



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

Evaluación del papel de factores de transcripción CDF como reguladores de las permeasas AAP implicadas en el control de la partición de aminoácidos en tomate (*Solanum lycopersicum* L).

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Afonso González, Laura

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a: Molina Romero, Rosa Victoria

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

# Evaluación del papel de factores de transcripción CDF como reguladores de las permeasas AAP implicadas en el control de la partición de aminoácidos en tomate (*Solanum lycopersicum* L).

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior De Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

**AUTOR/A:** Afonso González, Laura

**Tutor/a:** González Nebauer, Sergio

**Cotutor/a:** Molina Romero, Rosa Victoria

**CURSO ACADÉMICO:** 2023/2024

VALENCIA, abril 2024

Evaluación del papel de factores de transcripción CDF como reguladores de las permeasas AAP implicadas en el control de la partición de aminoácidos en tomate (*Solanum lycopersicum* L).

**Palabras clave:** tomate; nitrógeno; NUE; CDFs; AAPs; partición; aminoácidos

**Resumen:** Los factores de transcripción Cycling DOF Factors (*CDFs*) se presentan como potenciales reguladores de las permeasas de aminoácidos (*AAPs*) en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), un cultivo hortícola ampliamente consumido. Las permeasas de la familia *AAP* se han identificado como transportadores clave en el control de la partición del nitrógeno asimilado en la planta, en especies como guisante y *Arabidopsis thaliana*; lo que las convierte en dianas potenciales para el desarrollo de cultivos con mayor Eficiencia en el Uso de Nitrógeno (NUE). Sin embargo, se desconocen las funciones específicas de las diferentes *AAPs* en tomate, así como su regulación.

Este estudio se enmarca en un proyecto enfocado hacia la caracterización fisiológica y molecular del funcionamiento de las *AAPs* en esta especie de interés agronómico, y además modelo de cultivos con fruto carnoso. Con el objetivo de profundizar en los mecanismos de regulación de estos transportadores implicados en la partición de aminoácidos, en este trabajo se va a evaluar el papel de los factores *CDFs* en la regulación de las *AAPs*. Estos factores han mostrado, en anteriores trabajos, su implicación en el metabolismo del N, así como en la partición de azúcares y aminoácidos al fruto. Su sobreexpresión da lugar a mayores producciones. No obstante, se desconoce si los transportadores de tipo *AAP* podrían estar interviniendo en estos procesos. Para contrastar esta hipótesis, en este estudio hemos empleado plantas transgénicas que sobreexpresan diferentes genes *CDF*. Se han analizado los niveles relativos de expresión de las *AAPs*, y se han correlacionado con la producción de fruto. Los resultados señalan que estos transportadores y sus posibles factores reguladores de tipo *CDF* podrían ser dianas de mucho interés en la mejora de la NUE en tomate. Esta estrategia se posiciona como un enfoque clave para mejorar la partición de aminoácidos, abordando la necesidad imperativa de reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados en la agricultura. Con ello, al optimizar la Eficiencia en el Uso de Nitrógeno (NUE) en condiciones de cultivo, se aspira a contribuir significativamente a la sostenibilidad ambiental y la gestión responsable de los recursos agrícolas.

En este contexto, los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 que se abordarán en esta investigación serán: el 6. Agua limpia y saneamiento, el 12. Producción y consumo responsables, el 13. Acción por el clima, el 14. Vida submarina y el 15. Vida de ecosistemas terrestres.

**Alumna:** Dña. Laura Afonso González

**Tutor:** Prof. D. Sergio González Nebauer

**Cotutora:** Prof. Dña. Rosa Victoria Molina Romero

**Valencia, mes de abril 2024**

Assessment of the role of CDF transcription factors as regulators of AAP permeases involved in the control of amino acid partitioning in tomato (*Solanum lycopersicum* L).

**Key Words:** tomato; nitrogen; NUE; CDFs; AAPs; partition; amino acids

**Abstract:** The Cycling DOF transcription Factors (*CDFs*) emerge as potential regulators of Amino Acid Permeases (*AAPs*) in tomato (*Solanum lycopersicum* L.), a widely consumed horticultural crop. The permeases from the *AAP* family have been identified as key transporters in controlling the partitioning of assimilated nitrogen in plants in species such as pea and *Arabidopsis thaliana*, making them potential targets for the development of crops with higher Nitrogen Use Efficiency (NUE). However, the specific functions of the different *AAPs* in tomatoes, as well as their regulation, remain unknown.

This study is part of a project focused on the physiological and molecular characterization of *AAP* functioning in this agronomically relevant specie, which also serves as a model for crops with fleshy fruits. To delve into the regulation mechanisms of these transporters involved in amino acid partitioning, this work will evaluate the role of *CDF* factors in *AAP* regulation. These factors have shown, in previous studies, their involvement in N metabolism, as well as in sugar and amino acid partitioning to the fruit. Their overexpression leads to higher yields. However, it is unknown whether *AAP*-type transporters could be involved in these processes. To test this hypothesis, we have used transgenic plants that overexpress different *CDF* genes. The relative expression levels of *AAPs* have been analyzed and correlated with fruit production. The results indicate that these transporters and their potential *CDF*-type regulatory factors could be targets of great interest in improving NUE in tomato. This strategy is positioned as a key approach to enhancing amino acid partitioning, addressing the imperative need to reduce the application of nitrogen fertilizers in agriculture. By optimizing Nitrogen Use Efficiency (NUE) under cultivation conditions, it is hoped to significantly contribute to environmental sustainability and responsible management of agricultural resources.

In this context, the Sustainable Development Goals (SDGs) of the 2030 Agenda that will be addressed in this research are: 6. Clean water and sanitation, 12. Responsible consumption and production, 13. Climate action, 14. Life below water, and 15. Life on land.

**Student:** Laura Afonso González

**Tutor:** Sergio González Nebauer

**Co-tutor:** Rosa Victoria Molina Romero

**Valencia, month of April 2024**

## **AGRADECIMIENTOS**

*'A mi familia por su inquebrantable apoyo emocional  
y comprensión a lo largo de este proceso.*

*A Sergio y a Savi por su valioso asesoramiento y  
orientación en la realización de este trabajo.'*

# ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1	Desafíos actuales y alternativas agrícolas .....	1
1.2	Desarrollo de cultivares sostenibles.....	1
1.2.1	Relevancia del cultivo de tomate como modelo de fruto carnoso .....	3
1.3	Uso del nitrógeno en la planta como diana de mejora .....	4
1.3.1	Transportadores de aminoácidos .....	5
1.3.2	Papel de las AAPs en la optimización de la NUE .....	6
1.3.3	Papel de los CDFs en la regulación de permeasas de aminoácidos .....	8
2.	Objetivos.....	9
3.	Material y métodos.....	9
3.1	Material vegetal y condiciones de cultivo .....	9
4.	Resultados y discusión .....	13
4.1	Efectos de la sobreexpresión de genes CDF sobre la producción de fruto .....	13
4.2	Variación en la expresión de las permeasas en plantas sobreexpresoras de CDFs .....	15
4.3	Búsqueda de dominios de unión Dof en la región promotora de las permeasas .....	21
5.	Conclusiones.....	22
6.	Referencias bibliográficas.....	23
7.	Anexos .....	30
7.1	ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.....	30
7.2	ANEXO II. ANOVA múltiple de los niveles de expresión de las AAP2, AAP4 y AAP6 en las distintas sobreexpresoras CDFs.....	33
7.3	ANEXO III. Sitios de unión específicos de factores CDFs en las secuencias promotoras de los genes AAPs estudiados .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen del papel y sitio de acción de los transportadores de aminoácidos caracterizados en las plantas.....	6
Figura 2. Expresión relativa de AAP1-8 en hojas (A) y frutos en desarrollo (B) de tomate de la variedad MoneyMaker bajo un aporte suficiente (barras azules) y limitado (barras naranjas) de nitrógeno.....	7
Figura 3. Valores medios de producción (gramos de fruto/planta) en plantas sobreexpresoras de los distintos CDFs y en la variedad MoneyMaker. ....	13
Figura 4. Niveles de expresión relativa de las diferentes AAPs en hoja (ho) y fruto (fr) de plantas 35S::SICDF1 (líneas L5 y L11). ....	16
Figura 5. Niveles de expresión relativa de las diferentes AAPs en hojas (ho) de plantas 35S::AtCDF3 (líneas L2.1 y L2.3) y 35S::SICDF3 (líneas L11 y L23). ....	17
Figura 6. Niveles de expresión relativa de las diferentes AAPs en hoja (ho) y fruto (fr) de plantas PPC2::SICDF4 (líneas L2.1 y L6.1). ....	18
Figura 7. Análisis de la región promotora de los genes AAP2, AAP4 y AAP6 para la identificación de elementos de unión específicos para factores de transcripción DOF. ....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen de uso y secuencia de cada par de cebadores. ....	11
Tabla 2. Programa de qRT-PCR en termociclador estandarizado en el laboratorio. ....	12
Tabla 3. Valores de correlación (r) entre la producción de fruto y la expresión relativa de las permeasas AAP2, AAP4 y AAP6 en los cultivares de tomate sobreexpresores. ....	19

## NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

35S: Promotor 35S::CaMV del virus del mosaico de la coliflor

AAPs: Permeasas de aminoácidos

At: *Arabidopsis thaliana*

CDF: Cycling Dof Factor

cDNA: ADN complementario

DDA: Días después antesis

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

MM: *Moneymaker*

mRNA: ARN mensajero

NUE: Eficiencia en el Uso de Nitrógeno

PPC2: Promotor de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)

Sl: *Solanum lycopersicum*

UBI: Ubiquitina

# **1. Introducción**

## **1.1 Desafíos actuales y alternativas agrícolas**

La Revolución Verde, iniciada a finales de la década de 1960, representó un hito en la agricultura al lograr incrementos notables en la producción de alimentos a nivel mundial. Sin embargo, el éxito de esta transformación no estuvo exento de originar nuevos desafíos significativos, especialmente en lo que respecta a los cultivos intensivos. A medida que la agricultura adoptó prácticas más intensivas, como el uso masivo de fertilizantes y pesticidas, surgieron problemas ambientales y sociales que han dejado una marca indeleble en la sostenibilidad agrícola. En particular, la utilización excesiva de nitrógeno en los cultivos y su asimilación parcial ha generado consecuencias adversas para el medio ambiente, como la contaminación del agua y la pérdida de biodiversidad (Galloway et al., 2003; Kant et al., 2011). Además de los impactos ambientales, estas prácticas resultan económicamente onerosas, debido a los costes de producción de fertilizantes químicos (Javed et al., 2022).

En la coyuntura actual, donde el crecimiento exponencial de la población requiere estrategias agrícolas cada vez más eficientes para satisfacer las demandas alimenticias humanas y animales, surge la necesidad apremiante de replantear los métodos y manejos de los cultivos. Estas estrategias deben optimizar el uso del nitrógeno, como fertilizante cuantitativamente más importante, para mitigar los impactos negativos asociados a la insostenibilidad de las prácticas agrícolas actuales (Dellero, 2020). Concretamente, este trabajo se enfoca en abordar uno de los objetivos fundamentales derivados del uso masivo de fertilizantes en los cultivos intensivos: la mejora en la Eficiencia del Uso de Nitrógeno (NUE) en la agricultura.

## **1.2 Desarrollo de cultivares sostenibles**

En el contexto del desarrollo de una agricultura de alta producción, en condiciones de máxima sostenibilidad, la mejora de la NUE es fundamental como parámetro que contempla la capacidad de las plantas de absorber y utilizar eficientemente el nitrógeno para su crecimiento y el desarrollo del órgano cosechado (Iqbal et al., 2019). Este enfoque busca equilibrar la producción de alimentos de elevada calidad organoléptica, minimizando los impactos ambientales y optimizando el uso de recursos económicos.

La NUE, definida como la cantidad máxima de biomasa cosechada obtenida a partir de una cantidad específica de nitrógeno suministrado (Moll et al., 1982), se desglosa en dos componentes clave: la Eficiencia en la Absorción de Nitrógeno (NUpE) y la Eficiencia en la Utilización de Nitrógeno (NUE). La NUpE abarca la capacidad de las plantas para absorber nitrógeno del suelo, mientras que la

NUtE refleja la utilización eficiente de este nitrógeno en el desarrollo del órgano cosechado (van Bueren y Struik, 2017). La NUtE integra procesos fisiológicos diversos, como la asimilación de nitrógeno inorgánico para la producción de aminoácidos, la capacidad de almacenamiento y removilización de nitrógeno, y la partición de nitrógeno a los sumideros de la planta (Iqbal et al., 2019).

Hasta la fecha, los esfuerzos destinados a mejorar la NUE en cultivos han priorizado procesos vinculados a la absorción de nitrógeno inorgánico, la asimilación de nitrato y amonio, así como al reciclaje de nitrógeno orgánico (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Liu et al., 2022). La absorción predominante de nitrógeno inorgánico, especialmente en forma de nitrato, y su subsiguiente asimilación en las hojas, representan procesos cruciales para la eficiencia en la utilización de nitrógeno. Por este motivo, se han llevado a cabo numerosos estudios relacionados con los transportadores de nitrato (Li et al., 2010; Fan et al., 2017; Aluko et al., 2023). Cabe destacar el trabajo de Aluko et al. (2023), en el que se subraya el notable potencial exhibido por el empleo de los transportadores de nitrato para mejorar la eficiencia en la absorción y utilización del nitrógeno por parte de las plantas. Con ello, estos transportadores se han propuesto también como dianas en programas de mejora de cultivos. Además, la removilización del nitrógeno almacenado y la regulación de genes clave, tales como la glutamina sintetasa citosólica (GS1), la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la asparagina sintetasa (AS), desempeñan un papel esencial en estos procesos (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

Sin embargo, a pesar de las correlaciones positivas entre la expresión de genes clave y la NUE en diversos cultivos (Fan et al., 2016; Fang et al., 2017), se observan resultados inconsistentes atribuidos a regulaciones metabólicas y post-transcripcionales, así como a variaciones en función de los niveles de disponibilidad de nitrógeno (Cohen et al., 2019).

Aunque se han identificado genes responsables de la NUE en el tomate, la mayoría de los esfuerzos se han enfocado exclusivamente en los mecanismos de absorción de nitrógeno en las raíces (Abenavoli et al., 2016; Albornoz et al., 2018; González-Hernández et al., 2020). Sin embargo, no se dispone de información sobre los factores moleculares que influyen en la partición del nitrógeno asimilado hacia los sumideros y su correspondiente regulación. Este panorama resalta la complejidad y la necesidad de una comprensión más holística para progresar, de manera eficiente, en la mejora de la NUE en el tomate.

El presente trabajo se enmarca en un proyecto que propone una estrategia menos explorada, pero potencialmente influyente, para incrementar la cantidad de nitrógeno distribuido a los frutos en el tomate, centrada en el transporte de nitrógeno asimilado dentro de la planta. Se busca comprender y modular la regulación de los procesos de transporte de aminoácidos, a nivel de las permeasas de aminoácidos (AAPs), con el objetivo de desarrollar cultivares de tomate con una NUE mejorada. Por lo

tanto, este enfoque innovador ofrece nuevas perspectivas para maximizar la eficiencia en el uso de nutrientes en los cultivos de tomate.

Concretamente, en este trabajo, se pretende evaluar el papel de los factores de transcripción *CDF* en la regulación de la expresión de las permeasas AAP. Los *CDFs* (Cycling Dof Factors), son una familia de factores de tipo DOF, identificados como reguladores de la partición de nitrógeno y la eficiencia en el uso de nutrientes en tomate (Renau-Morata et al., 2020; Domínguez-Figueroa et al., 2021). Por ello, una comprensión más precisa de la interacción entre los *CDFs* y las permeasas se espera que contribuya a la optimización de la NUE en esta especie.

### **1.2.1 Relevancia del cultivo de tomate como modelo de fruto carnoso**

La posición preeminente del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como modelo de fruto carnoso adquiere una relevancia excepcional en el contexto de la mejora agrícola, dada su destacada condición como el segundo cultivo hortícola más producido y consumido a nivel mundial (FAOSTAT, 2021). Este cultivo ha sido objeto de extensos estudios debido a su perfil nutricional y fitoquímico distintivo, posicionándose como un modelo de gran valor para la investigación en frutos carnosos (Kimura y Sinha, 2008).

Asimismo, el tomate se erige como una elección ideal para liderar estrategias de mejora agrícola, dada su estrecha relación genética con otras especies de la familia *Solanaceae*, como la papa (*Solanum tuberosum* L.) y la berenjena (*Solanum melongena* L.) (Ganaie et al., 2018). Esto facilita la transferencia de conocimientos entre diferentes especies, a la vez que genera información crucial sobre la regulación génica y la evolución de características específicas de frutos carnosos.

Debido a la calidad organoléptica y nutricional del fruto, por su riqueza en antioxidantes como el licopeno (Gerszberg et al., 2015), el tomate es un componente esencial en la dieta mediterránea y constituye un foco de investigación en relación con su impacto en la salud humana (Giovannucci, 1999; Rao y Agarwal, 1999).

Con ello, su importancia en la dieta mediterránea resalta la necesidad apremiante de optimizar la NUE de este cultivo. Es importante que la producción agrícola intensiva no comprometa la calidad del agua ni afecte negativamente al ecosistema (Fraiture y Wichelns, 2010); por lo que, el tomate, como cultivo emblemático de la región, desempeña un papel crucial en la promoción de prácticas agronómicas responsables y sostenibles.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, la investigación en tomate no sólo aborda interrogantes fundamentales en biología vegetal, sino que también tiene aplicaciones prácticas en la mejora de

cultivos. Su combinación única de características genéticas, relevancia económica, impacto en la salud humana y contribución a la sostenibilidad agronómica, lo consolida como un organismo modelo invaluable y versátil en la investigación agronómica y biológica, especialmente en el contexto de la optimización de la Eficiencia en el Uso de Nitrógeno (NUE).

### **1.3 Uso del nitrógeno en la planta como diana de mejora**

El nitrógeno (N) representa un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo un componente crítico de moléculas biológicas fundamentales como aminoácidos y ácidos nucleicos (Marschner, 1995). Además, desempeña un papel crucial en procesos biológicos vitales como la fotosíntesis, puesto que es un elemento presente en las moléculas de clorofila y enzimas del ciclo de Calvin, especialmente en la Rubisco. Por lo tanto, la importancia del nitrógeno se extiende a su participación directa en la síntesis de proteínas, componentes esenciales de las estructuras celulares, y su contribución a la formación de coenzimas y pigmentos (Liu et al., 2014; Yao et al., 2020).

La partición eficiente del nitrógeno en las plantas se presenta como un proceso crucial que está intrínsecamente vinculado al metabolismo de C/N (Martin et al, 2002). Este comienza con la absorción de nitrógeno del suelo, principalmente en forma de nitrato. De forma general, es transportado por el xilema hasta las hojas, donde se convierte en aminoácidos. Para ello, inicialmente es reducido a amonio y, posteriormente, la acción coordinada de la glutamina sintetasa (GS2) y la glutamato sintasa (GOGAT) (Higashi et al., 1998) facilita su asimilación como glutamato o glutamina. Estas reacciones requieren esqueletos de carbono para la incorporación de N inorgánico en las moléculas orgánicas (Krapp et al., 2005). Cabe destacar que, la glutamina y el glutamato, junto con la asparagina y el aspartato, son las principales formas de N asimilado, distribuido por la planta a través del floema para sustentar el crecimiento de los diferentes sumideros.

La eficiente removilización del nitrógeno almacenado y su redistribución hacia órganos de crecimiento, como frutos y semillas, son también aspectos cruciales dentro del complejo metabolismo del nitrógeno. Durante procesos como la senescencia, la proteólisis y la autofagia, se activan mecanismos para liberar nitrógeno almacenado en forma de proteínas y otros compuestos nitrogenados (Havé et al., 2017). En este contexto, es preciso reincidir en el papel de los metabolitos de carbono como reguladores de la partición del nitrógeno, dado que la interacción entre ambos metabolismos es esencial para el rendimiento y la calidad de los productos cosechados (Lawlor et al., 2002).

En consonancia con esto, el enfoque específico de este estudio recae precisamente en comprender y mejorar la partición del nitrógeno en el tomate, con énfasis en las permeasas de aminoácidos.

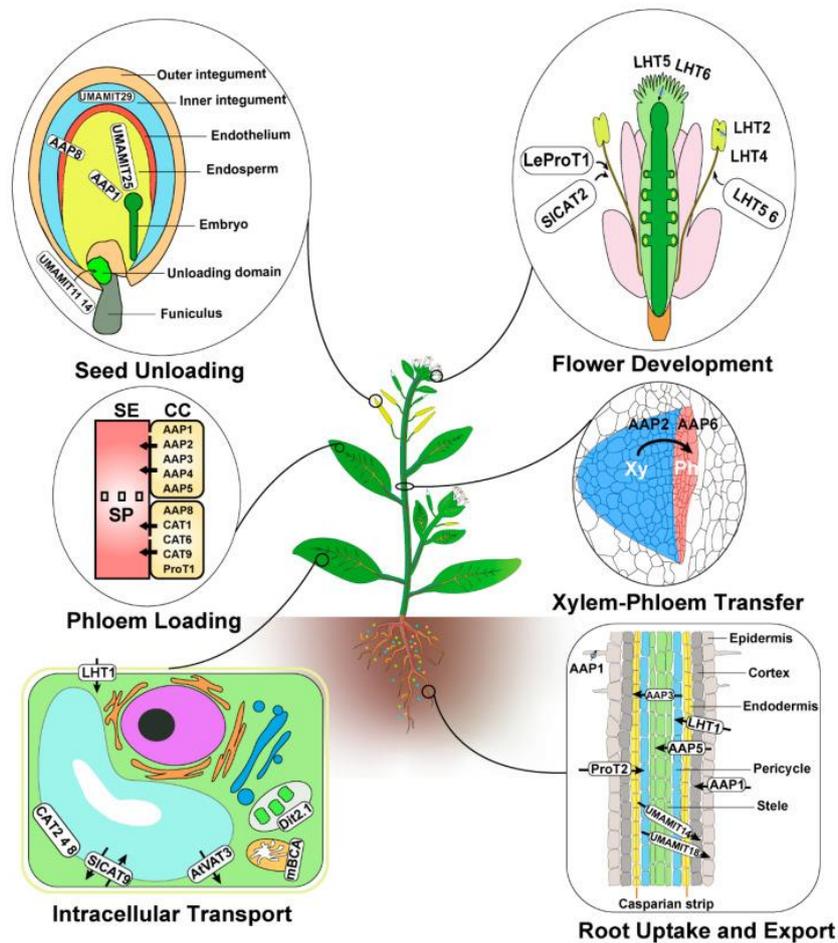
### 1.3.1 Transportadores de aminoácidos

En plantas, los transportadores que posibilitan el transporte intra o intercelular de aminoácidos se dividen en dos categorías principales según su secuencia: los transportadores AAAP (Permeasa de Aminoácidos/Auxina) y los APC (aminoácido-poliamina y colina) (Okumoto y Pilot, 2011). El primer grupo se subdivide, según la especificidad de los aminoácidos transportados, en: permeasas generales de aminoácidos (AAPs), transportadores de lisina e histidina (LHTs), transportadores de ácido gamma-aminobutírico (GATs), transportadores de prolina (ProTs), transportadores de ácido indol-3-acético (AUXs), transportadores de aminoácidos neutros y aromáticos (ANT), y las llamadas 'proteínas similares a transportadores de aminoácidos' (Ortiz-Lopez et al., 2000; Okumoto y Pilot, 2011; Alzharani, 2021). En cuanto a los APC, se clasifican en transportadores de aminoácidos catiónicos (CATs), 'transportadores de aminoácidos/colina' (ACTs) y 'symporters de poliaminas H<sup>+</sup>' (PHSs) (Okumoto y Pilot, 2011).

Investigaciones anteriores han profundizado en la función de algunos de estos transportadores en *Arabidopsis* y otras especies (Figura 1). Por ejemplo, ciertos LHT, como *AtLHT1*, participan en la absorción de nitrógeno del suelo; mientras que ProTs como *AtProT1*, *AtProT2* y *AtProT3* muestran expresiones específicas en distintos tejidos, como raíces, partes aéreas y epidermis de las hojas (Chen y Bush, 1997; Grallath et al., 2005).

Los transportadores de aminoácidos catiónicos (CATs), como *CAT2* vinculado al almacenamiento en vacuola, y *CAT6* presente en la membrana plasmática, se expresan en diversos sumideros (Su et al., 2004; Hammes et al., 2006).

También es relevante destacar la subfamilia de transportadores recientemente identificada, conocida como UMAMIT ('Usually Multiple Acids Move In and out Transporter'). Esta subfamilia interviene durante el desarrollo de la semilla y participa en el transporte de aminoácidos en el floema (Figura 1), mostrando respuestas a la regulación ambiental, como una represión en la expresión por la deficiencia de nitrógeno (Besnard et al., 2018; Yao et al., 2020; Zhao et al., 2021).



**Figura 1. Resumen del papel y sitio de acción de los transportadores de aminoácidos caracterizados en las plantas.**

Se incluyen transportadores involucrados en la absorción y exportación de aminoácidos en las células de la raíz, la transferencia xilema-floema, el transporte intracelular, la carga del floema, el desarrollo de flores y la descarga en semillas. Las flechas negras que cruzan las cajas blancas redondeadas se refieren a la dirección del transporte cuando se conoce. (De Yao et al., 2020; bajo licencia CC BY 4.0)

De la amplia diversidad de transportadores todavía susceptibles de estudio, esta investigación se enfoca de manera específica en las AAPs, reconocidas como los principales transportadores en la distribución de aminoácidos en la planta. La subfamilia AAP, compuesta por 8 genes en *Arabidopsis* (AAP1-8), exhibe afinidad por aminoácidos neutros y ácidos, aunque ciertos miembros también son capaces de transportar aminoácidos básicos (Okumoto et al., 2002; Tegeder y Rentsch, 2010). Con ello, la comprensión de la función y regulación de estas permeasas es crucial para optimizar la NUE, por su papel en la partición de aminoácidos en la planta.

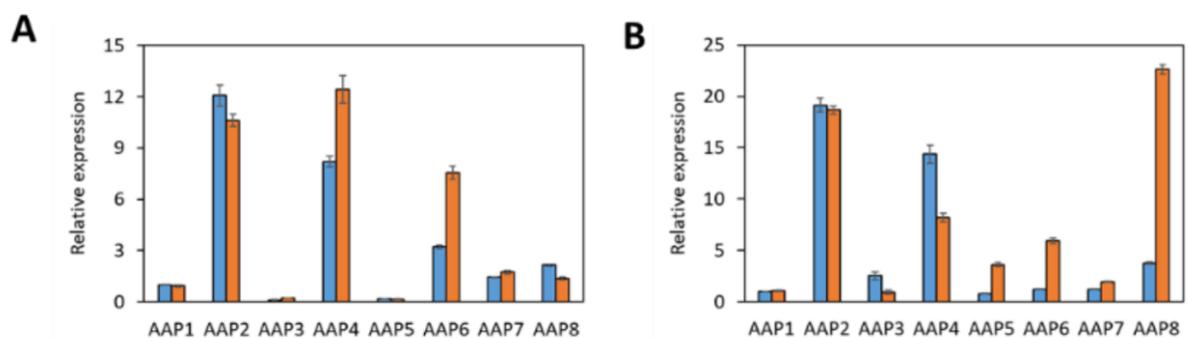
### 1.3.2 Papel de las AAPs en la optimización de la NUE

Estudios en guisante, arroz y soja, han destacado la mejora en la capacidad de absorción de N y transporte de aminoácidos mediante la sobreexpresión de permeasas AAP1 y AAP6 en diferentes tejidos bajo condiciones variables de suministro de N (Dellero, 2020). Además, la sobreexpresión de PsAAP1 en guisante aumentó significativamente el transporte de aminoácidos, la producción de

semillas y la NUE bajo suministro de N variable (Perchlik y Tegeder, 2017). No obstante, el estudio de Perchlik y Tegeder (2018) muestra resultados contrastantes, dado que se obtuvo una mejora significativa en la NUE con la inactivación o ‘knockout’ del gen *AtAAP2* en *Arabidopsis*, exhibiendo una mayor tasa fotosintética y transporte de aminoácidos hacia los sumideros. Con todo ello, estas variaciones evidencian la complejidad de los mecanismos de regulación específicos de cada especie y su respuesta a tensiones nutricionales.

En este contexto, el estudio de Tegeder y Masclaux-Daubresse (2017) ha permitido demostrar que las AAPs participan en la carga apoplástica de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados al floema desde las hojas; lo que desempeña un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de los sumideros de las plantas. En este proceso se ha visto que la AAP6, junto con otros transportadores de nitrato localizados en el parénquima del xilema a lo largo de la ruta de transporte, juega funciones cruciales en la recuperación de nitrógeno desde el xilema, así como en la eficiente transferencia xilema-floema. Por otro lado, la AAP2, expresada en el floema, también desempeña un papel fundamental en la transferencia de aminoácidos desde el xilema hasta el floema. (Hunt et al., 2010; Li et al., 2010).

En lo que respecta al tomate, a pesar de su importancia como cultivo y modelo de fruto carnoso, la información sobre las permeasas involucradas en la partición de aminoácidos desde las hojas hasta el fruto es muy limitada. Sin embargo, gracias a la reciente identificación de 88 permeasas de las familias AAP y APC en el tomate, existe una base para la caracterización funcional de las permeasas AAP en esta especie (Alzahrani, 2021). Estudios preliminares en nuestro laboratorio revelaron que entre las 8 permeasas, la AAP2, AAP4 y AAP6 mostraron los niveles de expresión más altos tanto en hojas maduras como en frutos en crecimiento, sugiriendo su papel clave en la carga del floema en hojas y descarga en frutos (Figura 2, A y B).



**Figura 2. Expresión relativa de AAP1-8 en hojas (A) y frutos en desarrollo (B) de tomate de la variedad MoneyMaker bajo un aporte suficiente (barras azules) y limitado (barras naranjas) de nitrógeno.**

Las barras representan el error medio  $\pm$  ES.

Aunque se ha avanzado en la comprensión de la función de transportadores como SUT y SWEET en la carga y descarga apoplástica de azúcares, y su impacto positivo tanto en el metabolismo C/N como la mejora del desarrollo del fruto (Gautam et al. 2022); el papel de las AAPs en la optimización de la Eficiencia en el Uso de Nitrógeno (NUE) ha sido menos estudiado y constituye un área de investigación relevante.

### **1.3.3 Papel de los CDFs en la regulación de permeasas de aminoácidos**

Los factores de transcripción de tipo DOF (DNA-binding with One Finger) son factores específicos de plantas que poseen un dominio de unión al DNA altamente conservado, caracterizado por un solo dedo de zinc C2-C2 (Yanagisawa, 2004). Estas proteínas han sido identificadas durante la última década en diversas plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas; como maíz, cebada, trigo, arroz, tabaco, *Arabidopsis*, calabaza, papa y guisante. Su función principal radica en actuar como activadores o represores de la transcripción, participando en diversos procesos biológicos específicos de las plantas, como la tolerancia al estrés abiótico y el tiempo de floración, además de en el crecimiento y desarrollo del fruto (Renau-Morata et al., 2017).

Dentro de los genes DOF, existe un grupo, los Cycling DOF Factors (*CDF*), que presenta una oscilación diaria en su expresión (Domínguez-Figueroa et al., 2021). Inicialmente, se describieron como implicados en la regulación de la floración por fotoperiodo en *Arabidopsis*, además de en las respuestas de la planta a estreses abióticos (Fornara et al., 2009, 2015). Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado que los factores de transcripción *CDF* son reguladores directos o indirectos de procesos asociados con la asimilación de carbono y nitrógeno, así como su partición en la planta (Renau-Morata et al., 2020; 2021; Domínguez-Figueroa et al., 2021). En particular, *CDF3* y *CDF4* desempeñan funciones importantes en el control del metabolismo C/N y la asimilación de nutrientes en tomate. Concretamente, se ha observado que la sobreexpresión de *CDF3* conduce a un aumento significativo en la producción de biomasa, rendimiento y calidad del fruto (Renau-Morata et al., 2017); mientras que la sobreexpresión específica de *CDF4* en el fruto resulta en un aumento en la fuerza del sumidero y el desarrollo de frutos más grandes con mayores contenidos de aminoácidos (Renau-Morata et al., 2020).

Se ha descrito que plantas con niveles alterados en estos genes muestran cambios significativos en los niveles de azúcares y aminoácidos en hojas y frutos; sugiriendo un posible papel de los *CDFs* como reguladores de los mecanismos moleculares asociados al transporte de dichos compuestos. Consecuentemente, se plantea como hipótesis que los *CDFs* presentan un potencial papel regulador de la partición de aminoácidos en el tomate a través de la modulación de genes *AAP*. La caracterización molecular y fisiológica de genotipos transgénicos con niveles alterados de *CDFs* que se

emplean en este estudio, como *PPC2::SICDF4*, *35S::SICDF1*, *35S::SICDF3* y *35S::AtCDF3*, proporcionará una comprensión más profunda de la relación entre estos factores de transcripción y las permeasas *AAP2*, *AAP4* y *AAP6*, como permeasas mayormente expresadas en hojas y frutos. Además, la correlación de datos de rendimiento productivo con la expresión de *AAPs* en genotipos con genes *CDF* alterados, contribuirá a identificar el impacto de los *CDFs* en la partición y el crecimiento de la planta.

## 2. Objetivos

El objetivo general del estudio consiste en comprobar si los factores de transcripción *CDF* presentan un papel regulador en la partición de N mediante el control de las permeasas *AAP* en tomate.

La consecución del objetivo general conlleva alcanzar los objetivos parciales detallados a continuación:

- Estudiar la expresión de las diferentes permeasas (*AAP2*, *AAP4* y *AAP6*) en plantas de tomate sobreexpresoras de genes *CDFs* (líneas transformadas *CDF1*, *CDF3* o *CDF4*).
- Analizar la correlación entre la producción de fruto en la planta y la expresión de las *AAPs*.
- Investigar la existencia de sitios de unión específicos de *CDFs* en los promotores de los genes de las *AAPs* en estudio.

Cabe añadir que el resultado esperado de este proyecto contribuirá positivamente con cinco de los ODS ("Objetivos de desarrollo sostenible") de la ONU. Entre ellos, destacan los ODS 6, 12 y 15, relacionados con la sostenibilidad; puesto que el proyecto pretende disminuir el impacto ambiental que conlleva la producción agrícola, mediante el empleo de prácticas sostenibles que reduzcan la contaminación del agua, el uso de fertilizantes y, por ende, eviten la pérdida de biodiversidad.

## 3. Material y métodos

### 3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

En este estudio se emplearon genotipos transgénicos de tomate con niveles de expresión de genes *CDF* alterados. Concretamente, se emplean las líneas:

- Cultivar *MoneyMaker* (MM), empleado como control.
- Plantas que sobreexpresan el gen *CDF4* de tomate (*SICDF4*, líneas L2.1 y L6.1)) específicamente en fruto, bajo el control del promotor PPC2 (fosfoenolpiruvato carboxilasa).
- Plantas que sobreexpresan el gen *CDF1* de tomate (*SICDF1*) bajo el control del promotor *35S::CaMV* (líneas L5 y L11).

- Plantas que sobreexpresan el gen *CDF3* de tomate (*SlCDF3*, líneas L2.1 y L2.3) o de *Arabidopsis thaliana* (*AtCDF3*, líneas L11.2 y L23.3) bajo el control del promotor *35S::CaMV*.

Las semillas de estos genotipos se esterilizaron con una disolución de lejía comercial al 15%, se lavaron tres veces con agua destilada, y se repartieron en placas Petri con papel de filtro para su germinación. Dichas placas se introdujeron durante una semana en una cámara de cultivo tipo fitotrón a 24°C, con aireación, luz y humedad adecuadas para su germinación. Posteriormente, fueron trasladadas a bandejas de alveolos con sustrato universal durante 3-4 semanas en cámaras de cultivo (25/20°C y 16/8 h luz/oscuridad) y, a continuación, se trasplantaron en macetas de 15 L con fibra de coco. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero, recibiendo riegos con solución nutritiva Hoagland nº2 (Hoagland y Arnon, 1950), bajo prácticas de manejo estándar, durante 140 días hasta la fase reproductiva.

Se realizaron muestreos de hojas jóvenes maduras (3ª - 4ª hoja desde el ápice) y frutos verdes en desarrollo (10-15 DDA), en el día 110 del cultivo. Se recolectaron tres réplicas (a excepción del ensayo de *CDF4*, donde se recolectaron cuatro réplicas) de material biológico de ambos órganos en plantas distintas, congelando rápidamente en nitrógeno líquido y almacenando a -80°C hasta su uso.

Adicionalmente, el cultivo se mantuvo hasta el desarrollo del 4º racimo con el fin de medir la producción total de cada planta. Esto permitió establecer el valor medio de producción de cada genotipo y llevar a cabo las correlaciones con los valores de expresión relativa de mRNA de las diferentes *AAPs*.

Concretamente, para cada genotipo y órgano estudiado, se tipificaron los datos de expresión relativa de las tres *AAPs* y se evaluó la existencia de correlación con el valor medio de gramos de tomate producidos en cada una de las líneas correspondientes.

### **3.2 Extracción de RNA**

Las muestras almacenadas a -80°C fueron trituradas en un mortero empleando nitrógeno líquido, obteniéndose polvo de los diferentes órganos.

Se emplearon 100 mg de hoja joven y 300 mg de fruto verde para las extracciones de RNA. La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el kit Total Plant RNA Mini KIT (IBI SCIENTIFIC, España), siguiendo el protocolo descrito por la marca, con ciertas modificaciones. La determinación de la concentración de RNA se realizó mediante un espectrofotómetro Epoch (Biotek). Además, se comprobó su calidad midiendo las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, referentes a una posible contaminación por proteínas, fenoles, guanidina o carbohidratos. La mayoría de las muestras presentaron valores ajustados a los rangos de calidad requeridos: alrededor de 2 para el ratio 260/280

y entre 2 y 2,2 para el 260/230 (datos no mostrados). No obstante, en muestras de fruto correspondientes a MM y L5 de plantas sobreexpresoras *CDF1*, fue necesario llevar a cabo una precipitación con LiCl para concentrar el RNA obtenido e incrementar la calidad de las muestras, normalizando ciertos ratios que mostraban una calidad insuficiente.

### 3.3 Síntesis de cDNA

La retrotranscripción de RNA a cDNA se realiza siguiendo el protocolo del Prime Script RT Kit (Takara). La síntesis se efectúa en un termociclador (Modelo Bio-Rad) manteniendo los tubos a 37°C durante 15 minutos, seguido de 5 segundos a 85°C para inactivar la transcripción reversa con un tratamiento térmico. Con todo ello, se obtienen 10 µL de cDNA, con una concentración de 100 ng/µL, posteriormente diluida hasta 10 ng/µL (dilución 1:10); lo que permite obtener la cantidad de cDNA necesaria para llevar a cabo las reacciones siguientes.

### 3.4 Medidas de expresión mediante qRT-PCR

Las reacciones de qRT-PCR (“quantitative real-time PCR”) se realizan en un termociclador CFX Connect 96 (Bio-Rad). Se emplearon 20 ng de cDNA por reacción y el mix TB Green Premix Ex Taq (Takara) en un volumen de reacción de 10 µL. Los cebadores utilizados fueron previamente diseñados en el laboratorio, y se comprobó su eficiencia para la amplificación específica de cada uno de los genes de interés. Las concentraciones optimizadas del par de cebadores de cada gen están recogidas en la Tabla 1.

**Tabla 1. Volumen de uso y secuencia de cada par de cebadores.**

GEN	[STOCK] (µM)	FW (µL)	RV (µL)	SECUENCIA
<b>UBIQUITINA3</b>	5	0,75	0,25	FW: AAGCAATGGATGCTGAGGCT RV: GAAGGTGCCGTTGAATGACA
<b>GAPDH</b>	5	0,2	0,2	FW: TGGTGCTGACTTCGTTGTTG RV: CCACAACAAACATGGGAGCA
<b>AAP2</b>	5	0,6	0,6	FW: CTTAGTGGTGCTTGCCTTGT RV: TCCAGCAAAAGAACCAGCAG
<b>AAP4</b>	5	0,4	0,4	FW: GAGCTGGACTTGTTTGATCGT RV: ATCAGTTGCAAGTCCCTGGAT
<b>AAP6</b>	5	0,6	0,6	FW: GGAGCTTGGACAAGAAAATGG RV: TTGATCCAATCAACCCAGT

Se analizó la expresión de los genes *AAP2*, *AAP4* y *AAP6*, considerando que en resultados previos mostraron los mayores niveles de expresión en hojas y frutos de tomate. Para los experimentos de *CDF1* y *CDF4*, se empleó el gen de la *UBIQUITINA3* (Hoffman et al., 1991) como gen de referencia interno (“housekeeping”), mientras que para *CDF3* se empleó como constitutivo el gen *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Løvndal et al. 2009). Ambos genes presentan una eficiencia equivalente de amplificación en las condiciones de ensayo del laboratorio, y se emplean indistintamente en la normalización de la expresión de genes. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 2. Para cada gen *AAP*, en *CDF1* se analizaron tres genotipos, dos líneas de tomate transformadas (L5 y L11) frente a MM, y cada uno con tres réplicas biológicas representadas por tres réplicas técnicas, para ambos órganos. En *CDF3*, se analizaron tres réplicas biológicas de cada genotipo (MM, L2.1, L2.3.1, L11.2 y L23.32) en hoja, con sus tres réplicas técnicas correspondientes; y para *CDF4* se procedió de forma análoga a *CDF1*, pero empleando 4 réplicas biológicas para cada genotipo estudiado (MM, L2.1 y L6.1). El análisis de expresión relativa o contenido relativo de mRNA se realizó siguiendo el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

**Tabla 2. Programa de qRT-PCR en termociclador estandarizado en el laboratorio.**

1. 95°C durante 30 segundos.
2. 40 CICLOS de: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 95°C durante 5 segundos.</li> <li>➤ 60°C durante 30 segundos.</li> </ul>
3. 95°C durante 10 segundos.
4. Obtención de la Melting Curve: Incremento de temperatura de 0,5°C cada 5 segundos desde 65°C hasta 95°C.

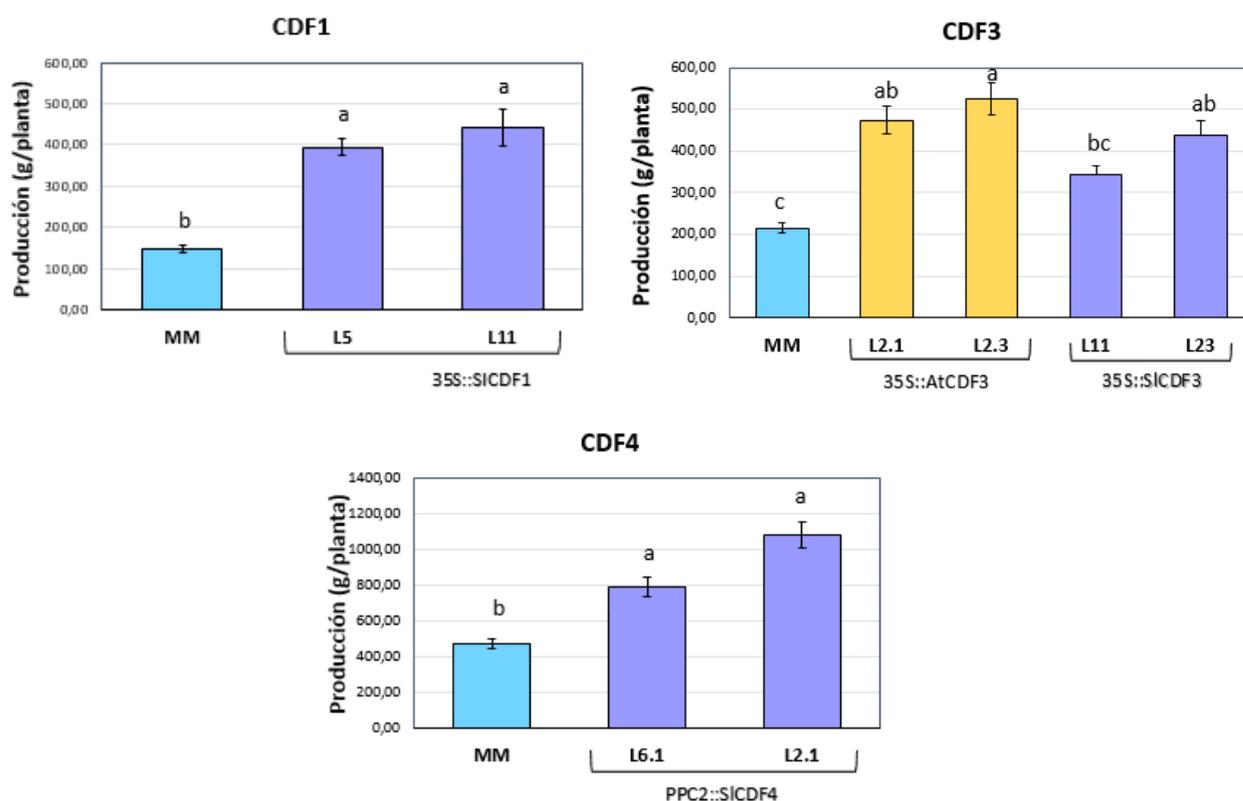
### 3.5 Análisis estadístico

Para identificar diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados con respecto a MM, se analizaron los datos mediante pruebas de ANOVA simple y multifactorial con el programa Statgraphics Centurion 19 Versión 19.6.03 (64-bit). La separación de medias se realizó mediante el LSD (Least Significant Difference) ( $P < 0.05$ ). También se realizó un análisis de correlaciones mediante el programa Statgraphics.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Efectos de la sobreexpresión de genes CDF sobre la producción de fruto

Tal y como se ha descrito previamente, se midió la producción total de cada planta al alcanzarse el desarrollo del 4º racimo, para analizar el efecto de la sobreexpresión de los genes CDF sobre dicho parámetro. En la Figura 3, se muestra el valor medio de producción de cada genotipo, con respecto a la línea MM control empleada en cada experimento concreto.



**Figura 3. Valores medios de producción (gramos de fruto/planta) en plantas sobreexpresoras de los distintos CDFs y en la variedad MoneyMaker.**

Las barras representan el error medio  $\pm$  ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos muestran que los gramos de tomate producidos por las líneas transgénicas son, en los tres experimentos, significativamente superiores a los de las líneas control de la variedad MM. Esto indica que la sobreexpresión de genes CDF lleva asociado un incremento de la cosecha, sugiriendo un potencial papel regulador en el crecimiento del fruto en plantas de tomate.

En un trabajo previo de Renau-Morata et al. (2020), se caracterizó la función fisiológica del gen *CDF4* empleando plantas de tomate que lo sobreexpresaban específicamente en el fruto en desarrollo.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento sustancial en el tamaño del fruto en las líneas transgénicas, lo que contribuyó a un rendimiento global superior de las plantas comparadas con el cultivar no transformado. Se describió que el mayor crecimiento del fruto se sostenía en una mayor capacidad de división y crecimiento celular, así como en una mayor capacidad de sumidero de azúcares y agua. Además, se evidenció que el gen *SICDF4* indujo la acumulación del contenido de giberelina GA<sub>4</sub> en los frutos, especialmente durante la fase de expansión celular; lo que señala la participación de *SICDF4* en procesos hormonales clave vinculados al crecimiento del fruto.

Otro aspecto destacado fue la modificación significativa de compuestos de carbono relacionados con la calidad del tomate, debido a la sobreexpresión de *SICDF4* en el fruto (Renau-Morata et al., 2020). Concretamente, se observó un aumento en el contenido de ácido málico y una disminución en los niveles de ácido cítrico y glucosa en los frutos transgénicos, lo que resulta en un ratio ácido málico/ácido cítrico más alto y una relación de equivalentes de sacarosa/ácido cítrico también más elevada. Estos cambios se correlacionan con una percepción sensorial alterada en los frutos. Además, se detectó un aumento en los niveles de GABA (ácido gamma-aminobutírico) y glutamina, así como una mayor expresión del gen *GAD2* (glutamato descarboxilasa 2), lo que sugiere una modificación en el transporte y metabolismo de aminoácidos en los frutos transgénicos. En síntesis, la sobreexpresión de *SICDF4* altera la composición de los compuestos de carbono relacionados con la calidad del fruto, influyendo en su sabor y valor nutricional.

En lo que respecta a estudios anteriores sobre el papel regulador del gen *SICDF3* en la partición de aminoácidos hacia el fruto, el estudio de Renau-Morata et al. (2017) destaca por su análisis de la función del gen en condiciones de estrés; con el propósito de comprender su participación en las respuestas de crecimiento y producción frente al estrés abiótico, además de comparar su efecto con el gen ortólogo *AtCDF3* de Arabidopsis.

Para examinar su función y efecto en el crecimiento y producción vegetal, se evaluaron plantas con sobreexpresión de *CDF3* bajo estrés salino y bajo condiciones control. Tanto las plantas de tomate con sobreexpresión de *AtCDF3*, como las que sobreexpresaban *SICDF3*, mostraron un incremento significativo en la producción de cosecha en ambos contextos de cultivo. Además, presentaron una mayor capacidad fotosintética y acumulación total de biomasa, subrayando la elevada correlación entre ambos parámetros, e indicando que el aumento en la fotosíntesis es el factor principal que impulsa un mayor crecimiento en plantas con sobreexpresión de los genes *CDF3* (Renau-Morata et al., 2017).

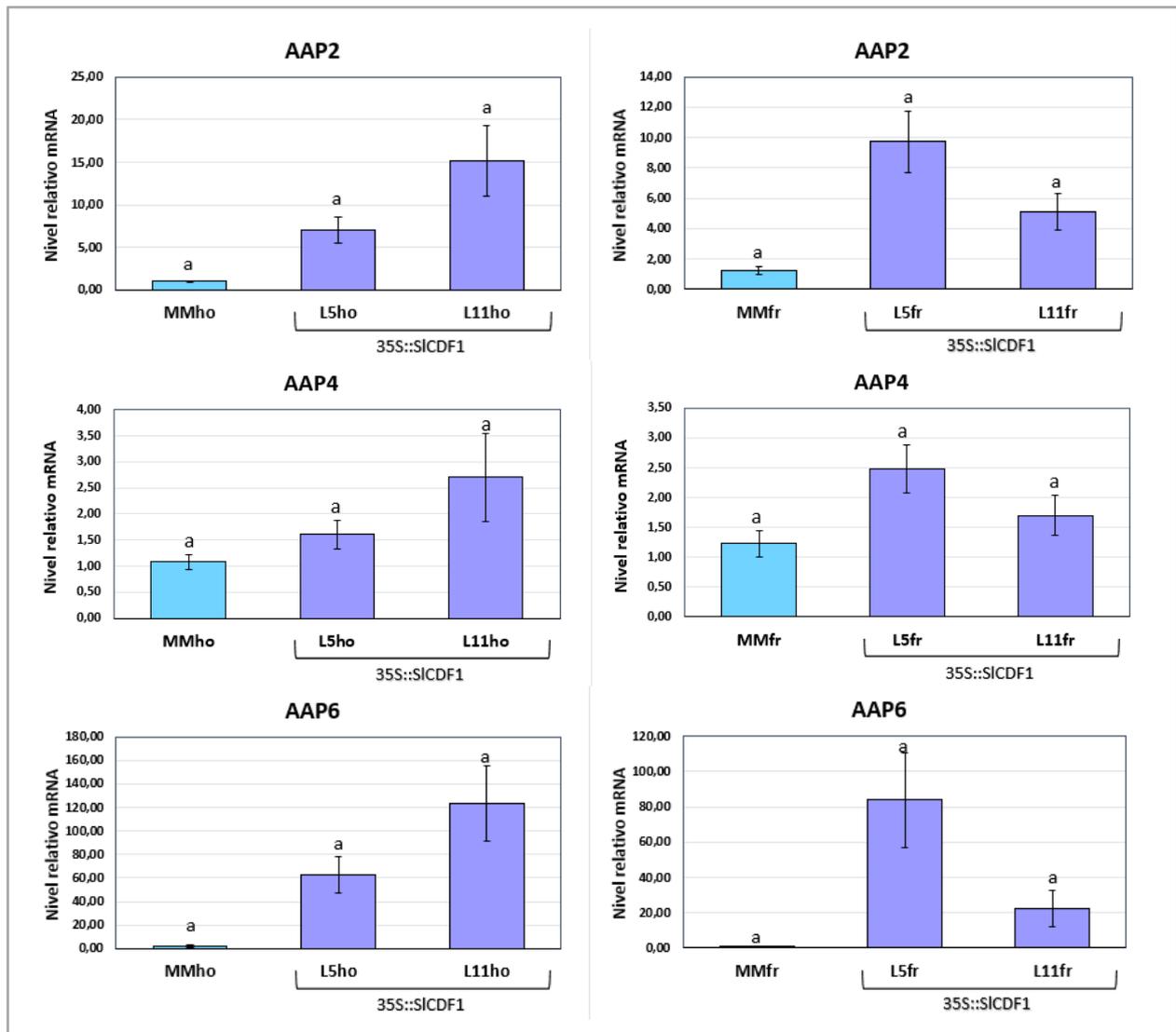
Por otra parte, el análisis transcriptómico reveló diferencias significativas en la expresión génica entre las plantas transgénicas y no transgénicas, especialmente en genes como los de las chaperonas *DNAJ* y la tiorredoxina *TRX*, implicados en la regulación de procesos redox; así como en los genes *PEPCK* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y *GAD*, relacionados con el metabolismo de aminoácidos (Renau-Morata et al., 2017). Concretamente, se observaron cambios en el metabolismo de carbono y nitrógeno, con niveles elevados de sacarosa y aminoácidos, indicando una mejora en la asimilación de ambos elementos. Este fenómeno permitió que las plantas transgénicas mantuvieran niveles de crecimiento y rendimiento superiores a las no transgénicas. En resumen, la sobreexpresión del gen *SICDF3* en tomate incrementó notablemente la cosecha en base a una mayor fotosíntesis y partición de fotoasimilados al fruto. En un trabajo posterior (Domínguez-Figueroa et al., 2020) la sobreexpresión del gen *AtCDF3* indujo una mayor NUE en condiciones de aporte limitado de N, destacando el posible papel de este factor en el control de la partición de N y C asimilado al fruto.

Por lo tanto, los resultados de este estudio apoyan las hipótesis planteadas en estudios previos sobre la intervención de los genes *CDF* en la regulación de la partición de aminoácidos. Además, la presente investigación contribuye con nuevos conocimientos al incorporar líneas que sobreexpresan el gen *CDF1* de tomate, que no han sido caracterizadas, en detalle, previamente.

## **4.2 Variación en la expresión de las permeasas en plantas sobreexpresoras de CDFs**

Con el objetivo de profundizar en la caracterización funcional de los *CDFs* descritos, y comprobar si su efecto en la partición de aminoácidos es controlado a través de las permeasas AAP, se emplearon líneas sobreexpresoras para estudiar la expresión relativa (ExpRel) del mRNA de los genes *AAP2*, *AAP4* y *AAP6*; dada su mayor participación en el transporte de aminoácidos hasta el fruto y su carga en el floema, según indican datos preliminares de nuestro laboratorio.

El análisis llevado a cabo en muestras de hoja y fruto, como principal fuente y sumidero, respectivamente, de plantas sobreexpresoras de *CDF1*, permite observar medias de expresión relativa de las AAPs consistentemente superiores a las del testigo (Figura 4). No obstante, debido a la elevada variabilidad muestral, no aparecen diferencias significativas con la línea control.

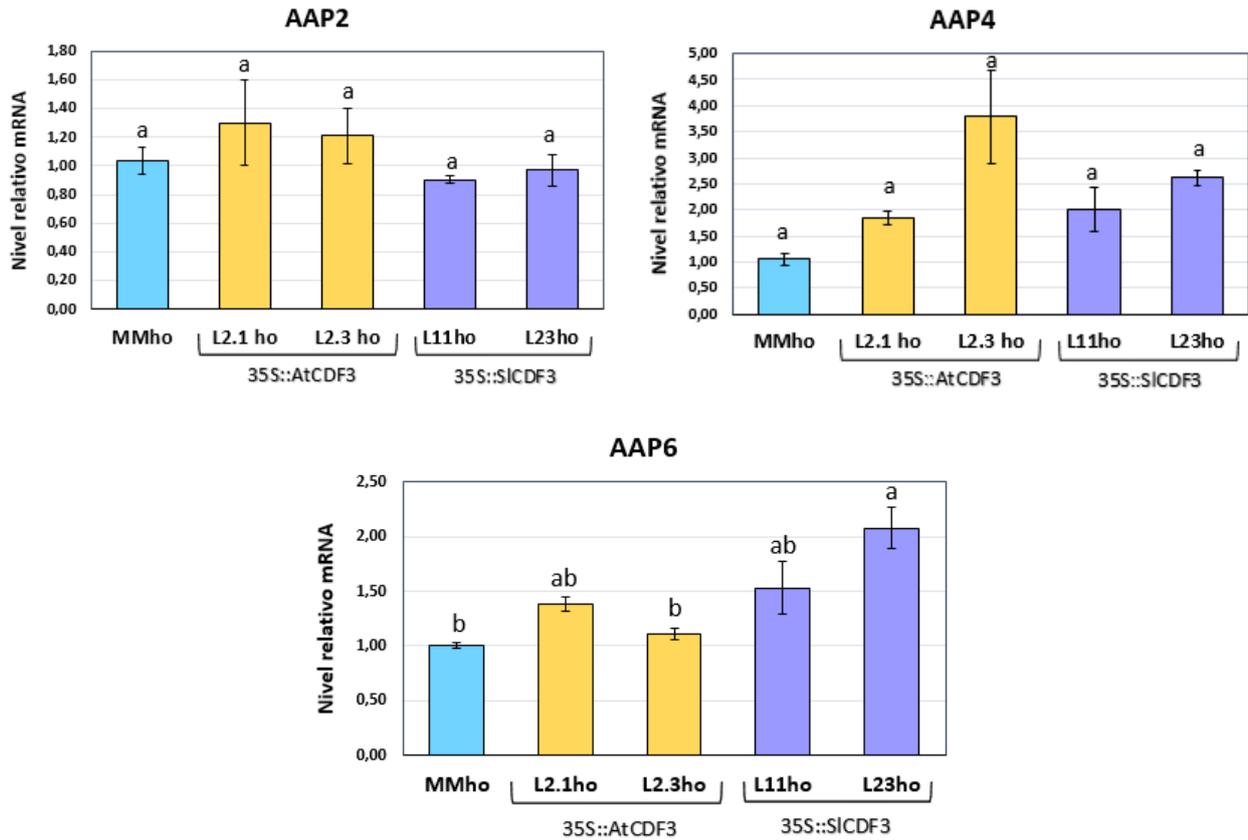


**Figura 4. Niveles de expresión relativa de las diferentes AAPs en hoja (ho) y fruto (fr) de plantas 35S::SICDF1 (líneas L5 y L11).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de plantas control de la variedad *Moneymaker*. Las barras representan el error medio  $\pm$  ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al estudiar el efecto global de la sobreexpresión del factor de transcripción *CDF1*, mediante un ANOVA multifactorial (Tabla S2 del ANEXO II), que considera el efecto transgén y el órgano analizado, se observa un incremento significativo en la expresión relativa de las AAPs, en las plantas transgénicas, con independencia del órgano que se estudie.

Con respecto al análisis llevado a cabo en las hojas fuente de las líneas sobreexpresoras de *CDF3*, observamos que, en algunas de las líneas sobreexpresoras, sí que existe una mayor expresión de la permeasa *AAP6*. La expresión de la permeasa *AAP4*, aunque muestra valores consistentemente superiores de expresión en las plantas transgénica, las diferencias no resultan significativas. Existe una gran variabilidad entre réplicas (Figura 5).

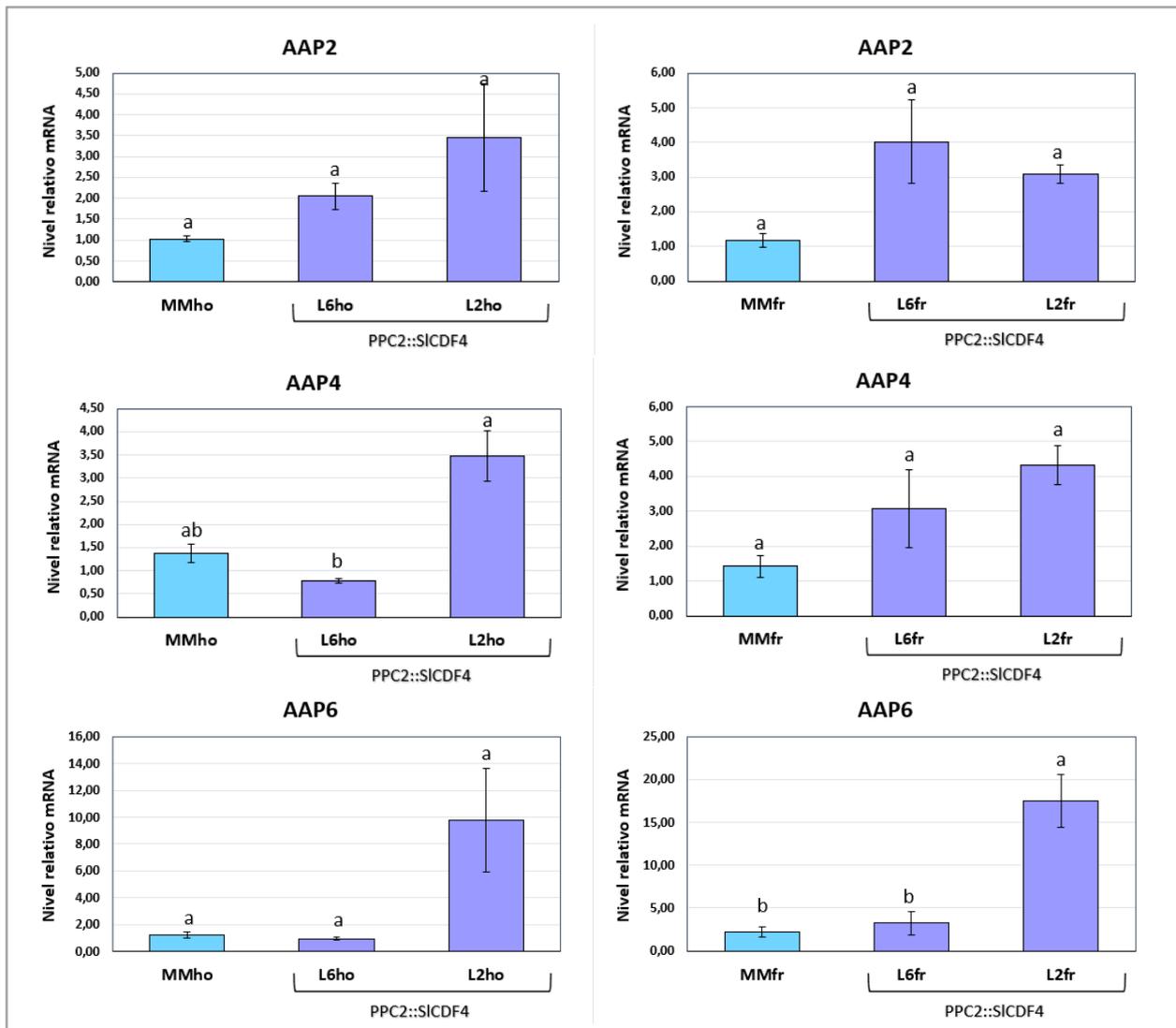


**Figura 5. Niveles de expresión relativa de las diferentes AAPs en hojas (ho) de plantas 35S::AtCDF3 (líneas L2.1 y L2.3) y 35S::SICDF3 (líneas L11 y L23).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de plantas control de la variedad *Moneymaker*. Las barras representan el error medio  $\pm$  ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La expresión relativa diferencial de la *AAP6* en genotipos *35S::SICDF3* (L11 y L23) sugiere que estas líneas presentan una capacidad superior a la del control en la carga de aminoácidos al floema a través de esta permeasa en las hojas, permitiendo así su posterior exportación. Este fenómeno también puede observarse en la línea L2.1, mediante la sobreexpresión del gen *AtCDF3*.

Con respecto al factor de transcripción *CDF4*, se puede observar una expresión relativa diferencial entre genotipos para la *AAP4* en hoja y para la *AAP6* en fruto. Los niveles de expresión para la *AAP2*, aunque con valores medios superiores de forma consistente, no presentan diferencias significativas con el control. Se observa, de nuevo, una gran variabilidad muestral.



**Figura 6. Niveles de expresión relativa de las diferentes AAPs en hoja (ho) y fruto (fr) de plantas *PPC2::SICDF4* (líneas L2.1 y L6.1).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de plantas control de la variedad *Monemaker*. Las barras representan el error medio  $\pm$  ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La mayor expresión de *AAP4* en hoja y de *AAP6* en fruto de plantas *PPC2::SICDF4* de la L2 (L2ho y L2fr), podría indicar que los frutos de esta línea, con una mayor fuerza de sumidero, presentan una mayor capacidad de descarga de aminoácidos del floema en fruto utilizando el transportador *AAP6*. Esta mayor fuerza de sumidero estaría correlacionada con una mayor carga del floema en hoja, a través de la *AAP4*. No obstante, dados los valores medios superiores y la gran variabilidad observada, no podemos descartar que las sobreexpresoras muestren también niveles de expresión alterados de la *AAP2*, que estén implicados en la mayor eficiencia exhibida por este genotipo. Tampoco podemos excluir que la variación de la expresión de *AAP6* en hoja o de *AAP4* en fruto, bajo el control directo o indirecto del factor *CDF4*, esté relacionada con la variación observada en producción.

Por otra parte, análogamente a lo observado para el factor de transcripción *CDF1*, un análisis factorial de la varianza, considerando el factor transgén y el órgano estudiado (tabla S3 del ANEXO II), señala que la sobreexpresión de *CDF4* conlleva una mayor expresión de las AAPs, con independencia del órgano analizado.

Si bien todos estos resultados, en su conjunto, sugieren que los *CDFs* regulan la partición de aminoácidos a través de las AAPs; para poder validar cuáles son los genotipos sobreexpresores cuya mayor producción (observada en la Figura 3) viene realmente dada por un incremento en las AAPs, mediado a su vez por los *CDFs*, se llevó a cabo un análisis de la correlación entre los parámetros de producción y expresión relativa de las AAPs en estudio (Tabla 3).

**Tabla 3. Valores de correlación (r) entre la producción de fruto y la expresión relativa de las permeasas AAP2, AAP4 y AAP6 en los cultivares de tomate sobreexpresores.**

GENOTIPO	$r_{\text{exp hoja-prod}}$	$r_{\text{exp fr-prod}}$
<b>Sobreexpresor CDF1</b>	0.89 P=0.0013	0.67 P=0.047
<b>Sobreexpresor CDF3</b>	0.55 P=0.032	----
<b>Sobreexpresor CDF4</b>	NS	NS

En plantas sobreexpresoras del gen *CDF1* (L5 y L11), se pudo observar la existencia de correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre la producción y la expresión relativa de las permeasas, tanto en hoja como en fruto.

Con respecto a las sobreexpresoras del gen *CDF3*, teniendo en cuenta que no se estudió la expresión relativa de las AAPs en fruto, únicamente se pudo evaluar la existencia de correlación entre la producción y la expresión relativa de las permeasas en hoja. Para este órgano, se pudo observar un valor estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de  $r = 0.55$ .

Ambos resultados positivos sugieren que, pese a no haber exhibido diferencias estadísticamente significativas frente al control debido al efecto muestral (Figuras 4 y 5), los factores *CDF1* y *CDF3* son potenciales dianas de mejora para incrementar la NUE. La existencia de correlación entre ambos parámetros refuerza el papel propuesto de las AAPs, en la carga de aminoácidos desde

las hojas fotosintéticas hasta el floema y su posterior translocación desde el floema hasta tejidos sumideros como el fruto, respaldando así su crecimiento y desarrollo.

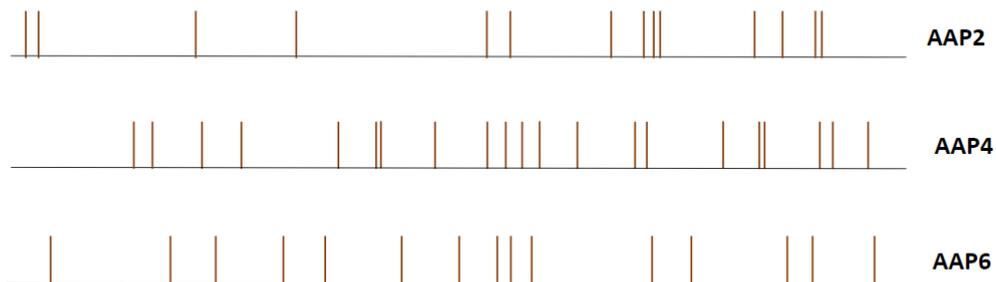
Sin embargo, en plantas sobreexpresoras *CDF4*, la correlación entre la producción y la expresión relativa de las permeasas *AAP2*, *AAP4* y *AAP6*, tanto para hoja como para fruto, no fue significativa ( $p > 0.05$ ). Este resultado se debe, fundamentalmente, a los bajos valores de expresión de las *AAPs* en una de las líneas. No obstante, hay que tener en cuenta que el rendimiento productivo incrementado en el genotipo sobreexpresor *PPC2::SICDF4* frente a la línea control (Figura 3) podría estar mediado por la acción del *CDF4* sobre otras permeasas de la subfamilia *AAP*, o bien por su influencia sobre otras subfamilias previamente mencionadas como la *UMAMIT*; dado que también está implicada en el crecimiento y desarrollo del fruto. Sin embargo, cabe destacar que, en estas líneas, el gen *CDF4* únicamente se expresa en el fruto, por lo que posiblemente no ejerce control sobre la cantidad de aminoácidos exportados desde las fuentes. También se puede hipotetizar que el transporte de aminoácidos hasta el fruto, mediante el floema, esté indirectamente modulado a través del flujo de carbohidratos; y por lo tanto, por los transportadores asociados a los azúcares.

Estudios en otras especies han demostrado que la alteración de las permeasas de aminoácidos (*AAPs*) es crucial para mejorar la producción de fruto y semillas. Concretamente, en el estudio de Zhang et al. (2015) se introdujeron copias adicionales del gen de la permeasa de aminoácidos *PsAAP1* en el genoma del guisante (*Pisum sativum* L.), dirigiendo su expresión tanto a los complejos de elementos cribosos y células acompañantes del floema de la hoja, como a la epidermis de los cotiledones de las semillas. Esta manipulación genética resultó en un aumento significativo en la carga de aminoácidos en el floema, lo que mejoró el transporte de nitrógeno a larga distancia y favoreció el desarrollo de los sumideros reproductivos, como los frutos y semillas. Además, se observó una acumulación aumentada de proteínas en las semillas, lo que indica una mejora en la calidad nutricional. Los análisis adicionales de tejidos de raíces y hojas revelaron que esta manipulación genética también afectó positivamente la absorción de nitrógeno desde las raíces y el metabolismo en las hojas, lo que contribuyó a una mayor disponibilidad de nitrógeno para la planta en general.

Con todo ello, los hallazgos que ha aportado este estudio confirman el papel fundamental de las *AAPs* en la partición eficiente de nitrógeno en tomate y reinciden en la importancia de su regulación, posiblemente mediada por los *CDFs*, para mejorar la producción de biomasa en los cultivos agrícolas.

### 4.3 Búsqueda de dominios de unión Dof en la región promotora de las permeasas

Con el fin de reforzar las hipótesis sobre el papel regulador de los factores de transcripción *CDFs*, se ha llevado a cabo una búsqueda de dominios de unión específicos DOF, 5'- (T/A)AAAG- 3', en los promotores de los genes *AAP2*, *AAP4* y *AAP6* del tomate. En la región correspondiente a tres mil pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de transcripción, se han hallado un total de 14, 21 y 15 sitios específicos, respectivamente; indicando que los *CDFs* podrían modular directamente estas permeasas (Figura 7).



**Figura 7. Análisis de la región promotora de los genes *AAP2*, *AAP4* y *AAP6* para la identificación de elementos de unión específicos para factores de transcripción DOF.**

La localización específica de los dominios de unión DOF dentro de la secuencia promotora de los genes *AAPs* se muestra en las figuras S1, S2 y S3 del ANEXO III.

A la vista de estos últimos resultados, y tras haber alcanzado los objetivos parciales de este estudio, se ha comprobado que los factores de transcripción *CDF* constituyen dianas de mejora agrícola prometedoras, gracias a su potencial papel regulador en la partición de N mediante el control directo de las permeasas *AAP* en tomate.

## 5. Conclusiones

1. Los resultados de este estudio confirman el efecto de la sobreexpresión de los factores *CDF* sobre la mayor producción de fruto.
2. Se observa un efecto general de incremento en la expresión de las permeasas en plantas sobreexpresoras, si bien este efecto varía con el transgén y la permeasa considerada, tanto en hoja como en fruto.
3. La existencia de correlación significativa entre la producción y expresión relativa de las permeasas en plantas sobreexpresoras de *CDF1* y *CDF3*, apoya el papel de las *AAPs* estudiadas como transportadores de aminoácidos implicados en la carga y descarga de nitrógeno, tanto en órganos fuente como en los sumideros.
4. El hallazgo de sitios de unión específicos de los *CDFs* en la región promotora de las *AAPs* sugiere que pueden ser dianas directas de estos factores de transcripción.

## 6. Referencias bibliográficas

- ABENAVOLI, M. R., LONGO, C., LUPINI, A., MILLER, A. J., ARANITI, F., MERCATI, F., PRINCI, M. P., & SUNSERI, F. (2016). Phenotyping two tomato genotypes with different nitrogen use efficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.021>
- ALBORNOZ, F., GEBAUER, M., PONCE, C., & CABEZA, R. A. (2018). LeNRT1.1 improves nitrate uptake in grafted tomato plants under high nitrogen demand. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123921>
- ALUKO, O. O., KANT, S., ADEDIRE, O. M., LI, C., YUAN, G., LIU, H., & WANG, Q. (2023). Unlocking the potentials of nitrate transporters at improving plant nitrogen use efficiency. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1074839>
- ALZHRANI, F. O. (2021). Genome wide analysis of amino acid transporter superfamily in solanum lycopersicum. *Plants*, 10(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants10020289>
- BESNARD, J., ZHAO, C., AVICE, J. C., VITHA, S., HYODO, A., PILOT, G., & OKUMOTO, S. (2018). Arabidopsis UMAMIT24 and 25 are amino acid exporters involved in seed loading. *Journal of Experimental Botany*, 69(21), 5221–5232. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery302>
- CHEN, L. S., & BUSH, D. R. (1997). LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 115(3), 1127–1134. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.1127>
- COHEN, I., HALPERN, M., YERMIYAHU, U., BAR-TAL, A., GENDLER, T., & RACHMILEVITCH, S. (2019). CO<sub>2</sub> and nitrogen interaction alters root anatomy, morphology, nitrogen partitioning and photosynthetic acclimation of tomato plants. *Planta*, 250(5), 1423–1432. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03232>
- DELLERO, Y. (2020). Manipulating Amino Acid Metabolism to Improve Crop Nitrogen Use Efficiency for a Sustainable Agriculture. In *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.602548>
- FAN, X., NAZ, M., FAN, X., XUAN, W., MILLER, A. J., & XU, G. (2017). Plant nitrate transporters: from gene function to application. *Journal of experimental botany*, 68(10), 2463–2475. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx011>
- FAN, X., TANG, Z., TAN, Y., ZHANG, Y., LUO, B., YANG, M., LIAN, X., SHEN, Q., MILLER, A. J., & XU, G. (2016). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(26), 7118–7123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525184113>

- FANG, Z., BAI, G., HUANG, W., WANG, Z., WANG, X., & ZHANG, M. (2017). The rice peptide transporter OsNPF7.3 is induced by organic nitrogen, and contributes to nitrogen allocation and grain yield. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01338>
- FAO. 2022. Agricultural production statistics 2000–2021. *FAOSTAT analytical briefs*, Nº 60. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3751en>
- FIGUEROA, J., CARRILLO, L., RENAU-MORATA, B., YANG, L., MOLINA, R. V., MARINO, D., CANALES, J., WEIH, M., VICENTE-CARBAJOSA, J., NEBAUER, S. G., & MEDINA, J. (2020). The Arabidopsis Transcription Factor CDF3 Is Involved in Nitrogen Responses and Improves Nitrogen Use Efficiency in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601558>
- FORNARA, F., DE MONTAIGU, A., SÁNCHEZ-VILLARREAL, A., TAKAHASHI, Y., VER LOREN VAN THEMAAT, E., HUETTEL, B., DAVIS, S. J., & COUPLAND, G. (2015). The GI-CDF module of Arabidopsis affects freezing tolerance and growth as well as flowering. *The Plant Journal*, 81(5), 695–706. <https://doi.org/10.1111/tpj.12759>
- FORNARA, F., PANIGRAHI, K. C., GISSOT, L., SAUERBRUNN, N., RÜHL, M., JARILLO, J. A., & COUPLAND, G. (2009). Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental cell*, 17(1), 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.015>
- FRAITURE, C., & WICHELNS, D. (2010). Satisfying future water demands for agriculture. *Agricultural Water Management*, 97(4), 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.08.008>
- GALLOWAY, J. N., ABER, J. D., ERISMAN, J. W., SEITZINGER, S. P., HOWARTH, R. W., COWLING, E. B., COSBY, B. J. (2003). The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4), 341–356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- GANAIE, M. M., RESHI, Z. A., VERMA, V., & RAJA, V. (2018). Family Solanaceae: Taxonomy and modern trends. *Annals of Plant Sciences*, 7(9), 2403. <https://doi.org/10.21746/aps.2018.7.9.1>
- GAO, Y., & SERRENHO, A. C. (2023). Greenhouse gas emissions from nitrogen fertilizers could be reduced by up to one-fifth of current levels by 2050 with combined interventions. *Nat Food* 4, 170–178. <https://doi.org/10.1038/s43016-023-00698-w>
- GAUTAM, T., DUTTA, M., JAISWAL, V., ZINTA, G., GAHLAUT, V., & KUMAR, S. (2022). Emerging Roles of SWEET Sugar Transporters in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Cells*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cells11081303>

- GIOVANNUCCI, E. (1999). Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature. <https://academic.oup.com/jnci/article/91/4/317/2543924>
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A. I., SCALSCHI, L., GARCÍA-AGUSTÍN, P., & CAMAÑES, G. (2020). Tomato root development and N assimilation depend on C and ABA content under different N sources. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.031>
- GOOD, A.G., & BEATTY, P.H. (2011) Fertilizing Nature: A Tragedy of Excess in the Commons. *PLOS Biology* 9(8): e1001124. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001124>
- GRALLATH, S., WEIMAR, T., MEYER, A., GUMY, C., SUTER-GROTEMEYER, M., NEUHAUS, J. M., & RENTSCH, D. (2005). The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiology*, 137(1), 117-126. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055079>
- HAMMES, U. Z., NIELSEN, E., HONAAS, L. A., TAYLOR, C. G., & SCHACHTMAN, D. P. (2006). AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in Arabidopsis [Article]. *Plant Journal*, 48(3), 414-426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02880.x>
- HAVÉ, M., MARMAGNE, A., CHARDON, F., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. (2017). Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from Arabidopsis to crops. *In Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2513–2529. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw365>
- HIGASHI, K., SHIOTA, H., & KAMADA, H. (1998). Patterns of expression of the genes for glutamine synthetase isoforms during somatic and zygotic embryogenesis in carrot. *Plant and Cell Physiology*, 39(4), 418–424. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029385>
- HIRNER, A., LADWIG, F., STRANSKY, H., OKUMOTO, S., KEINATH, M., HARMS, A., FROMMER, W. B., & KOCH, W. (2006). Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell*, 18(8), 1931–1946. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041012>
- HOAGLAND, D. R., & ARNON, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California agricultural experiment station*, Circular 347.
- HOFFMAN, N. E., KO, K., MILKOWSKI, D., & PICHERSKY, E. (1991). Isolation and characterization of tomato cDNA and genomic clones encoding the ubiquitin gene ubi3. *Plant Molecular Biology*, 17(6), 1189-1201. <https://doi.org/10.1007/bf00028735>

- HUNT, E., GATTOLIN, S., NEWBURY, H. J., BALE, J. S., TSENG, H. M., BARRETT, D. A., & PRITCHARD, J. (2010). A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 55–64. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp274>
- IQBAL, A., QIANG, D., ALAMZEB, M., XIANGRU, W., HUIPING, G., HENGHENG, Z., NIANCHANG, P., XILING, Z., & MEIZHEN, S. (2020). Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(3), 904-914. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10085>
- JAVED, T., INDU, I., SINGHAL, R. K., SHABBIR, R., SHAH, A. N., KUMAR, P., JINGER, D., DHARMAPPA, P. M., SHAD, M. A., SAHA, D., ANURAGI, H., ADAMSKI, R., & SIUTA, D. (2022). Recent Advances in Agronomic and Physio-Molecular Approaches for Improving Nitrogen Use Efficiency in Crop Plants. *In Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.877544>
- KANT, S. (2018). Understanding nitrate uptake, signaling and remobilisation for improving plant nitrogen use efficiency. *In Seminars in Cell and Developmental Biology* 74, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.034>
- KANT, S., BI, Y. M., & ROTHSTEIN, S. J. (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *In Journal of Experimental Botany* 62(4), 1499–1509. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq297>
- KIMURA, S., SINHA, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. *CSH protocols*, 2008, pdb.emo105. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105>
- KRAPP, A., SALIBA-COLOMBANI, V. & DANIEL-VEDELE, F. (2005). Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. *Photosynthesis Research* 83, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-3196-7>
- LAWLOR, D. W. (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 773–787. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.773>
- LI, J. Y., FU, Y. L., PIKE, S. M., BAO, J., TIAN, W., ZHANG, Y., CHEN, C. Z., ZHANG, Y., LI, H. M., HUANG, J., LI, L. G., SCHROEDER, J. I., GASSMANN, W., & GONG, J. M. (2010). The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell*, 22(5), 1633–1646. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075242>

- LIU, X. Y., KOKA, K., MAKABE, A., & LIU, C. Q. (2014). Nitrate dynamics in natural plants: Insights based on the concentration and natural isotope abundances of tissue nitrate. *Frontiers in plant science*, 5, 355. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00355>
- LIU, X., HU, B., & CHU, C. (2022). Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects. *Journal of genetics and genomics*, 49(5), 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.12.006>
- LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LØVDAL, T., & LILLO, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.024>
- LU, C. & TIAN, H. (2017). Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth System Science Data*, 9, 181–192, <https://doi.org/10.5194/essd-9-181-2017>, 2017.
- MARSCHNER H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. *London: Academic Press*, 889 pp.
- MARTIN, T., OSWALD, O., & GRAHAM, I. A. (2002). Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiology*, 128(2), 472–481. <https://doi.org/10.1104/pp.010475>
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C., DANIEL-VEDELE, F., DECHORGNAT, J., CHARDON, F., GAUFICHON, L., & SUZUKI, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *In Annals of Botany*, 105(7), 1141–1157. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq028>
- MOLL, R.H., KAMPRATH, E.J. AND JACKSON, W.A. (1982). Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization1. *Agronomy Journal*, 74, 562-564. <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400030037x>
- OKUMOTO, S., & PILOT, G. (2011). Amino Acid Export in Plants: A Missing Link in Nitrogen Cycling. *Molecular Plant*, 4(3), 453-463. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr003>
- OKUMOTO, S., SCHMIDT, R., TEGEDER, M., FISCHER, W. N., RENTSCH, D., FROMMER, W. B., & KOCH, W. (2002). High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and

developing seeds of Arabidopsis [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45338-45346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207730200>

OLAIYA, C. O., OGUNYEMI, O., & KARIGIDI, K. (2015). Biotechnological strategies for enhancing the nutritive and nutraceutical values of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Annals of the University Dunarea De Jos of Galati, Fascicle VI-Food Technology*, 39(2), 9-19.

ORTIZ-LOPEZ, A., CHANG, H. C., & BUSH, D. R. (2000). Amino acid transporters in plants (2000). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 275-80. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00144-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00144-9)

PERCHLIK, M., & TEGEDER, M. (2017). Improving plant nitrogen use efficiency through alteration of amino acid transport processes. *Plant Physiology*, 175(1), 235–247. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00608>

PERCHLIK, M., & TEGEDER, M. (2018). Leaf amino acid supply affects photosynthetic and plant nitrogen use efficiency under nitrogen stress. *Plant Physiology*, 178(1), 174–188. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00597>

RAO, A. V, WASEEM, Z., & AGARWAL, S. (1999). Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*, 31, 737-741. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00053-8)

RENAU-MORATA, B., CARRILLO, L., DOMINGUEZ-FIGUEROA, J., VICENTE-CARBAJOSA, J., MOLINA, R. V., NEBAUER, S. G., MEDINA, J., & DOERNER, P. (2020). CDF transcription factors: Plant regulators to deal with extreme environmental conditions. *In Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3803–3815. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa088>

RENAU-MORATA, B.; MOLINA, R.V.; CARRILLO, L.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; SÁNCHEZ-PERALES, M.; POLLMANN, S.; DOMÍNGUEZ-FIGUEROA, J.; CORRALES, A.R.; FLEXAS, J.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; ET AL. (2017). Ectopic Expression of CDF3 Genes in Tomato Enhances Biomass Production and Yield under Salinity Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 660. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00660>

SU, Y. H., FROMMER, W. B., & LUDEWIG, U. (2004). Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136(2), 3104–3113. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045278>

TEGEDER, M. (2012). Transporters for amino acids in plant cells: Some functions and many unknowns. *In Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.02.001>

TEGEDER, M., & RENTSCH, D. (2010). Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides [Review]. *Molecular Plant*, 3(6), 997-1011. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq047>

UNITED NATIONS, 2024. Objetivos y Metas de Desarrollo Sostenible, visto el 18 de febrero de 2024 <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

VAN BUEREN, E. T. L., & STRUIK, P. C. (2017). Diverse concepts of breeding for nitrogen use efficiency. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(50). <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0457-3>

WARD, M. H., JONES, R. R., BRENDER, J. D., DE KOK, T. M., WEYER, P. J., NOLAN, B. T., VILLANUEVA, C. M., & VAN BREDA, S. G. (2018). Drinking water nitrate and human health: An updated review. *In International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph15071557>

YAO, X., NIE, J., BAI, R., & SUI, X. (2020). Amino acid transporters in plants: Identification and function. *In Plants*, 9(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9080972>

ZHANG, L., GARNEAU, M. G., MAJUMDAR, R., GRANT, J., & TEGEDER, M. (2015). Improvement of pea biomass and seed productivity by simultaneous increase of phloem and embryo loading with amino acids. *The Plant Journal*, 81(1), 134–146. <https://doi.org/10.1111/tpj.12716>

ZHAO, C., PRATELLI, R., YU, S., SHELLEY, B., COLLAKOVA, E., & PILOT, G. (2021). Detailed characterization of the UMAMIT proteins provides insight into their evolution, amino acid transport properties, and role in the plant. *Journal of Experimental Botany*, 72(18), 6400-6417. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab288>

## 7. Anexos

### 7.1 ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Tabla S1: Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.				X
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.		X		
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.	X			
ODS 13. Acción por el clima.			X	
ODS 14. Vida submarina.		X		
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Como se ha aludido previamente, la creciente demanda y utilización de fertilizantes nitrogenados conlleva una serie de repercusiones medioambientales adversas. Aproximadamente el 60-70% de estos fertilizantes se extravían en el entorno, dando lugar a problemáticas como la contaminación, el calentamiento global y la pérdida de biodiversidad (Kant, 2018; Mohanty et al., 2020).

El empleo de fertilizantes nitrogenados ha experimentado un incremento de más de ocho veces desde 1961, alcanzando un uso anual de aproximadamente 108 millones de toneladas para la

producción agrícola a nivel global en 2013 (Lu et al., 2017). Lamentablemente, la eficiencia en la utilización de estos fertilizantes nitrogenados es insatisfactoria, con un promedio de absorción de menos del 40% del nitrógeno aplicado en cereales como trigo, maíz, arroz, cebada y sorgo (Kant et al., 2012). El nitrógeno remanente se pierde en el entorno, involucrando procesos tales como volatilización gaseosa, lixiviación, escorrentía superficial y consumo microbiano (Good et al., 2011). Por ende, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados tiene un impacto adverso al aumentar los costos de producción de cultivos y contribuir a la contaminación ambiental. En consecuencia, el desarrollo de cultivares con un rendimiento satisfactorio en condiciones de limitada disponibilidad de nitrógeno no solo conlleva beneficios económicos, sino que también representa una contribución ambientalmente sostenible para la sociedad.

En este contexto, mejorar la Eficiencia en el Uso del Nitrógeno (NUE) se convierte en una necesidad imperativa para mitigar los impactos ambientales asociados con la producción de cultivos, minimizando la dependencia de fertilizantes químicos. Todo esto pretende evitar la contaminación ambiental y del agua, además de los daños tanto a la vida terrestre como submarina. Para ello, se plantean estrategias biotecnológicas de mejora agrícola lideradas por el cultivo de tomate, dado su especial valor como cultivo ampliamente consumido y modelo de fruto carnoso (Olaiya et al., 2015).

Este trabajo presenta un alto grado de relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (UNITED NATIONS, 2024), en especial con el 12 y 15, por su contribución a la sostenibilidad ambiental y al uso eficiente de recursos agrícolas. El ODS 12, "Producción y consumo responsables", se enfoca en la gestión sostenible de recursos y productos químicos. Por lo que, siguiendo esta línea, el presente proyecto aborda directamente la problemática del uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en la agricultura, proponiendo estrategias para reducir la dependencia de estos insumos sin comprometer la producción vegetal óptima. Al disminuir la cantidad de fertilizantes necesarios en la producción agrícola, se alinea con la meta 12.2 'Lograr el uso eficiente de recursos naturales' y con la meta 12.4, que busca gestionar ecológicamente los productos químicos y reducir su liberación al medio ambiente.

En cuanto a la relación con el ODS 15, "Vida de ecosistemas terrestres", existe una contribución a la meta 15.1 de este objetivo, centrada en la conservación y uso sostenible de ecosistemas terrestres, incluidos los bosques y las zonas áridas. Al comprender los mecanismos de transporte y partición de nitrógeno en plantas, se busca optimizar la Eficiencia en el Uso de Nitrógeno (NUE) para reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados; por lo que este estudio contribuye a la gestión sostenible de los recursos en ecosistemas terrestres agrícolas. Además, al disminuir la degradación y contaminación,

tanto del suelo como del agua por el uso excesivo de fertilizantes, se favorece la preservación de la calidad del terreno y su biodiversidad asociada, aspectos fundamentales de la meta 15.5.

Con respecto al ODS 14, "Vida submarina", el trabajo se relaciona con la prevención y reducción de la contaminación marina originada por actividades agrícolas, ayudando así a conservar la vida de los ecosistemas acuáticos. La disminución de la aplicación de fertilizantes nitrogenados, a través de la mejora en la NUE, contribuye a prevenir la eutrofización, por la escorrentía de nutrientes como el nitrógeno, y sus efectos adversos en los ecosistemas marinos. Este enfoque se alinea con la meta 14.1, que busca prevenir y reducir la contaminación marina de todo tipo, en particular la producida por actividades realizadas en tierra.

En relación con el ODS 6, "Agua limpia y saneamiento", el proyecto contribuye al manejo sostenible del agua ofreciendo estrategias para minimizar la necesidad de fertilizantes nitrogenados, que a menudo están asociados con la contaminación del agua. Al reducir el uso de estos fertilizantes, se disminuye la contaminación del suelo y del agua con productos químicos, un aspecto crucial para prevenir efectos negativos en la salud, como el posible desarrollo de cáncer o determinadas patologías en fetos de mujeres embarazadas, debido al agua de consumo alterada (Ward et al., 2018). Este enfoque promueve un uso más sostenible del agua y se alinea con las metas 6.3 'Mejorar la calidad de agua. Reducir la contaminación y aguas residuales' y 6.6 'Protección de los ecosistemas relacionados con el agua'.

Finalmente, en cuanto al ODS 13, "Acción por el clima", al optimizar la Eficiencia en el Uso de Nitrógeno y reducir la aplicación de fertilizantes, se aborda indirectamente la emisión del 5% de gases de efecto invernadero asociados con la producción y aplicación de estos insumos agrícolas (Gao et al., 2023). Esta estrategia contribuye, por ende, a la mitigación del cambio climático, siendo coherente con las expectativas de la meta 13.1 'Fortalecimiento de la resiliencia y la capacidad de adaptación' de los cultivos frente a los impactos relacionados con el clima; así como de la meta 13.2, orientada a la integración de medidas relativas al cambio climático en las políticas, estrategias y planes nacionales.

## 7.2 ANEXO II. ANOVA múltiple de los niveles de expresión de las AAP2, AAP4 y AAP6 en las distintas sobreexpresoras CDFs

Tabla S2: Análisis de Varianza para ExpRel AAPs en CDF1

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Transgén</b>	8619,21	1	8619,21	4,25	0,0445
<b>B: Órgano</b>	653,323	1	653,323	0,32	0,5728
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	620,607	1	620,607	0,31	0,5826
<b>RESIDUOS</b>	101389,	50	2027,77		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	111919,	53			

Tabla S3: Análisis de Varianza para ExpRel AAPs en CDF4

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A:Transgén</b>	150,283	1	150,283	4,28	0,0425
<b>B: Órgano</b>	40,8207	1	40,8207	1,16	0,2849
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	23,0484	1	23,0484	0,66	0,4208
<b>RESIDUOS</b>	2353,48	67	35,1266		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	2600,26	70			

### 7.3 ANEXO III. Sitios de unión específicos de factores CDFs en las secuencias promotoras de los genes AAPs estudiados

```

>SL2.50ch06:38036821..38033822
ATCTACACATAATGCCTTAGATAGATCATGAGGTAAT TAAAG GTTAAATTCTCTATTTTAATTTTACAACATT
TTCTAGAACTTTGGTAAAAT TAAAG GTTAGAAATGGGATACTAATTGTCCCTCCATGAATGGAAATTTATCAT
TTTTGTTTTTCACTAAGAAGGGAAAAATGGTATAGGATTAATTAATACTTTTACATTATTCTTAAGACTATAT
TCTAACATGTTTGGACTGGTGCAATTGATTGGTGCGTTCATTAGCAACGTACAAATAATTATACTCTATAATTG
GTCTCAATTATTTATAATGGGAATCAAATAAGACATAATTCAATAGAACTTATTCTCTCCTTCAATTACAATG
GATGAGACTTATCGATATATGAACCTTATTCTCGAGTTCGAGTCTTGGTGAAATTGAGAATGAGAAAAATAAT
TCGCTTTGAAGCGCCATTTTAAAAATCAATCTTGCAATATGTGAATTCAGATTTAATCGTATTTAATATGAG
TATCAGATATAAGATGAAAATTAAAAAAATTTGGATGAGAATTGGAGAAATGCAAATGAAGAATTTTATATT
CAGCTTTTGATCTAAAGTTCTCATT TAAAG GAGAGAATTTTTAAATATATATTATAATTTTCAATTGCTTTT
CTACTACTATAAAAAATGTTAGTTCATTGCTCCAATTGAGCCACACAACTCATCAAACACTTAATTATATTGTC
CTTCTTCTATTTTCAATTTTATACATATTTGTATAAGGAATTATTTGAATTCATTTGCTTCTCAATTTGGGAAG
CTATAACAATGACGGTACGTAAGAAAATATTTTTCTTTTAAAAATAAAAAATTTGTTTGGCCCTCTTTTGTTT
CTCAAAGCTTAGTTTATTTGGCTTCTCATGTTACGCAATATATTTCAATTTGAAACAATTTATTTCTAAAATTC
TTTCTATTCCAT TAAAG TAAAAATACGATAGACAAATAGTATGTTCTATTCAAACCTTTATTGGTGAGAGTACA
TGAATGTGTTATAATTAATTTATTTCTACTAGAAGTTACTAGTTTGTTCGACCCCTTATTTTTGGTTCAAG
TTAGTTACACTAGTCAAACATATATGTATTGCGATTATCTGTTGACCCAAAAAATTAGAAAAAAAATACTA
GTGATTATCTTTTCCACTTAACGAAATAATTATTGGGTTTCCACATGCATGATTCTTCAACCTTATTATGTT
AAATTGTTAATTTATTAGGTTAGAAACCAAACCAACAAAGCGTATCCACAATTAACACGTGGCAGTCGTTTGG
TTGGAAGTAAATATTCTATGTATATTTAAATTTGCATTATTAATATCATGTTTAG TAAAG TTTTTAATTTATT
TGAAATAAAAATTCATATATACTAGATACAATATTTGATTATCATTTTACTTATCTATATAAATAAAAA AAAA
GTATAAATAGATATCTTATTTTATTCAAATATAATATATTGCATAACTAAACTTTGTATAACTAAGTCATAC
ATATATAATTATATATTATTACATAGCTAATATATTTTTGGGTGCCACAAATATAACAAGTGAACGAAAATTT
TCACTTTTATGACCATGATATTATAATTGTGGGATATAATTTTACTTTTGAACCTACCAAGAGATATTTATTG
ATAGTGAAAGAGGTGAAAGTTAGGGGAAAACAGGCCAGAGTAGGGAAAAACTTTATGCCATGATTCTGTGCTA
GAGAATAAATACTTACGTGCACATGAAATATATATTAATTTATTAATAGTTCATCATATATGTCTTTTAAATA
TATTTATTAGTAATATTTAGATTAATAGCTATCAGTTTAGTATAGTTTATGACTTTATGTGGGCAACAAATTT
TAAAG ATTTCTCTTTTTTTTTTTCAGAGAAAATAAGGTAGAAATTTACAATAAAAACTTACTGATATTTATGTT
AAGTCAATCATATATATTTTTTCAATTTTCTTAATTTATGATAAATTTATTTGACGTGATATAAATTTATTTG
ATAATTTGATTTAAAAACAAAA TAAAG GACAATAA AAAAG GAAAAG GGAAATGATATTTAGTGGTCCCAAAT
GAGTCAACCTAACTGAAGTGGGTGCAAACATTTTCTGACTTTAAATGTTGACTAACGCGTCTCCTGTGTTTT
CTTTTTTCTTTTTTAAATTTTAAATTTACCGTGGCTTACCTCTATAATAATAATAATAAATAGTTTTTTTTTAA
TTGTATTCTTTTTATTTTTTATACTCCAATTTGTATGATCGAAAAATCATATACAAAAGATTTTATTCAATTT
TCTTTAAATATTTTTAACTTTCCAAATCAGTCTTTGTGCGCTCACAAAATTTAATTTTTTTTCGAAATAAGTT
CATATATAACTTAATAAATTTAAATATTCAATTTCTTACGACGAAAGCACAATAATAAGCCATTTATTTTAGT
TTATAAGAATTAATAGATATTTTTTCTTGAATAAACATGGGAAATATGATATATTTTTTGTCTATTTTATT
TTATTAATAAATAAAAAAATTAATATTAATTTACTCCTTTTCGTTTCA AAAAG AATAATCTAATTTAACTTG
GAACGGAGTTTAAAGTTATGTCAGATATACCAAATATCCTTAAATTTTGTGGTTTTAAACATGTCAAGTTAA
AATATTTTTTTCATTCTTTTTGAAACACAATA AAAAG AAAATAGTATCATTCTTTTTAAAAGAGAATA AAAAG
AAAATAGTATCATTCTTTTTTAACTAA TAAAG TAATAATTATAATAGCATGACATTATTTCAAACCTGAAATGAA
AATGTGTACCTAAAATAAATAAATTAATTTATTGAAATTTACCCCAATAATAGAGGCTACGGCTTGCTTCCCC
ACTTGGTCTGGAAAGTTGTGGAACGCGCGTGTGAACAGAGCACTGGCTGCCTATATATAAGCCCATTGCTG
CATGTCT

```

**Figura S1:** Localización de los sitios de unión específicos de factores CDFs en la secuencia promotora del gen AAP2. La región mostrada corresponde a tres mil pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de transcripción del gen. En azul se indican los dominios 5'–TAAAG–3', mientras que en amarillo se resaltan los dominios 5'–AAAAG–3'.

```

>SL2.50ch04:62013870..62016869
TATATAGAAAGATAGAATGTTAGTGCCACGATACTTCAACATTACGTTATAATTTAACTTTTAAATATATATAT
ATAATATACGTACATATCCATATATTTTATGGATAAGAATTAGTATAATTTTAAACCATACATCCACACAGAGA
AATAATGAAGCCCATGGTGGTTGAAGTTCAGGTTTCCCTCCATAGGGATGCAAGTTTGAATCCTGCCACAAC
AATAAATATTTAAATTTAGCTATAAATTTTATTGCTAATGTTACTATATATTTTCAATTTATGGCTAACAAAGAA
TCATCACGAACTAATTGTTAAATAGAATTAACGATAAAAATTTAGTGTTTAATTATAAAAATATTTTCAAGGCACTA
AATTCATTTTTATATAAAAAAAAGTAGTGCGGTGAGTTCATTTAAAATTTTAAAATTTATCTTTGGATGCTAGAT
TCATTGTTAAAAATATATTGTAAAGTTGAAGCTATCTAAATTAGAATCTTAGACATCGATCTCTACTAATTAA
GTACAATCTTAACTATACTAAATAGAGATGAATCTTTTGCAGAATCTTGATGTTGATAAAATAGTTAGCTTTT
TCTATGAATATTAACACAACCTTCTTAAATGTTACATTCATTAATGTTTAAAAGTAACGTGACATATTTGAAC
TTTCAAATTTTGAATTCGACTATATATATATATATATTACATAACTTTAATTATACGAGCATTATCTAAGCTAT
CATTACATCATTGTA AACATTTACTCTATTTTGCACAATATCGATAAATAAAAAAGGACACTATCTTTTTTT
TTAATTA AAAATAAAAATAAAAATAAATTCAAAGTTGTCAAAGCATGTATAATATACATTGGAGGTAGTAAAA
TTTTACTCTATTTTGCATTTTCTCAAACCAAATGAGTAAAAATGTTTGAATATTTATTTTTTTGGGTTAAA
AAAAATGTTGAACCTTACTA ACTTAAATAGCATCAAAGCTAATAATTTATGTTATGACTAAGCATTCCATT
CGCTTTCCTAATATTCTTAAATTTTGAATATTTGGACTTAAAAGTTAGCATTCTTCAAAGCAATCAATCATT
GGAATAAAATGATTAAGAGTATCAAATAATTCCTAATTTGTGGTGTATTATAACTTGTCTAACTAGCATATTA
ATTTCAAGTCTCAAATTA AACTTCTCACTCTACTTTTACAAAAGGATAAATGTAAGAAAAGACAAGATTATAAAT
CGTATATTCTGCTTATGAATCGTTTGTAAATAAAAATTAATCTTAGATGTAGAAGTGGAAAGTTAATTAATTAT
AGAGTAGATAGATACCTATATATCAAGCTAGAAAAATTTCTTTCATTTTTGCTTCTATTTTTTTTTTTTTGGT
CAAAACACCAATCAATTGAACTAATTAATAAGTAAAGGAATCTAAAACCTTAGTCAAGTCTGTTTATAAAC
TAAAACTTTTTGAAGGTTTATCAATATTCTTTTGTTCCAAATCTTGTAACGTGTTAATATTCATTTTA
GTGCTAATTTATGATAAGTTGGAACATGCCACTCAAAAATGAAAATCTCAAATTAAAGGTTTCATCTTTAT
CTAGTTGTGCATGAACCATAAACTACCTTTTGTGCAAGAAAAAGGAGAGTCCATCTTGGAGGGCCAATATTTTT
TTCCCACAATTAGCGCAAAAAAGGTTTAGCTAAAAAATAAATAATTTTTCTCCATATTCAGTAAGTACTC
CATAACAAAAAGAAGAATTTATTTTTCCCATCTTCACCCTAAAATTTTGTATATACTCATAAAGTTTACATG
TGCAACTGATATACTAATGGTGATGGAAGCTAGTCATGTCATGAACAATTTAGGTATGTATTGATAGCATA
CAAACAATACCCTTCTAGGCATGTATATGGATAGATTCACTATTTTAGCAACGTTATTGGACATTGCAGGAA
TAACTAGTTTTTTATTTTGTATAATATATTGTTAATAATCCATATCGAGTCTGTCTGATCAAATTACAACATC
TTTAGTCCGTCATTATATATATATATATGGTGAAGTTAATTTATTTCTCATATATTGTTTGCACAAAAAA
GAATCATGTATACCTTCAACAACAATAAGAATGAAATCATAAGTCAACTCTTGTATTTAAAGAATTTGAAAT
ATATGTCTAACCACTCAACTTTCTGTTTCTAGGGCATACTATAATTTTGAAGTCTCTCGACAATGAGATC
GGAAAATAATTGCCGATAAACTAGATGCTTCATCAACCATATTCAGCTTTAAGACATTTTCGATATATAATTTT
ATTTTTAACCTTTTTTGGACGGTAACTTTCTATAAAAAATGAACCCCTCTCACC AAAAGGTAGACATGCCTT
TATCTAATAATTTATAATATTTCAACTAATAATACTAGGGCAAAAGGACATAACTATACCAAAAAAGAAACCTA
TATAAATAAATAAACAGTATATGTAAGTTAAATTCGTCGATACGATTTTAAAAAAGGATAGATATATTGATT
ATTGATCATGTTGAATATGAAGTAGGGTGTGTTGGTGAAGTTTGTAGGTAGGAAATTTTAGGAGGTAACGTAAC
CTCTATACTATAATGATGTTCTTTAAGGAAGTAACTTGGAAAGGATTTGATGTTTTCTTCTTTGTTCATGGCA
ATTCCAAATTTGTAAAAAGACCGACCAAATTCATCAAACAATACAAAATATGACTATATAAGATAAAGACCAT
TGAGTCAACTTAAGGATGGAGTATTCTATTTGCAAAAAATATGTTTGTCAAAGTTTCAATGAATGATATTA
GCACAAATATTTCAATTTTCAATGGTTAGGACCAAATGCAAAAAGGCAATTTGTGGGGACCTTTTTTTTTTATTT
TTTATAATTTGGAGGGGTGGGTGGGGGTGGGTGATACAAGATTTGTGATAATATATAAGCACATTAGAAGGTGC
AAAA

```

**Figura S2:** Localización de los sitios de unión específicos de factores *CDFs* en la secuencia promotora del gen *AAP4*. La región mostrada corresponde a tres mil pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de transcripción del gen. En azul se indican los dominios 5'–TAAAG–3', mientras que en amarillo se resaltan los dominios 5'–AAAAG–3'.

```

>SL2.50ch07:67550145..67553144
GACATAAAATAAAAAGGAAATTACACAAGGGAAAAACATATAGACATAAAATTTTACTTTCAAAAAATTTGCG
AAACATAATTACATATTTGAATTTTGTATCAAAATATATATGTGCGGACATAATTCTTTTTCGCGATCATGCCT
AATAGTCTCCTCATACTACTTTTTGATTATTCCTTGTGATATAGAACTCTTTAACACGTACAATTATAACC
TCCAATACAACCTCTTCAATTAATACATAAATTGTAATTATATCTATTTTATCAAAATTTTCTCATAAATCATG
AGATTAATAGGCTCTATTGTCATAATCATGACCTAAGAAGGCTCACCTATAGTGATAATGAATATGGGGTGGGA
AAAATAAAAAATTAGGGTGACGTGTAGAGA AAAAGGAGTATAGATATTAATTGTTTCATATTAAAATGCCAAAC
ATATTGTTTTATAGGCCAGAACC AATTGAAAAACAACACAGGACTCATTATTATTAATCATAAATATATTTTT
TTATATATTGTACGAGGAATACATAAACAGAAAAAAA AAAAGGAACTTATGGCTGGTGGAAATAGAACATAATA
CAGAAACCCCATTTGCTGCTGGCAACATTTTCTGGCTCTTCTGATTCAAATGGTAACTTGATTTTTCTTAAAAA
TATACTATCTTGATGACCTTTTGTAGTAAATGGTATCTTTATTTTAGTTAAAAATTCTGTCTTGATGACTTTG
TATAGCAAAATGTGTTGTGTTGATTTTGGT TAAAGATTCTATCTTTTTGAATAAGGTTGTAATGGTCTTTT
GATTTTTGTTAAAAATCCATCTTTATATGACTTGGTATAGCAAAATGGTATCTTATTTTTGCTCAAATTTTCT
TGTCTTTCTGACTTGTAAATAAAATGTTGGCTTGATTTTGT TAAAGATTCTATCTTTTTGAATAAGTGTAGTAA
ATGGTGTCTTCATTTTTTGTAAAAATCCATCTTTATTGCTCTTTCTGTTCCATATTAAGTGGTGTGAG
GTTTTTTCATTGTTCAAAATAATTGAATTGTTCAAAGTTCAAGTTTGTATGTTTGAACATTTTCCATATATGT
TCTTTCTTTAATGAAGTTTGATTATTTCTAGGAGATAAATTGCATTACTTGCAAAGTTATATTTACTATTTTCT
ACAAAGGACAATAGTAT TAAAGTATAGTCTAAATATGTCTATGAATGTTTTTCTTAATAAGTTTGCATTTCTT
CACAAATCCCTCAATATGGAATGGAGGGAGTATGACTTGGTGTAGCAAAATGGTATCTTGATTTTTGTTGAA
CATTCCATCTTGATGACTTTACGCCAAAATGGTATCTTGATTTCTTCAAAGATTCTATCTTTTTGAATAGATGT
AGTAAATGGTGCCTTGATTTTTGAT TAAAGTTTCATCTTTATGACTTGGTGTATCAAATGGTATCTTGATTT
TGCCTCAAACCTCTGTCTTTCTAACTTGGTGTAGCAAAATGTTGTGTTGATTTTGT TAAAGATTCTGTCTTT
TTGAACAGGTGTAGTAAATGGGGTCTTGATTTTGT TAAAGATACTATCTTTATGACTTGGGGTGTAGTTTG
CTAGTACTAACTTGGGTTTTGGTTCATTTTTTGTAGTTGTATACTCAGGATTTGGGA AAAAGGGTACGATATG
GACTGCAGGAGCACATATTATAACAGGGGTTATAGGGGCAGGGTACTATCACTTTCATGGAGTATAGCACAA
TTAGGATGGATAGCTGGTCCATTGGCTATTATACTCTTTGCAGTAGTGACTCTATTTGCAACTACCATACTTT
GTGATTGCTATAAGTCTCCAGATTCTCTGCTTGGCCCTACCATAAATCACACTTTATTGGAAGCTGCAGGATT
TTACCTAGGTAAGTTACTGTTCAATTTTATATCTTTTACCTTTTTATTATTTTTTATGTATATACGGTAGATGT
TTTGGAACTCACTTAGTAAAAATGCTGGCTCTGCCACAAAATGGGGCTAATTTACCCACCTCGACTATTTGATT
GGTACCTGCTAGGCTGCTACCTACCCTATTACATATGTTGGATAACTCTATCACCAAGTTTTAGGCAGAAGA
GAGAAATCACTCTGTTGGGATTTGATCATCATCATCATTTATTTTGCATAAGGAAGTTGGATGATTTTCGGAG
AGAAGGCTTAACAGTTATGTGTAGCTATTGTGACTGAGAGTTGCATCCCTGGAAATAGAAAGAAAAAATAAA
AAAAATCTACTAAGAAGAACATAAAATATAAATATAATCATGTTATTGAGAAGTCAAGTGGCTTTAAGAAATT
GAGATTTACTGTATCATAATTGAAACAATG TAAAGATTATGGATTATTTTACATACTCTAGATTTTTGTTGAC
CTTATTGTGACATTACAGGCAGTCTAGTGGTCCCATGGTCTAGTGATTAGGACATTGGATACTGAATCCAGTA
CCCAGTTCAAATCTAAGTGGGACCTTTAGTTTTGGGCTATCAGAAACAACCTCTACCCAAA AAAAGATATGA
GTAAGGTCTGCATACATCTACCCTCTCTGGACCCCACTAGTGGGATTACACTGAGTGTGTTGTTGGTGTAC
TTGACAGTTCCAATCACATCGACCAAAATTTGTGATTTTCCATTGATTTAATATCTTTTTGTTTTCATACTAG
CATCCAAAAAACCAACATTGATTTGAACCTAAGTTTGGCTTGACCTGTTAGGCTTTGAAAAAGACATGCAC
ATGGAGTCTGAGAATGTAATATATATATGTACATAGTGACGAGATCCAAAAATGGGT AAAAGTTACTGGACTC
TATGTTTAAATAGTCATCCCCCTTGAGTTGTGAAATGTCTATCTCATTGGTAGGTTCAATTTGGACTGTT
GCTTATATAAAATATATGAGAAGATATTTTTTCTTTAAAAATGTATCTATTTGCAGT TAAAGGGTAGAATT
ACAGCA

```

**Figura S3:** Localización de los sitios de unión específicos de factores *CDFs* en la secuencia promotora del gen *AAP6*. La región mostrada corresponde a tres mil pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de transcripción del gen. En azul se indican los dominios 5'–TAAAG–3', mientras que en amarillo se resaltan los dominios 5'–AAAAG–3'.