNEZ TELLEZ, J. Y DE LA O QUEZADA, G. (2011). El exceso de nitratos: un problema actual en la agricultura. *Synthesis*, 57
- MAXWELL K, JOHNSON GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-666
- MINEKO KONISHI, TAKAYUKI OKITSU, SHUICHI YANAGISAWA, Nitrate-responsive NIN-like protein transcription factors perform unique and redundant roles in Arabidopsis, *Journal of Experimental Botany*, Volume 72, Issue 15, 28 July 2021, Pages 5735–5750, <https://doi.org/10.1093/jxb/erab246>
- MOGOLLÓN, J. M., LASSALETTA, L., BEUSEN, A. H. W., VAN GRINSVEN, H. J. M., WESTHOEK, H., & BOUWMAN, A. F. (2018). Assessing future reactive nitrogen inputs into global croplands based on the shared socioeconomic pathways. *Environmental Research Letters*, 13(4), 044008. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aab212>
- MORO, M. 2019. Caracterización espacio temporal de los flujos de nitrógeno reactivo en el sistema agroalimentario en la Región de Murcia. Trabajo fin de máster. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid.
- MURATORE, C.; ESPEN, L.; PRINSI, B. Nitrogen Uptake in Plants: The Plasma Membrane Root Transport Systems from a Physiological and Proteomic Perspective. *Plants* 2021, 10, 681. <https://doi.org/10.3390/plants10040681>
- OHKUBO, Y., TANAKA, M., TABATA, R. ET AL. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature Plants* 3, 17029 (2017). <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.29>
- RENAU-MORATA, B.; MOLINA, R.-V.; MINGUET, E.G.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; CARRILLO, L.; MARTÍ, R.; GARCÍA-CARPINTERO, V.; JIMÉNEZ-BENAVENTE, E.; YANG, L.; CAÑIZARES, J.; ET AL. Integrative Transcriptomic and

Metabolomic Analysis at Organ Scale Reveals Gene Modules Involved in the Responses to Suboptimal Nitrogen Supply in Tomato. *Agronomy* 2021, 11, 1320. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071320>

RUFFEL S, KROUK G, RISTOVA D, SHASHA D, BIRNBAUM KD, CORUZZI GM: Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108:18524-18529.

TEGEDER, M. AND MASCLAUX-DAUBRESSE, C. (2018), Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol*, 217: 35-53. <https://doi.org/10.1111/nph.14876>

WEI XUAN, TOM BEECKMAN, GUOHUA XU, Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 39, 2017, Pages 57-65, ISSN 1369-5266
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.010>.

X.M., & Y.C. (2021). The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158(ISSN 0981-9428), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.019>.

YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, ROZEN S, MADDEN T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.

YING LIU, NICOLAUS VON WIRÉN, Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants, *Journal of Experimental Botany*, Volume 68, Issue 10, 1 May 2017, Pages 2581-2592, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx086>

ZHIHUA ZHANG, BIN HU, CHENGCAI CHU, Towards understanding the hierarchical nitrogen signalling network in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 55, 2020, Pages 60-65, ISSN 1369-5266, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.03.006>.