



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

LA FAMILIA DE PERMEASAS AAP COMO DIANAS DE
MEJORA PARA AUMENTAR LA EFICIENCIA EN EL USO
DE NITRÓGENO (NUE) EN SOLANUM LYCOPERSICUM
L.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Jiménez Benavente, Eva

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a: Molina Romero, Rosa Victoria

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA
AGRODIVERSIDAD VALENCIANA (COMAV)

MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**La familia de permeasas AAP como dianas de mejora para
aumentar la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE) en
Solanum lycopersicum L.**

CURSO ACADÉMICO 2023-2024

ALUMNA: EVA JIMÉNEZ BENAVENTE

TUTOR: SERGIO GONZÁLEZ NEBAUER

COTURORA: ROSA VICTORIA MOLINA

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2024

La familia de permeasas AAP como dianas de mejora para aumentar la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE) en *Solanum lycopersicum* L.

La demanda de una mayor producción de especies que constituyen la base de la alimentación de la población creciente, entre las que se incluye el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), ha supuesto un elevado uso de fertilizantes, especialmente nitrogenados, repercutiendo negativamente en la ecología y la economía. Además de mejoras en el manejo agronómico, la transición a una agricultura de bajos insumos se ha de basar en el desarrollo de cultivares con mejor eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE).

En este contexto, en el presente Trabajo de Final de Máster, se pretende estudiar la familia de permeasas de aminoácidos tipo AAP y su implicación en la partición de N asimilado en tomate. Su caracterización funcional, ya que se han demostrado cruciales en la distribución de aminoácidos en otras especies, permitirá identificar aquellas AAPs que controlan la partición de aminoácidos al fruto, y que por lo tanto se podrían emplear en programas de mejora de este cultivo para aumentar su producción en condiciones de menor aporte de N.

Con este objetivo, se ha caracterizado el comportamiento de las AAPs en hojas de distintas edades en su respuesta a la disponibilidad de N. Se ha estudiado la expresión de las mismas, así como el contenido de aminoácidos en los diferentes tipos de hoja y en el fluido floemático, para conocer la regulación del transporte de N asimilado entre fuentes y sumideros. Los resultados señalan que la mayor capacidad de exportación de aminoácidos de las hojas está relacionada con una mayor expresión de las permeasas AAP2, AAP4 y AAP6.

Por otro lado, se ha realizado un estudio comparativo de las secuencias de los 8 genes AAP en la colección *Varitome*, que incluye accesiones de los antecesores silvestres *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y los primeros tomates domesticados del continente americano. Nuestros resultados sugieren la existencia de una selección de haplotipos de algunas AAPs durante la domesticación.

Estos resultados confirman la importancia de las AAPs como diana de mejora para incrementar la NUE en cultivos como el tomate.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, nitrógeno, deficiencia, hojas, AAPs, partición, fotoasimilados

Alumna: Eva Jiménez Benavente

Valencia, septiembre 2024

Tutor: Sergio González Nebauer

Cotutora: Rosa Victoria Molina

La família de permeases AAP com a dianes de millora per a augmentar l'eficiència en l'ús de nitrogen (NUE) en *Solanum lycopersicum* L.

La demanda d'una major producció d'espècies que constitueixen la base de l'alimentació de la població creixent, entre les quals s'inclou el tomàquet (*Solanum lycopersicum* L.), ha suposat un elevat ús de fertilitzants, especialment nitrogenats, repercutint negativament en l'ecologia i l'economia. A més de millores en el maneig agronòmic, la transició cap a una agricultura de baixos inputs s'ha de basar en el desenvolupament de cultius amb millor eficiència en l'ús del nitrogen (NUE).

En aquest context, en el present Treball de Fi de Màster, es pretén estudiar la família de permeases d'aminoàcids tipus AAP i la seua implicació en la partició del N assimilat en el tomàquet. La seua caracterització funcional, ja que s'han demostrat crucials en la distribució d'aminoàcids en altres espècies, permetrà identificar aquelles AAPs que controlen la partició d'aminoàcids al fruit, i que per tant es podrien emprar en programes de millora d'aquest cultiu per augmentar la seua producció en condicions de menor aportació de N.

Amb aquest objectiu, s'ha caracteritzat el comportament de les AAPs en fulles de diferents edats en la seua resposta a la disponibilitat de nitrogen. S'ha estudiat l'expressió de les mateixes, així com el contingut d'aminoàcids en els diferents tipus de fulla i en el fluid floemàtic, per conèixer la regulació del transport de nitrogen assimilat entre fonts i embornals. Els resultats assenyalen que la major capacitat d'exportació d'aminoàcids de les fulles està relacionada amb una major expressió de les permeases AAP2, AAP4 i AAP6.

D'altra banda, s'ha realitzat un estudi comparatiu de les seqüències dels 8 gens AAP en la col·lecció Varitome, que inclou accessions dels antecessors silvestres *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* i els primers tomàquets domesticats del continent americà. Els nostres resultats suggereixen l'existència d'una selecció d'haplotips d'algunes AAPs durant la domesticació.

Aquests resultats confirmen la importància de les AAPs com a dianes de millora per incrementar la NUE en cultius com el tomàquet.

Paraules clau: *Solanum lycopersicum*, nitrogen, deficiència, fulles, AAPs, partició fotoassimilats

Alumna: Eva Jiménez Benavente

València, setembre 2024

Tutor: Sergio González Nebauer

Cotutora: Rosa Victoria Molina

The AAP permease family as targets for improving nitrogen use efficiency (NUE) in *Solanum lycopersicum* L.

The demand for increased production of species that form the basis of the diet of the growing population, including tomato (*Solanum lycopersicum* L.), has led to a high use of fertilizers, especially nitrogen-based ones, which negatively impact both the ecology and the economy. In addition to improvements in agronomic management, the transition to low-input agriculture must be based on the development of cultivars with better nitrogen use efficiency (NUE).

In this context, this Master's Thesis aims to study the family of amino acid permeases of the AAP type and their involvement in the partitioning of assimilated nitrogen (N) in tomato. Their functional characterization, as they have been shown to be crucial in amino acid distribution in other species, will allow us to identify those AAPs that control the partitioning of amino acids to the fruit, and that could therefore be used in breeding programs for this crop to increase its production under conditions of lower N supply.

To achieve this goal, the behavior of AAPs in leaves of different ages in response to N availability has been characterized. Their expression has been studied, as well as the amino acid content in different leaf types and in phloem sap, to understand the regulation of assimilated N transport between sources and sinks. The results indicate that the higher capacity for amino acid export from leaves is associated with a higher expression of the AAP2, AAP4, and AAP6 permeases.

Additionally, a comparative study of the sequences of the 8 AAP genes in the Varitome collection, which includes accessions from the wild ancestors *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, and the first domesticated tomatoes from the American continent, has been conducted. Our results suggest the existence of a selection of haplotypes of some AAPs during domestication.

These results confirm the importance of AAPs as improvement targets to increase NUE in crops such as tomatoes.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, nitrogen, deficiency, leaves, AAPs, photoassimilate, distribution

Student: Eva Jiménez Benavente

Valencia, September 2024

Advisor: Sergio González Nebauer

Co-advisor: Rosa Victoria Molina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	7
3.2 DETERMINACIONES FOTOSINTÉTICAS	7
3.3 MUESTREO DEL MATERIAL VEGETAL Y ANÁLISIS DE BIOMASA	8
3.4 ANÁLISIS METABOLÓMICO	8
3.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA	9
3.6 SÍNTESIS DE cDNA Y DISEÑO DE CEBADORES	9
3.7 PCR CUANTITATIVA (qPCR)	10
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	10
3.9 COLECCIÓN VARITOME	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1 EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DEL APOORTE DE N EN PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS	11
4.2 EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DEL APOORTE DE N EN LA PARTICIÓN DE LA BIOMASA	12
4.3 INFLUENCIA DEL APOORTE DE N EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES AAPs	14
4.4 INFLUENCIA DEL APOORTE DE N EN LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO	15
4.5 ANÁLISIS DE DATOS METABOLÓMICOS	17
4.6 ANÁLISIS COLECCION VARITOME	19
4.6.1 Análisis de haplotipos	19
4.6.2 Análisis estructural <i>in silico</i>	20
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la estructura de la permeasa de aminoácidos AAP1 de Arabidopsis	4
Figura 2: Modelo propuesto de funciones de transportadores de aminoácidos (aa) en Arabidopsis.....	4
Figura 3: Índice SPAD tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CV MM) para cada edad de hoja y tratamiento	11
Figura 4: Contenido superficial de clorofila tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CVMM) para cada edad de hoja y tratamiento.....	11
Figura 5: Índice NDVI tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CV MM) para cada edad de hoja y tratamiento	12
Figura 6: Medidas de fluorescencia tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CV MM) para cada edad de hoja y tratamiento.....	12
Figura 7: Peso fresco total tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CV MM) para cada órgano y tratamiento	14
Figura 8: Expresiones del gen AAP2 en condiciones diferenciales de nitrógeno y en distintos estadios de desarrollo de la hoja obtenidas por medio de qPCR.	15
Figura 9: Expresiones del gen AAP4 en condiciones diferenciales de nitrógeno y en distintos estadios de desarrollo de la hoja obtenidas por medio de qPCR	15
Figura 10: Expresiones del gen AAP6 en condiciones diferenciales de nitrógeno y en distintos estadios de desarrollo de la hojas obtenidas por medio de qPCR	15
Figura 11: Expresiones del gen GS1 en condiciones diferenciales de nitrógeno y en distintos estadios de desarrollo de la hoja obtenidas por medio de qPCR	17
Figura 12: Concentraciones de los distintos metabolitos analizados en condiciones diferenciales de nitrógeno y en distintos estadios de desarrollo de la hoja	18
Figura 13: Concentraciones de los distintos metabolitos analizados en condiciones diferenciales de nitrógeno y en el fluido floemático próximo a los distintos estadios de desarrollo de la hoja	19

Figura 14: Frecuencias de haplotipos para cada una de las permeasas de la familia de las AAP a lo largo de la historia evolutiva del tomate20

Figura 15: Anotación estructural de las 8 permeasas de la familia AAP, con sus respectivas variantes, obtenidas mediante el servidor SWISS-MODEL21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I: El uso abusivo de fertilizantes nitrogenados en la agricultura tiene una relación directa y significativa con varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por las Naciones Unidas.....	29
Anexo II: Secuencias y concentraciones de los cebadores empleados	30
Anexo III: Datos no significativos de expresión relativa de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno	32

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo de suma importancia tanto a nivel global como nacional, destacando, no solo por su valor económico, sino también por su relevancia en la seguridad alimentaria y la salud humana. A lo largo de las últimas décadas, la producción global de tomate ha experimentado un crecimiento constante, alcanzando en 2022 una cifra aproximada de 190 millones de toneladas (FAO, 2023). Este incremento se debe en parte a la adaptación del cultivo a diversas condiciones agroclimáticas y a la expansión de su cultivo en numerosos países. Además, el tomate es un cultivo que permite un uso en diversos ámbitos y que es empleado tanto fresco como procesado, lo cual contribuye a una demanda constante en el mercado.

España es uno de los principales productores de tomate en la Unión Europea (UE), con una producción que supera los 4 millones de toneladas anuales (MAGRAMA, 2023). Este cultivo tiene un papel destacado en la economía agrícola del país, especialmente en las regiones de Andalucía, Murcia y Extremadura, donde se combina la tradición agrícola con el uso de tecnologías avanzadas para mejorar la productividad y calidad del producto. La importancia del tomate en la dieta mediterránea, reconocida por la UNESCO como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad, subraya su valor nutricional, debido a su alto contenido de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos que contribuyen a la prevención de enfermedades crónicas (Willett et al., 1995).

Desde la Revolución Verde (1960), la intensificación del cultivo del tomate ha venido acompañada de prácticas que, si bien incrementan los rendimientos a corto plazo, plantean serios desafíos ambientales y de sostenibilidad a largo plazo. Entre estas prácticas, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados ha generado preocupación debido a sus efectos adversos sobre los ecosistemas y la salud humana. Con el objetivo de mantener los altos niveles de productividad, este tipo de fertilizantes han sido empleados de manera intensiva, lo que ha llevado a la acumulación de nitratos en el suelo y en las aguas subterráneas (Marschner, 2012). Esta acumulación no solo representa un riesgo para la calidad del agua potable, sino que también contribuye a la eutrofización del ambiente acuático, un fenómeno que da lugar al crecimiento excesivo de algas y a la disminución de oxígeno, afectando negativamente a la biodiversidad acuática y alterando significativamente la composición de los ecosistemas acuáticos (Smith et al., 1999). Además, la presencia de altos niveles de nitratos en el agua potable se ha asociado con riesgos para la salud humana, especialmente en niños pequeños (WHO, 2017).

Estos problemas ambientales y de salud han llevado a una creciente presión para desarrollar estrategias agrícolas que reduzcan el uso de fertilizantes sin comprometer el rendimiento de los cultivos, promoviendo prácticas más sostenibles que mitiguen el impacto ambiental de la producción agrícola. Además de la adaptación de las estrategias de manejo agronómico, se están abordando desde hace tiempo programas que permitan mejorar la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE) en condiciones de bajos insumos en diversos cultivos (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Este parámetro, complejo genéticamente, incluye numerosos procesos fisiológicos, entre los que se encuentran la capacidad de absorción, asimilación del N, así como de su distribución en la planta, removilización y almacenamiento, para transformarlo en biomasa o cosecha. (Raun y Johnson, 1999). El desarrollo de variedades con NUE mejorada permitirán, de manera complementaria al uso de estrategias más sostenibles, lograr los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) recogidos en el Anexo I.

El nitrógeno (N) junto con el carbono (C), es cuantitativamente el componente principal para la biomasa de la planta. La partición del nitrógeno dentro de la planta de tomate es un proceso fundamental que determina no solo el crecimiento y desarrollo, sino también la calidad de los órganos cosechados. El nitrógeno es un elemento esencial en la planta, participando en la formación de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, todos ellos componentes cruciales para la función celular y el crecimiento vegetal (Hawkesford et al., 2012). En la planta de tomate, el manejo eficiente del nitrógeno es crítico, ya que este nutriente debe ser absorbido por las raíces, transportado a través del sistema vascular, asimilado y finalmente redistribuido a los órganos en desarrollo, como las hojas y los frutos. Este proceso de partición es influenciado por múltiples factores, entre los que se incluyen la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la eficiencia de absorción por parte de las raíces y la regulación hormonal que controla la movilización y redistribución de nitrógeno dentro de la planta (Lea y Azevedo, 2006). En condiciones de disponibilidad limitada de nitrógeno, la planta de tomate debe priorizar la asignación de este nutriente a los órganos dónde será asimilado, para asegurar la producción de energía y fotoasimilados necesaria para el crecimiento y la maduración de los frutos (Miller et al., 2007). El nitrógeno, captado fundamentalmente como nitrato, es asimilado a aminoácidos, a partir de los esqueletos carbonados, fundamentalmente en las hojas (Yuan, L., y Zhang, L., 2020). Eventualmente, también puede asimilado en las células de la raíz. Desde los órganos fuente, son distribuidos a los diferentes sumideros de la planta fundamentalmente por el floema. Comprender los mecanismos subyacentes a la partición de nitrógeno es crucial para desarrollar prácticas de manejo

que optimicen la utilización de este nutriente, reduciendo los aportes de fertilizantes y mejorando la sostenibilidad del cultivo de tomate.

La eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) anteriormente comentado, es un carácter complejo, que puede descomponerse en eficiencia de absorción del nitrógeno (NUpE), eficiencia de utilización del nitrógeno (NUtE) (Xu, G. et al., 2012). La NUtE incluye procesos como la asimilación de N, su almacenamiento o la partición en la planta. Muchos de los procesos fisiológicos implicados, como la absorción, removilización o asimilación, han sido ampliamente estudiados previamente (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Sin embargo, no se ha explorado en detalle el componente de eficiencia de partición del nitrógeno, que engloba la capacidad de la planta para distribuir el nitrógeno asimilado desde órganos fuente, como las hojas, hacia órganos sumideros, como las semillas o los frutos (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

Dentro de este contexto, las permeasas de aminoácidos, que facilitan el transporte nitrógeno asimilado en la planta, juegan un papel esencial en su partición eficiente (Tegeder & Masclaux-Daubresse, 2018). Este grupo de permeasas está formado por diversas familias que muestran diferencias en la especificidad de aminoácidos y cinética de transporte (Ortiz-Lopez, A. et al., 2000). Entre ellas, la familia AAP, capaz de transportar un amplio espectro de aminoácidos, han mostrado que desarrollan funciones clave en la partición de aminoácidos en especies como *Arabidopsis* o guisante (Fischer, W. N. y Lütke-meier, M., 2002) (Figura 1 y 2). Tanto en tomate como en *Arabidopsis*, la familia AAP está compuesta por 8 genes (Léran, S. y Boucherez, J., 2014).

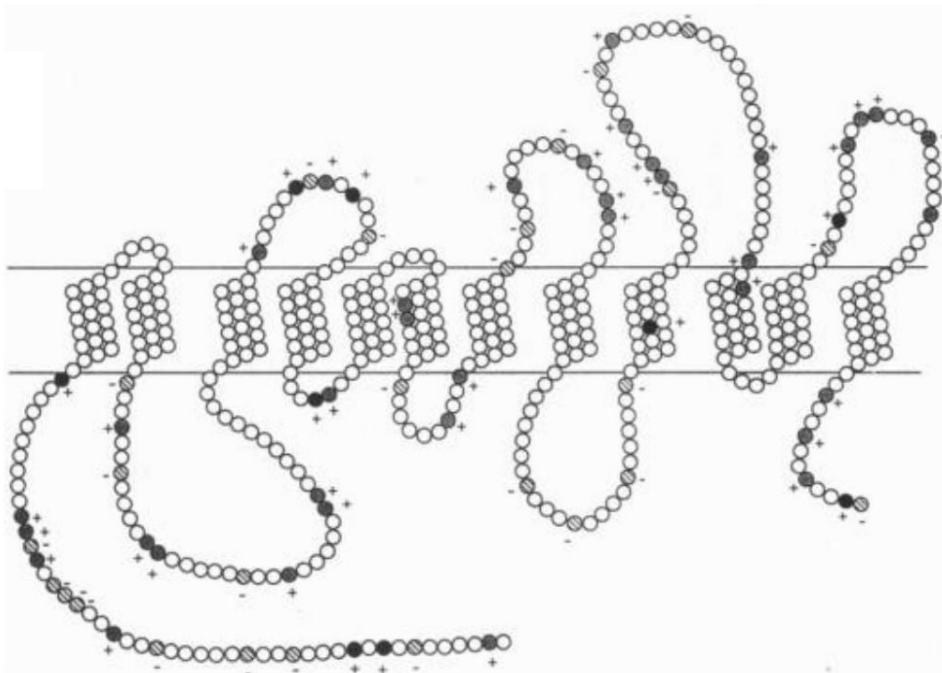


Figura 1: Representación esquemática de la estructura de la permeasa de aminoácidos AAP1 de Arabidopsis. Orientación propuesta en la membrana plasmática. Los residuos cargados se muestran marcados y las histidinas se representan por círculos opacos. (Modificado de Frommer et al., 1993).

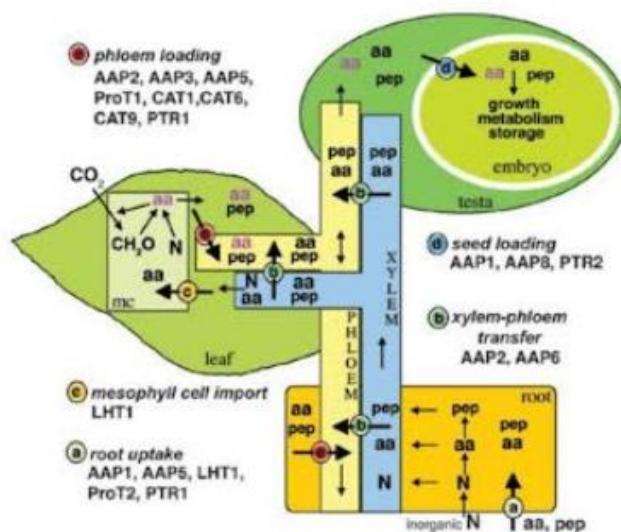


Figura 2: Modelo propuesto de funciones de transportadores de aminoácidos (aa) en Arabidopsis. A, absorción de raíces; B, transferencia xilema-floema; C, importación a las células del mesófilo (mc); D, carga en semilla; E, candidatos potenciales para carga al floema; aa, aminoácidos; pep, péptidos; CH₂O, carbohidratos (De Tegeder y Rentsch,2010).

Estas permeasas permiten el transporte selectivo de aminoácidos a través de las membranas celulares, regulando el movimiento de los aminoácidos entre orgánulos (p.e. exportación desde del cloroplasto o almacenamiento en la vacuola, la salida desde las células exportadoras o la entrada en células importadoras (Figura 2). También se han descrito que están implicadas en el movimiento entre xilema y floema (Tegeder y Masclaux-Daubresse, 2018). La actividad de las permeasas está controlada por una serie de señales internas, como las hormonas vegetales, y externas, como la disponibilidad de nutrientes en el medio, lo que permite a la planta adaptar su metabolismo en respuesta a las condiciones ambientales (Zhang et al., 2021).

En el caso del tomate, el control del transporte de aminoácidos es especialmente importante durante la fase de crecimiento del fruto, donde la demanda de nitrógeno es alta y la eficiencia en el transporte de estos compuestos puede tener un impacto directo en la calidad del fruto y en la productividad del cultivo (Hsu et al., 2018). Las investigaciones actuales se están centrando en entender cómo la manipulación de la expresión de genes que codifican para estas permeasas puede ser utilizada para mejorar la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE), lo que podría reducir la necesidad de fertilizantes y aumentar la sostenibilidad de los sistemas de cultivo de tomate (Fan et al., 2020). En este contexto, el estudio de las permeasas como dianas de mejora, y su

regulación, ofrece una perspectiva prometedora para el desarrollo de prácticas agrícolas más eficientes y menos dependientes de insumos externos.

2. OBJETIVOS

Los estudios previos realizados por el grupo de Fisiología Vegetal del Departamento de Producción Vegetal de la Universitat Politècnica de València (UPV) en distintas variedades del tomate comercial, mostraron una expresión diferencial de las permeasas AAP en los diferentes órganos de la planta, sugiriendo funciones específicas para los 8 genes en los procesos de partición.

Para profundizar en su caracterización funcional de la familia AAP, se ha estudiado su implicación en los procesos de carga de aminoácidos al floema desde las hojas fuente, y las respuestas a diferentes niveles de fertilización. Para ello, se realizó un cultivo en cámara con fertilización nitrogenada diferencial (completa y limitante) con el cultivar *MoneyMaker* (CV *MM*). Se realizó una caracterización bioquímica y molecular, determinando las expresiones génicas de las AAPs y el contenido de aminoácidos, tanto en el fluido floemático como en los distintos tipos de hojas. También se ha realizado un estudio comparativo de secuencias en la colección *Varitome*, para evaluar si durante el proceso de domesticación se ha producido una selección de alelos específicos para los genes de la familia. Para abordar estos objetivos generales, en el presente Trabajo de Final de Máster se han definido una serie de objetivos parciales:

1. Caracterizar el comportamiento de las AAPs durante el desarrollo de la hoja (transición sumidero a fuente).
2. Relacionar la expresión de las AAPs con el flujo de aminoácidos entre las hojas fuente y las hojas sumidero. Para ello se determinará el contenido en aminoácidos en los diferentes tipos de hojas y en el fluido floemático.
3. Determinar la respuesta de los diferentes tipos de hoja, la expresión AAPs y los contenidos en aminoácidos en hoja y floema a los niveles de disponibilidad de N.
4. Comprobar el proceso de selección de haplotipos de las AAP durante la domesticación del tomate y su repercusión a nivel de estructura de la proteína.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

El estudio se realizó con la variedad comercial *Moneymaker* (CV MM) de la especie *Solanum lycopersicum* L. Las semillas, adquiridas en un distribuidor comercial (Entresemillas), se trataron de manera previa con una dilución de agua e hipoclorito de sodio (lejía comercial) 2:1 durante 15 minutos. Tras ello se procedió a realizar 5 lavados con agua destilada y a su traspaso a placas *Petri*. En la base de las placas se colocaron varias capas de papel de filtro con el objetivo de mantener las condiciones de humedad necesarias a una temperatura de 25°C en estufa.

Tras su germinación, fueron sembradas en semilleros con sustrato y llevadas a cámara de cultivo, bajo unas condiciones de fotoperiodo largo (16h/8h; día/noche) y unos parámetros de temperatura de 25°C/20°C. Durante 7 días fueron regadas con solución completa (Hoagland y Arnon, 1951). Posteriormente, se llevó a cabo el trasplante de 36 réplicas a macetas de 10 cm de diámetro rellenas con bolas (2-3 mm de diámetro) de arcilla expandida (Arlita, España) y papel de filtro en su base. Durante los 21 días posteriores, todas las réplicas continuaron con riegos de solución completa.

Tras estos días, las 36 plantas de tomate (con 6-7 hojas) fueron divididas en 3 tratamientos con riego diferencial para una concentración de nitrógeno del 8 mM (100%), 4 mM (50%) y 0.8 mM (10%) (12 réplicas por tratamiento). Estudios previos del laboratorio permitieron establecer que la solución de 8 mM de N constituyen un aporte suficiente y completo en las condiciones de ensayo para el tomate (Renau-Morata, B., et al.). Tanto en el pretratamiento diferencial como durante el propio ensayo de estrés abiótico, los riegos fueron realizados cada dos días. El ensayo se mantuvo hasta el desarrollo de diferencias fenotípicas significativas en los parámetros fisiológicos determinados entre los tres niveles de fertilización.

3.2 DETERMINACIONES FOTOSINTÉTICAS

Transcurridos 15 días de riego diferencial se procedió a la realización de medidas para determinar la existencia de diferencias entre tratamientos. Se establecieron, basado en resultados anteriores, 3 estados de desarrollo fisiológico de las hojas a la hora de realizar el estudio. Las hojas 1 y 2, en desarrollo, se consideran hojas inmaduras; la tercera hoja, con un 70 % de la superficie final desarrollada, joven; y la tercera hoja desde los cotiledones, con su tamaño final desarrollado, hoja madura. Las determinaciones fotosintéticas se realizaron en cada uno de los tipos de hojas para todas las plantas de cada tratamiento ($n = 3 \times 12 \times 3$).

Se determinó el índice SPAD, relacionado con el contenido en clorofilas, mediante un

SPAD502 (Minolta, Japón). También se llevó a cabo la toma de medidas con el medidor DUALEX SCIENTIFIC (Cotecno, Chile), que realiza una estimación del contenido de clorofila, flavonoles y antocianos, así como el parámetro NBI, un índice relacionado con el estado de nitrógeno de la planta. Se empleó también el dispositivo Polypen rp 410 que mide parámetros de transmitancia y reflectancia en las hojas, y que calcula diferentes índices, como el NDVI (Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada), que se ha relacionado con el estado de salud o vigor de las plantas, ya que es un indicador de la biomasa fotosintéticamente activa. Este parámetro se obtendría mediante la fórmula $NDVI = (RNIR - RRED) / (RNIR + RRED)$ (Rouse et al., 1974). Por último, para analizar el rendimiento fotosintético a través del parámetro eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) se empleó el fluorímetro Mini-PAM (Walz, Alemania).

3.3 MUESTREO DEL MATERIAL VEGETAL Y ANÁLISIS DE BIOMASA

Se determinó la biomasa (gramos peso fresco) de los diferentes órganos de la planta (hojas, tallo y raíces).

Durante el muestreo, de forma paralela se procedió a la extracción del fluido floemático de folíolos pertenecientes a las hojas inmaduras, jóvenes y maduras de cada una de las muestras sometidas a los distintos niveles de nitrógeno. Para ello se procedió a realizar un corte del folíolo terminal en cada caso, seguido de un segundo corte sumergido en 20 mM EDTA para evitar que se generen tapones de calosa. Tras ello se introdujeron individualmente en Eppendorfs con 1 mL de 20 mM EDTA, y se mantuvieron durante 2 h en oscuridad y un ambiente húmedo. Tras ello se midió el peso fresco del material vegetal empleado en cada muestra, y los Eppendorfs se introdujeron en un SpeedVac hasta lograr la completa evaporación del líquido.

El material vegetal correspondiente a los distintos órganos (raíz, tallo, hoja inmadura, hoja joven y hoja madura) de las muestras sometidas a los niveles de nitrógeno diferenciales, fueron trituradas con un mortero y nitrógeno líquido, seguidas de una trituración más fina en un molino de bolas, para asegurar la homogeneidad en el material de partida en los posteriores análisis. De esta forma se obtuvieron las alícuotas de cada una de las réplicas biológicas que fueron almacenadas en arcones a una temperatura de -80 °C para asegurar su correcta conservación.

3.4 ANÁLISIS METABOLÓMICO

El análisis de los aminoácidos de las muestras vegetales y del fluido floemático obtenido fue realizado por el Servicio de Metabolómica del CEBAS-CSIC, mediante un sistema ICP-OES (macro y microelementos) y un analizador elemental CHN (C y N) en el Laboratorio de Ionomics del CEBAS-CSIC (CEBAS, Murcia, España). Para cada tipo de

órgano y condición se realizaron tres réplicas biológicas independientes.

3.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA

Se procedió a la extracción del RNA total del material vegetal siguiendo para ello el protocolo del kit de extracción *RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)* y tomando 200 mg de material de cada una de las muestras trituradas. Al RNA purificado obtenido se añadió H₂O libre de RNasas hasta un volumen final de 25 µL y fue almacenado a una temperatura de -20°C.

Se realizó la cuantificación de RNA purificado empleando *Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)*. La concentración del RNA se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm (A 260) mientras que, para estimar su pureza se determinaron los ratios de absorbancia a las longitudes de onda de 260nm/230nm y 260nm/280nm, indicadores de contaminantes con absorción en el rango de 230nm y de contaminación por proteínas respectivamente (Wilfinger, W. et al., 1997).

3.6 SÍNTESIS DE cDNA Y DISEÑO DE CEBADORES

A partir del RNA extraído y cuantificado, se sintetizó cDNA empleando para ello el protocolo de *TaKaRa PrimeScript RT Reagent KIT (Perfect Real Time)*, tras lo cual, las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -20°C para su correcta conservación.

Para el estudio de la expresión diferencial de genes, se procedió al diseño de los cebadores específicos de los diferentes genes analizados, empleando para ello el programa informático *Primer3Plus (Primer3Plus. <https://www.primer3plus.com/index.html>)*. Atendiendo a los estudios previos realizados por el Grupo de Fisiología Vegetal de la Universitat Politècnica de València (UPV), las permealas seleccionadas para realizar estos primeros análisis fueron AAP2, AAP4 y AAP6, que habían mostrado un mayor nivel de expresión en hojas. Por otro lado, debido a sus implicaciones clave en el metabolismo del nitrógeno (Azcón-Bieto, 2008), también se analizaron los siguientes genes: glutamina sintetasa 1 (GS1), glutamina sintetasa 2 (GS2), asparagina sintetasa (ASNS), nitrato reductasa (NR), Glutamato deshidrogenasa 2 (GAD2) y glutamato deshidrogenasa (GDH). Se empleó el gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) como gen constitutivo (*housekeeping*). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 1 (Anexo II). Para cada par de cebadores se realizaron ensayos para optimizar la concentración de cada uno y determinar su eficiencia de amplificación, quedando estos datos recogidos en la Tabla 2 (Anexo II).

3.7 PCR CUANTITATIVA (qPCR)

La qPCR para cada uno de los genes se realizó en el sistema de detección *CFX Connect Real-Time PCR de Bio-Rad* con las siguientes condiciones de reacción: 30 segundos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos (detección de la absorbancia de *TB Green Premix Ex Taq* de TaKaRa).

Para cada reacción de 10 µL de volumen final se empleó 1 µL de cDNA (concentración) de cada una de las muestras junto con 5 µL de *TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus)* de TaKaRa y 4 µL de H₂O y el par específico del gen a amplificar con las concentraciones anteriormente detalladas en la Tabla 2 (Anexo II)

Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada tratamiento diferencial de nitrógeno y tipo de hoja (hoja inmadura, hoja joven y hoja madura), y se hicieron 2 réplicas técnicas para cada una de ellas.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de los datos se realizó mediante ANOVA simple utilizando el software Statgraphics (Statgraphics Centurion XVI, Statpoint Tech, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). Los valores medios de los tratamientos se compararon ($p < 0,05$) utilizando el procedimiento de diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher.

3.9 COLECCIÓN VARITOME

La colección *Varitome* se trata de una colección nuclear de 168 entradas constituida por accesiones de *S. pimpinellifolium*, como ancestro silvestre del tomate, *S. lycopersicum* var *cerasiforme*, y tomate (*S. lycopersicum*), representativas del proceso de domesticación del tomate cultivado (REFERENCIA Blanca, J., et al. 2012). Se realizó un análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de la región codificante de los 8 genes AAPs en todas las accesiones de la colección para identificar los haplotipos presentes mediante los programas MEGA (versión 11.0.13) (*MEGA Software*. <https://www.megasoftware.net/>) y TASSEL (version 5) (*TASSEL: A software tool for analyzing and visualizing high-throughput genetic data*. <https://tassel.bitbucket.io/>). La secuencia nucleotídica de cada uno de los haplotipos se tradujo a secuencia aminoacídica mediante MEGA. Para determinar el efecto de las diferentes variantes de aminoácidos sobre la estructura predicha del transportador se introdujeron las secuencias en el servidor SWISS-MODEL (*Swiss-Model*. <https://swissmodel.expasy.org/>) y se generaron modelos por comparación con las bases de datos del servicio. Para todos los genes se identificaron permeasas en otras especies de plantas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DEL APORTE DE N EN PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS

El índice SPAD, también llamado índice relativo de clorofila, suele correlacionarse con el contenido de clorofila en la hoja, lo cual ayuda a identificar deficiencias de N en la muestra estudiada (Guimarães et al., 1999).

Tal y como cabría esperar, ya que el nitrógeno es un componente fundamental de la porfirina de la clorofila, su deficiencia afecta directamente la síntesis de clorofila, resultando en una menor concentración de ésta en las hojas y, consecuentemente, en una reducción del color verde característico de las plantas (Taiz y Zeiger, 2010). Se observa una bajada general en los tres tipos de hojas (Figura 3), siendo más acusada en las hojas inmaduras. Este aspecto podría explicarse por la alta demanda de nitrógeno en estas etapas de desarrollo, donde se requiere para la biosíntesis de nuevos tejidos, clorofila y otras moléculas nitrogenadas, por lo que con la misma deficiencia nutricional se produciría una mayor intensidad de los síntomas de clorosis (Taiz y Zeiger, 2010).

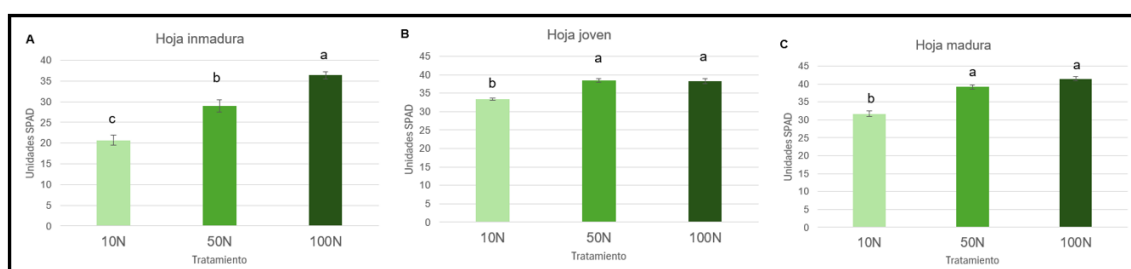


Figura 3: Índice SPAD tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CV MM) para cada edad de hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura) y tratamiento (100%N, 50%N y 10%N). Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

Mediante el uso del aparato Dualex, se pudo también medir la clorofila de cada uno de los tres tipos de hojas. La determinación de estos pigmentos, como cabría esperar, presenta unos resultados con unos patrones similares a los anteriormente comentados (Figura 4).

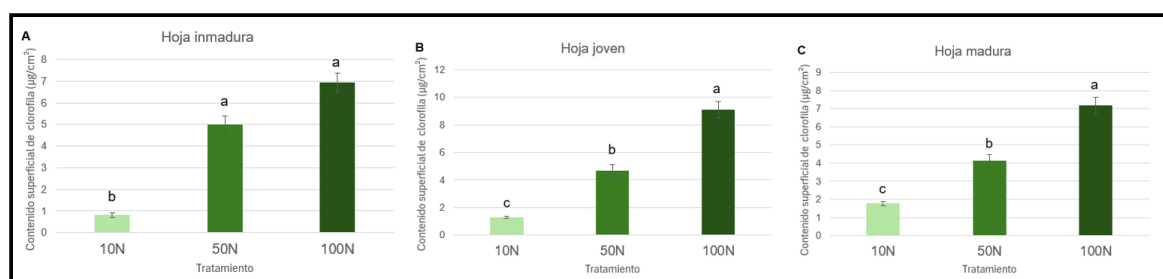


Figura 4: Contenido superficial de clorofila tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar Moneymaker (CV MM) para cada edad de hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura) y tratamiento (100%N, 50%N y 10%N). Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

Hoja madura) y tratamiento (100%N, 50%N y 10%N). Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

Asimismo, el Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI), que es un indicador de la biomasa fotosintéticamente activa, muestra un descenso de su valor cuando el aporte de N es sólo el 10% del aporte óptimo, con independencia del tipo de hoja (Figura 5). El nitrógeno, además de un componente central de la clorofila, lo es también de las enzimas clave involucradas en la fotosíntesis, como la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco), reduciendo la capacidad de la planta para realizar este proceso (Evans y Clarke, 2019).

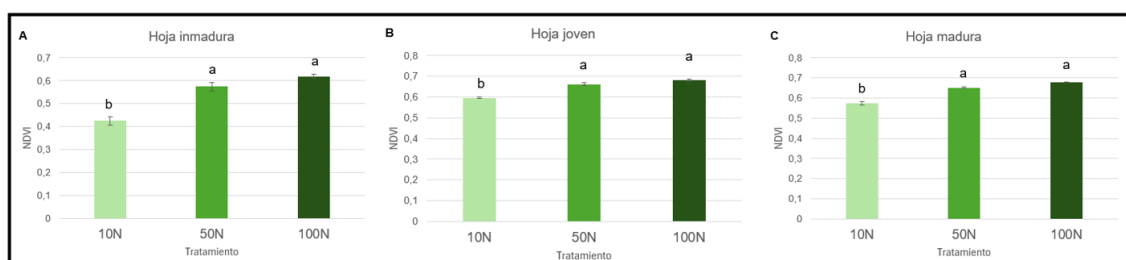


Figura 5: Índice NDVI tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar MoneyMaker (CV MM) para cada edad de hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura) y tratamiento (100%N, 50%N y 10%N). Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

Las medidas de fluorescencia, que se usan para evaluar la eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII) en las plantas (Marschner, 2012), señalan una disminución de esta eficiencia cuando se reduce el aporte de N en los 3 tipos de hoja (Figura 6). Este descenso está relacionado con los datos anteriormente discutidos sobre contenido en pigmentos y proteínas implicadas en el proceso fotosintético, tanto enzimáticas como de los complejos del PSII (Taiz y Zeiger, 2010).

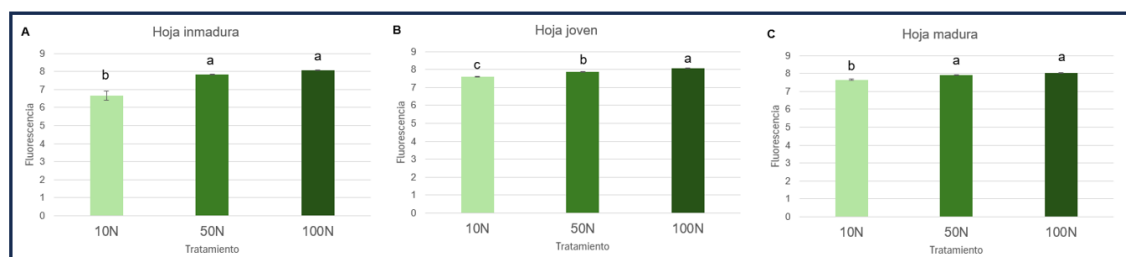


Figura 6: Medidas de fluorescencia tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivar MoneyMaker (CV MM) para cada edad de hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura) y tratamiento (100%N, 50%N y 10%N). Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

4.2 EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DEL APOORTE DE N EN LA PARTICIÓN DE LA BIOMASA

Los datos obtenidos en el estudio anterior se complementaron con mediciones de la biomasa del material vegetal recolectado (raíz, tallo y hojas), lo que permitió evaluar con

mayor precisión los efectos del riego diferencial aplicado sobre el cultivo. Esta estrategia fue clave para asegurar que las variaciones en el aporte de N dan lugar a los impactos esperados en el crecimiento de las plantas.

Los resultados evidenciaron una correlación significativa entre la deficiencia nutricional inducida y una reducción en el desarrollo vegetativo de las plantas. Este fenómeno se atribuye a la función crítica del N como macronutriente, que actúa como componente esencial en la estructura de diversas moléculas biológicas fundamentales, tales como los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las clorofilas. Estas moléculas son vitales para el funcionamiento y desarrollo adecuado de las plantas, ya que intervienen en procesos cruciales como la síntesis de proteínas y la fotosíntesis, afectando directamente la salud y crecimiento del cultivo (Taiz y Zeiger, 2015).

Los valores de biomasa obtenidos (Figura 7), revelan una clara disminución del peso fresco total en todos los órganos analizados en el cultivar *MoneyMaker* (CV MM). Esta reducción en la biomasa será más acusada en hojas y tallo, donde ya pueden observarse diferencias significativas entre los tratamientos con solución completa y solución con una reducción del 50% N. Sin embargo, en raíces, dicha disminución significativa en biomasa únicamente es observable cuando se alcanzan niveles más extremos del estrés (10% del N suministrado).

Estos resultados pueden relacionarse con que la reducción del suministro de nitrógeno generalmente afecta más a la biomasa de la parte aérea debido a que las hojas y tallos son los principales órganos fotosintéticos y están directamente involucrados en la síntesis de compuestos que requieren nitrógeno, como la clorofila, aminoácidos y proteínas (Taiz y Zeiger, 2015). Además, las raíces muestran una menor disminución en su biomasa ya que, en condiciones de deficiencia, se favorece el crecimiento de la masa radicular en un intento de mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes. Las raíces, además, tienen una menor demanda interna de nitrógeno en comparación con los órganos fotosintéticos, lo que les permite mantener su crecimiento en condiciones de baja disponibilidad de este nutriente (Lynch, 2019). Asimismo, se ha observado que, bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, las plantas modifican sus patrones hormonales, como el aumento de las citoquininas en raíces, lo cual promueve un mayor crecimiento radicular en detrimento de la parte aérea. Esta respuesta hormonal es una forma de adaptación que permite a las plantas explorar un mayor volumen de suelo y, de este modo, compensar la deficiencia del nutriente (Hermans et al., 2006).

Estas evidencias resaltan la relevancia de una adecuada gestión del suministro de nutrientes, especialmente del nitrógeno, para mantener un óptimo desarrollo vegetativo y asegurar el rendimiento esperado del cultivo.

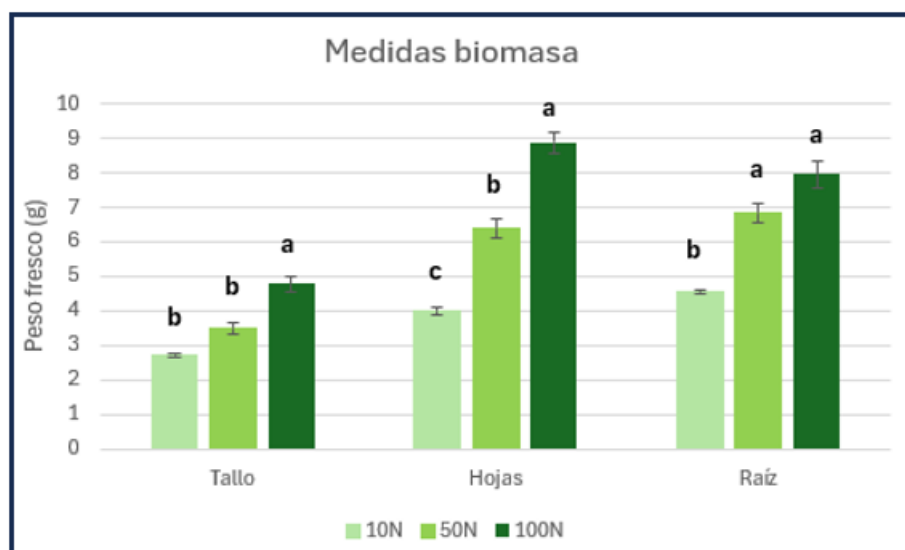


Figura 7: Peso fresco total tras 15 días de cultivo en cámaras con riego diferencial para el cultivo MoneyMaker (CV MM) para cada órgano (tallo, hojas y raíz) y tratamiento (100%N, 50%N y 10%N). Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada órgano entre los distintos tratamientos.

4.3. INFLUENCIA DEL APOORTE DE N EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES

AAPs

Al analizar las expresiones correspondientes a los genes AAPs seleccionados se observó que los patrones de expresión de AAP2 y AAP4 eran similares en todos los tipos de hoja analizados. La expresión de dichos genes incrementa significativamente al disminuir el aporte de N, y es superior en aquellas hojas de edad más joven (Figura 8 y Figura 9). Unificando estos resultados a los obtenidos previamente por el Departamento de Producción Vegetal de la Universitat Politècnica de València (UPV), podrían tratarse de permeasas de alta afinidad capaces de funcionar eficientemente en condiciones de baja disponibilidad de este nutriente (Nacry et al., 2013).

Por otro lado, los resultados obtenidos en el estudio de expresión del gen AAP6 (Figura 10) no mostraron diferencias significativas en el nivel de expresión de estos genes al disminuir el aporte de N, en ninguna de las edades de las hojas analizadas.

El hecho de que exista un patrón de conducta diferencial frente a deficiencias en nitrógeno entre las permeasas estudiadas ya ha sido previamente evidenciado. Esta respuesta se debe a su capacidad adaptativa para mantener la absorción de nutrientes esenciales incluso en condiciones limitantes. La eficiencia de estas proteínas en condiciones de deficiencia de nitrógeno puede variar significativamente entre diferentes

tipos de permeasas, debido a diferencias en su afinidad, regulación y expresión génica (Miller et al., 2007).

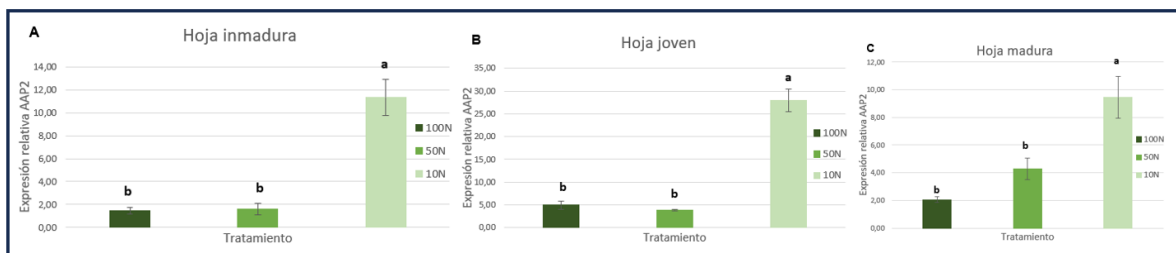


Figura 8: Expresiones del gen AAP2 en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.



Figura 9: Expresiones del gen AAP4 en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

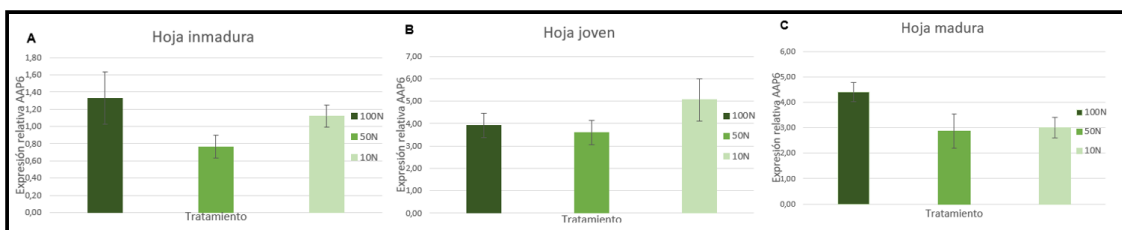


Figura 10: Expresiones del gen AAP6 en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

4.4. INFLUENCIA DEL APOORTE DE N EN LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO

En este estudio se evaluó la expresión de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, específicamente glutamina sintetasa 1 (GS1), glutamina sintetasa 2 (GS2), asparagina sintetasa (ASNS), nitrato reductasa (NR), glutamato deshidrogenasa 2 (GAD2) y glutamato deshidrogenasa (GDH). Estos genes fueron seleccionados debido a su papel clave en la asimilación y el metabolismo del nitrógeno, por lo que se consideró

que su análisis podría proporcionar información complementaria para interpretar los resultados obtenidos en el presente experimento.

Los resultados de la expresión génica que se presentan en el anexo III, no mostraron diferencias significativas en la expresión de estos genes entre los diferentes tratamientos de cultivo y los tipos de hojas analizadas. Esta falta de variabilidad en los resultados podría explicarse, en primer lugar, por la posible exposición insuficiente al estrés por un periodo de tiempo demasiado corto, lo cual no permitiría observar cambios significativos en la expresión génica en respuesta al tratamiento. En segundo lugar, es posible que los errores técnicos o variaciones inherentes al proceso experimental hayan contribuido a enmascarar las diferencias existentes entre los tratamientos. Dada la importancia de estos genes en la regulación del metabolismo del nitrógeno, sería relevante repetir este análisis en futuros ensayos, considerando periodos de exposición al estrés más prolongados y una optimización del protocolo experimental para reducir los posibles errores.

No obstante, hay que destacar la glutamina sintetasa 1 (GS1) cuyos datos de expresión se presentan en la figura 11 y muestran diferencias significativas. La glutamina sintetasa 1 es la isoforma citosólica de la glutamina sintetasa, que cataliza la síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato, utilizando ATP como fuente de energía. Esta reacción es fundamental en la asimilación de amonio, permitiendo la incorporación de este ion tóxico en formas nitrogenadas orgánicas útiles para la planta (Bernard y Habash, 2009).

En su expresión para las distintas edades de la hoja puede verse un ascenso relacionado con la deficiencia en nitrógeno, el cual llega a ser significativo en el caso de la hoja joven. Este hecho podría deberse a que esta enzima es especialmente importante en procesos de reciclaje de nitrógeno durante la senescencia foliar y en la respuesta a estrés, donde contribuye a la movilización del nitrógeno desde los tejidos en descomposición hacia nuevas estructuras vegetativas y reproductivas (Ishiyama et al., 2004). Estudios realizados han demostrado que la expresión y actividad de la glutamina sintetasa 1 (GS1) están reguladas por factores ambientales y fisiológicos, tales como la disponibilidad de nitrógeno y la demanda metabólica de la planta. Por ejemplo, bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, GS1 aumenta su actividad para capturar y reasimilar el amonio liberado internamente, contribuyendo a la conservación del nitrógeno en la planta (Tabuchi et al., 2005).

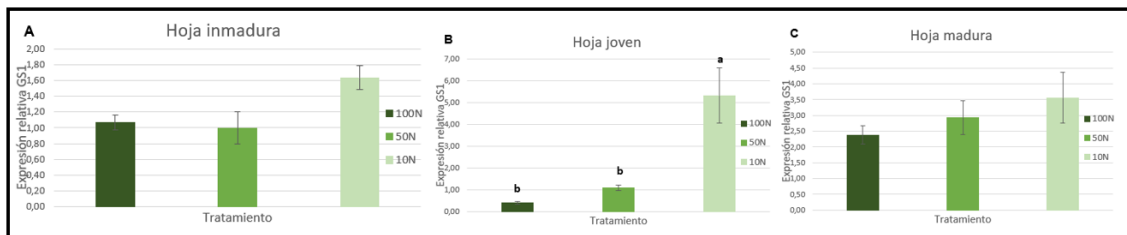


Figura 11: Expresiones del gen GS1 en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

4.5. ANÁLISIS DE DATOS METABOLÓMICOS

El análisis de metabolitos se llevó a cabo en las hojas en diferentes etapas de desarrollo (hoja inmadura, hoja joven y hoja madura) y en el floema asociado a estas hojas.

La concentración de los distintos metabolitos en tejido de diversos tipos de hoja, recogidos en la figura 12, nos indica que el aspartato y el glutamato son componentes principales en los tres tipos de hojas, independientemente del tratamiento suministrado. Este hecho es debido a que ambos aminoácidos tienen una función central en el metabolismo del nitrógeno y en la biosíntesis de aminoácidos, siendo intermediarios clave en su asimilación, precursores de otros aminoácidos, y ayudando a regular el equilibrio homeostático y metabólico (Miller y Cramer, 2005; Tognetti et al., 2006; Lea y Mifflin, 2011).

También puede observarse de manera generalizada un descenso en la concentración de los metabolitos directamente relacionado con la disminución del nitrógeno suministrado, dicha bajada puede ser más acusada como en el caso del aspartato, o tratarse de un proceso más tamponado como ocurre con la serina. Esta disminución se debe a que la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos y proteínas se reduce, ya que hay un menor suministro de nitrógeno disponible para estas vías (Nunes-Nesi et al., 2010). Durante la deficiencia de nitrógeno, se promueve la degradación de proteínas para liberar aminoácidos que puedan ser reasimilados y utilizados en procesos vitales, como la síntesis de clorofila y otros metabolitos esenciales, lo que contribuye a una disminución de la concentración de aminoácidos libres en los tejidos. (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Hay que señalar una mayor concentración de aminoácidos en las hojas en desarrollo que en las hojas maduras, siempre que la condición de cultivo no sea de deficiencia severa de N (10%).

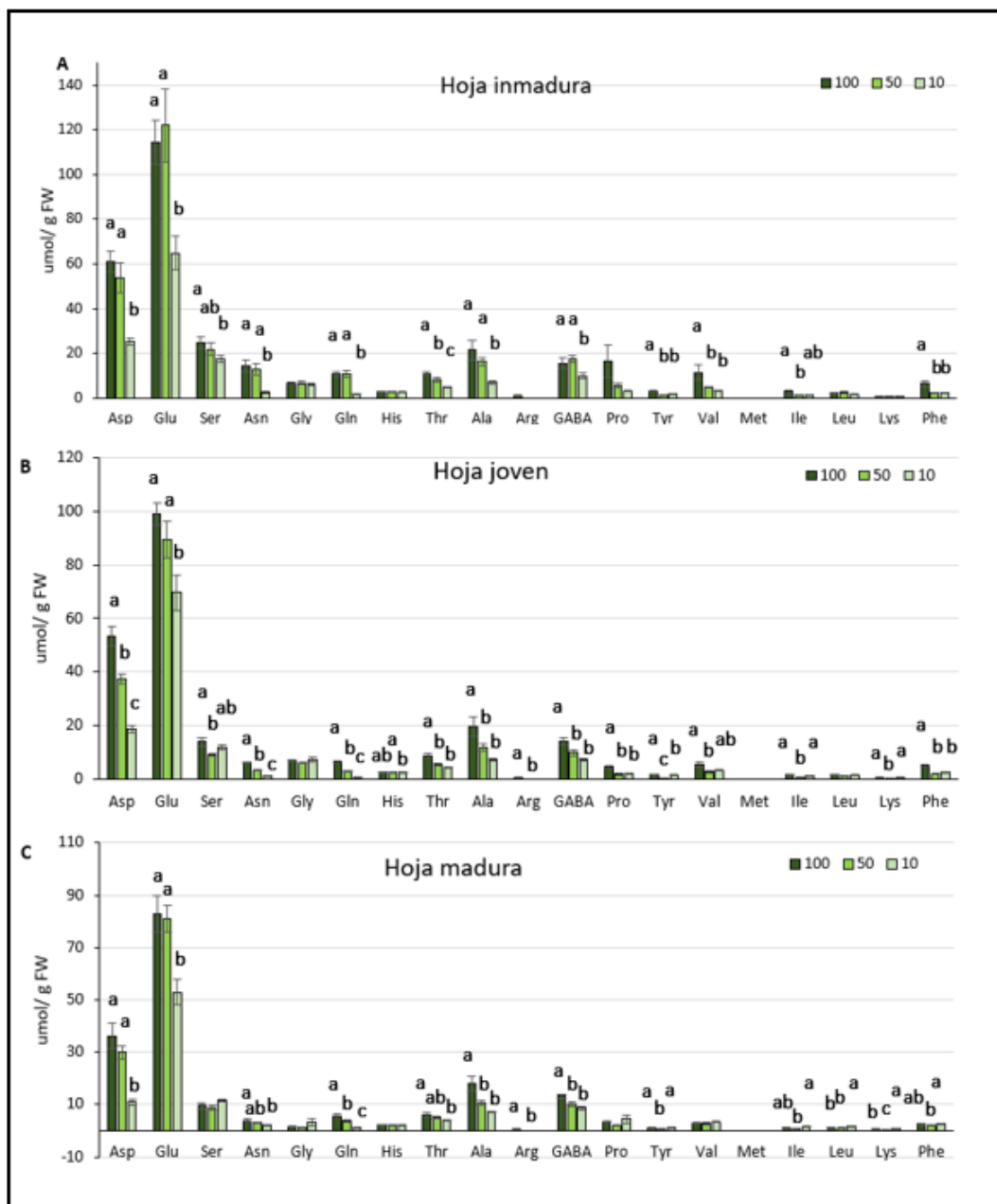


Figura 12: Concentraciones de los distintos metabolitos analizados en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura).

En los distintos fluidos floemáticos analizados (Figura 13), se observa una elevada concentración de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y prolina, con roles importantes en la respuesta al estrés (Bouché y Fromm, 2004) y función osmoprotectora (Miller et al., 2009). Los aminoácidos más abundantes en floema son glutamina, GABA, aspartato y glutamato. Cabe destacar la elevada concentración de glutamina (Gln) en el fluido floemático de las hojas inmaduras, donde al tratarse de órganos con crecimiento activo la demanda de nitrógeno es elevada y, por lo tanto, actuaría como transportador y suministrador del mismo a este tipo de tejidos (Lea et al., 2007).

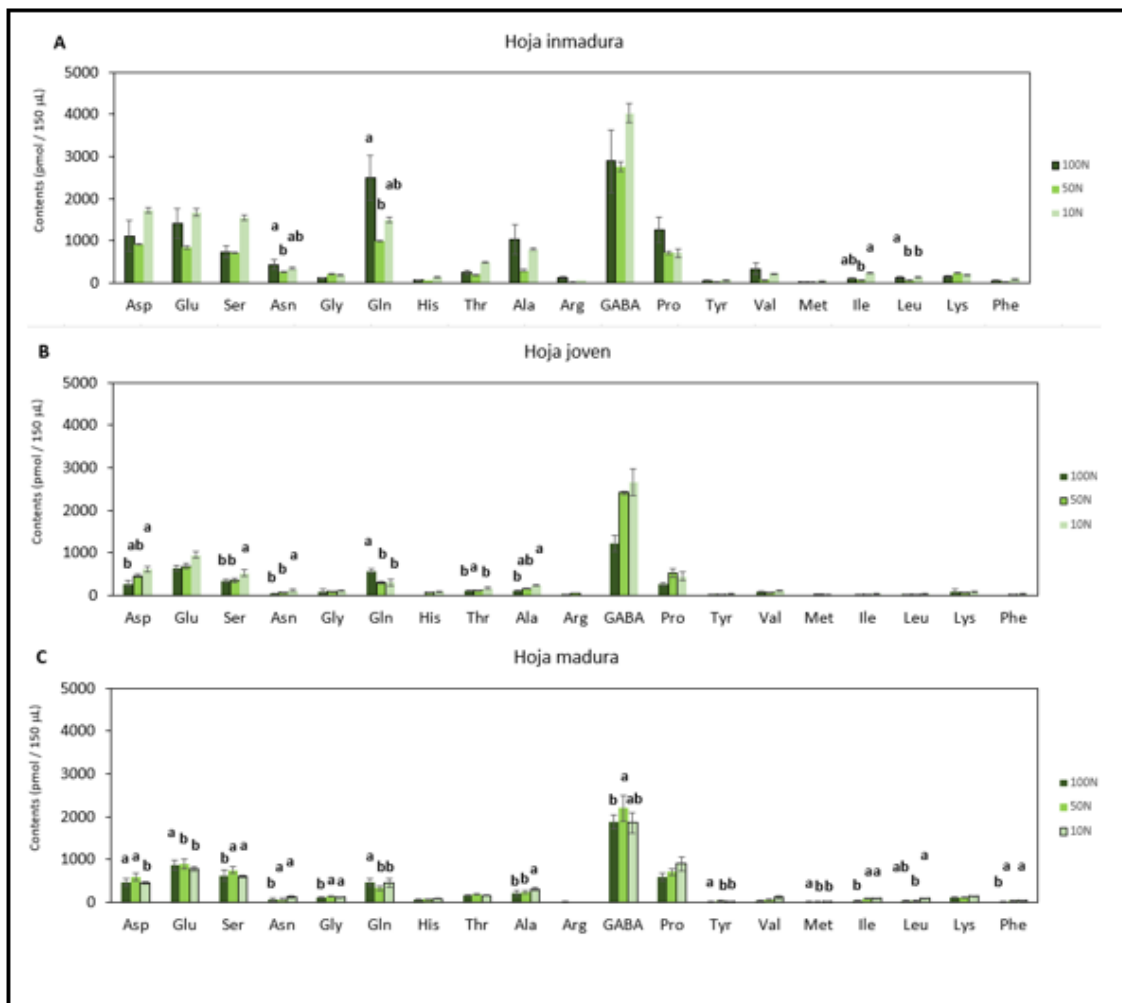


Figura 13: Concentraciones de los distintos metabolitos analizados en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en el fluido floemático próximo a los distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura).

4.6 ANÁLISIS COLECCION VARITOME

4.6.1 Análisis de haplotipos

El análisis de los haplotipos se realizó atendiendo a la historia evolutiva del cultivo de tomate, y clasificando cada una de las entradas de la colección *Varitome* usando como guía filogenias inferidas a partir de análisis poblacionales y de tamaño de fruto. De esta forma, se compararon las secuencias nucleotídicas de todas las accesiones para cada gen, identificando los haplotipos y las frecuencias de aparición de cada uno de ellos en las variedades estudiadas (Figura 14).

En esta figura, las variedades se encuentran ordenadas cronológicamente, de manera que es posible ver la aparición y desaparición de los distintos haplotipos, así como sus cambios de frecuencias como consecuencia de los procesos evolutivos y del propio mecanismo de domesticación. Puede comprobarse que actualmente la gran may

oría de genes de esta familia de permeasas únicamente presentan un haplotipo, exceptuando AAP2, AAP3 y AAP6.

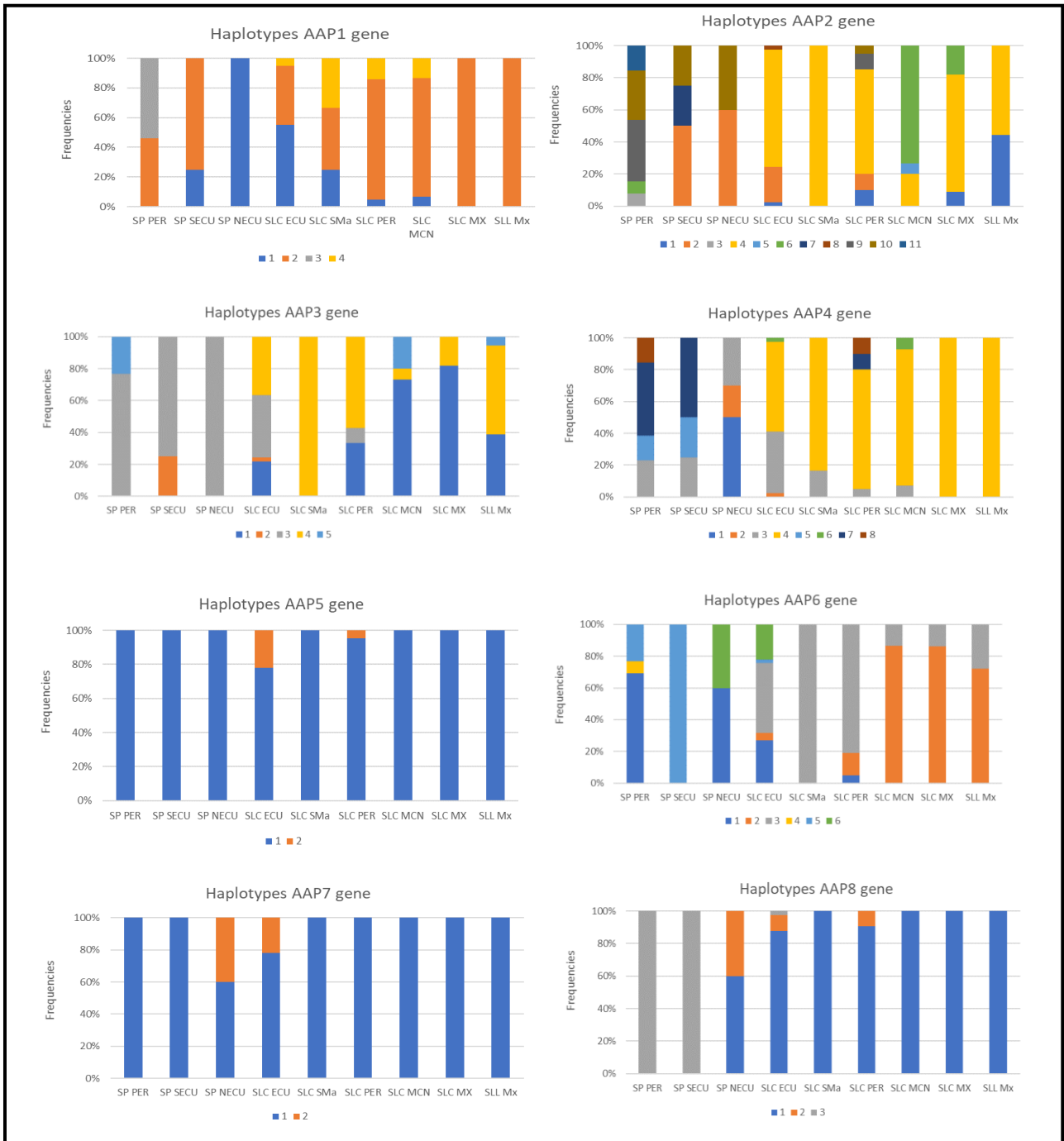


Figura 14: Frecuencias de haplotipos para cada una de las permeasas de la familia de las AAP a lo largo de la historia evolutiva del tomate.

4.6.2 Análisis estructural *in silico*

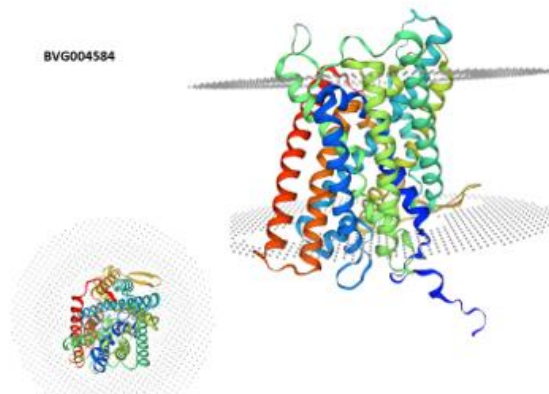
Cada uno de los haplotipos fue traducido a sus respectivas secuencias aminoacídicas, donde se estudió la presencia de mutaciones sinónimas y no sinónimas, interesando éstas últimas y las posibles variantes de aminoácidos que podrían generar, y con ello la posibilidad de afectar a la estructura final de la proteína.

Mediante el servidor SWISS-MODEL se obtuvo la anotación estructural de cada una de las permeasas pertenecientes a la familia de las AAPs. Como cabría esperar, al tratarse de proteínas transmembrana, en sus estructuras se pueden identificar los dominios de alfa-hélice que se insertan en la membrana y están formados por secuencias de aminoácidos que son hidrofóbicos, lo que permite que estas regiones atraviesen el entorno lipídico de la membrana sin ser desnaturalizadas (Huang, 2004).

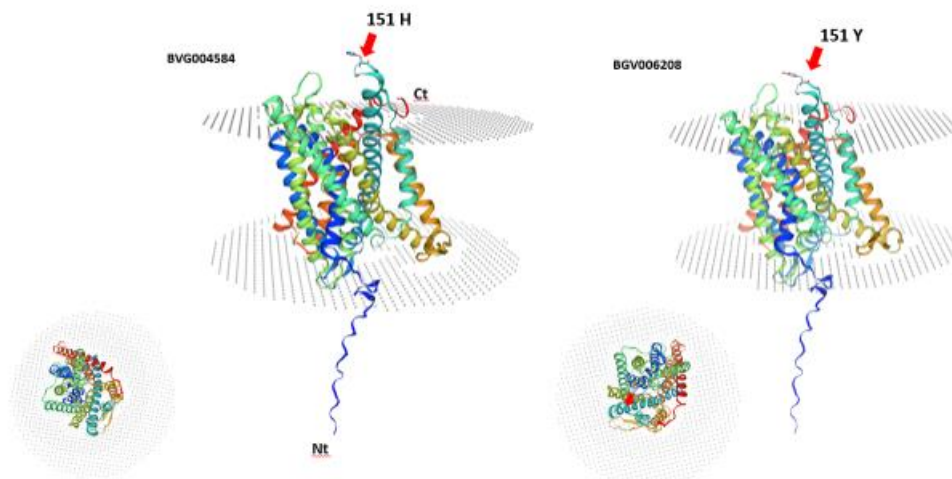
Sobre estas estructuras tridimensionales se incluyó, en aquellas que así lo requerían, sus variantes, indicando la posición y el aminoácido mutado en cada uno de los casos tal y como queda recogido en la figura 15.

Puede verse que la proteína AAP1 y la AAP8 son las únicas que no presentan variantes, por otro lado, AAP2, AAP5 (la cual se trata de una proteína truncada), AAP6 y AAP7 contarían con 2 variantes, AAP3 tendría 4 variantes mientras que AAP4 tendría 7. Dentro de estas variaciones estructurales no parecen mutaciones de gran relevancia, y faltaría por determinar si estos cambios algún caso podrían tener un efecto en la capacidad de transporte o de regulación del transporte.

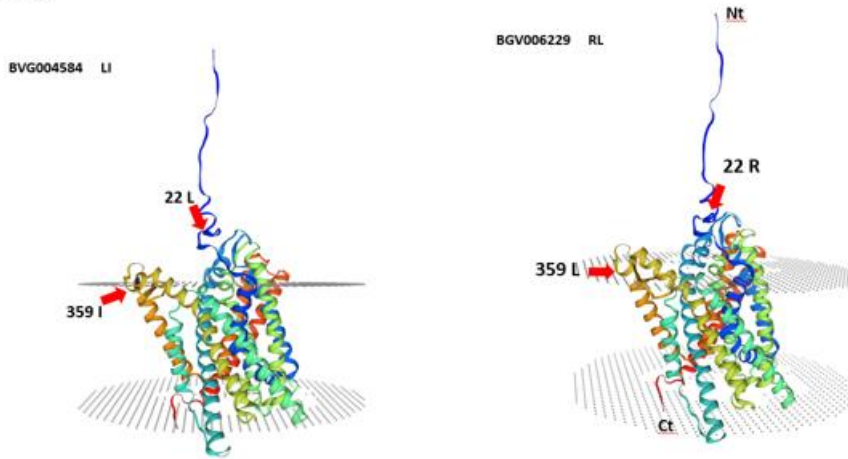
AAP1



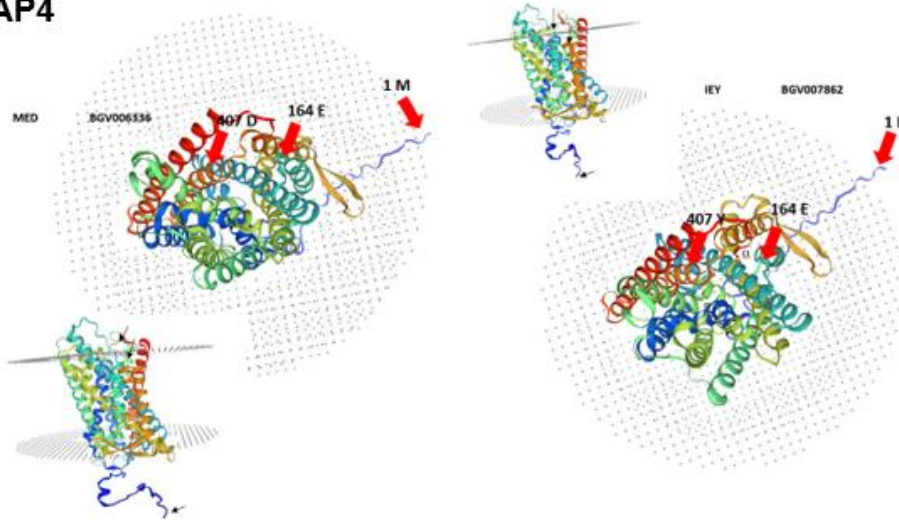
AAP2



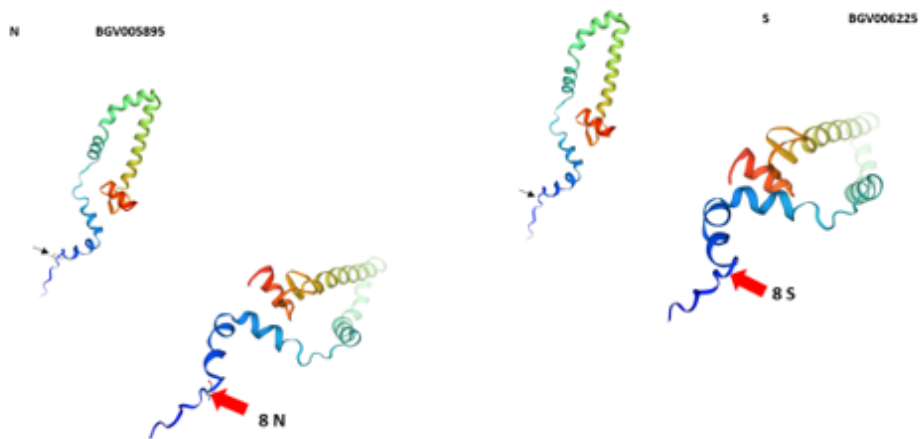
AAP3



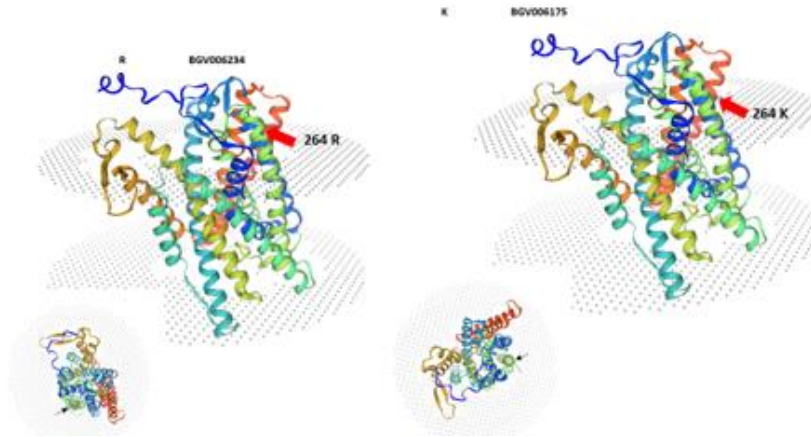
AAP4



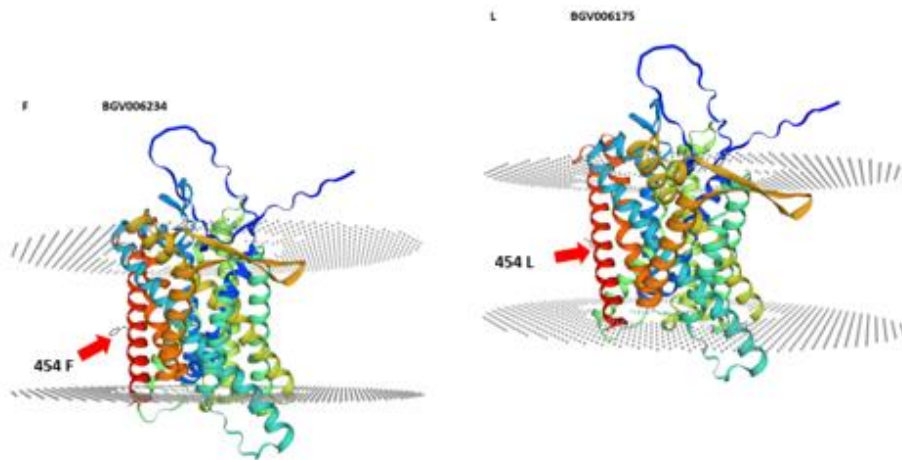
AAP5



AAP6



AAP7



AAP8

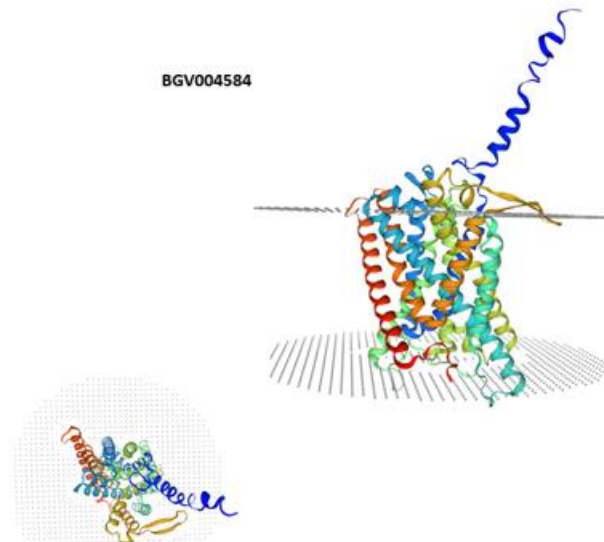


Figura 15: Anotación estructural de las 8 permeasas de la familia AAP, con sus respectivas variantes, obtenidas mediante el servidor SWISS-MODEL

5. CONCLUSIONES

La biomasa de la planta de tomate depende de la disponibilidad de N, aunque la respuesta es diferente entre los distintos órganos. La variación en los parámetros relacionados con la fotosíntesis, como el contenido en clorofilas, el índice de vigor de planta NDVI, o la eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm), en función de la disponibilidad de N, explica parcialmente las variaciones en biomasa observadas. Esta respuesta se ve afectada por el estadio de desarrollo de la hoja.

El contenido en aminoácidos de la hoja depende de la disponibilidad de N y el estado de desarrollo de la misma. Se ha observado una mayor concentración de aminoácidos en las hojas en desarrollo, como principales sumideros durante el crecimiento vegetativo de la planta. De forma general, el contenido de aminoácidos en las hojas disminuye con su expansión.

En tomate, los principales aminoácidos transportados por el floema son glutamina, glutamato y GABA, y el perfil no varía sustancialmente con la disponibilidad de N. La concentración de aminoácidos transportados es mayor en las hojas desarrolladas.

Las permeasas AAP2, AAP4 y AAP6, principales responsables de la carga de aminoácidos en la hoja, presentan patrones de expresión diferenciales, aumentando en el caso de las dos primeras, su expresión al disminuir el aporte de N, como también lo hace el gen GS1, relacionado con la movilización de este elemento.

El análisis de las secuencias nucleotídicas en accesiones de *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var *cerasiforme* y *S. lycopersicum* ha mostrado cambios en los haplotipos de las 8 permeasas AAP de tomate durante el proceso de domesticación. Aunque algunas de las mutaciones provocan cambios en la secuencia de aminoácidos, las modelizaciones realizadas no parecen indicar cambios importantes en la estructura de la permeasa.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bernard, S. M., & Habash, D. Z. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, *182*(3), 608-620.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*, *7*(10), e48198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048198>
- Bouché, N., & Fromm, H. (2004). GABA in plants: Just a metabolite? *Journal of Experimental Botany*, *55*(396), 96-103.
- Evans, J. R., & Clarke, V. C. (2019). The nitrogen cost of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *70*(1), 7-15.
- FAO. (2023). Global tomato production statistics. Retrieved from <https://www.fao.org>.
- Fischer, W. N., & Lütke-meier, M. (2002). Characterization of the amino acid transport systems in pea (*Pisum sativum*) and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 45692-45701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208364200>
- Guimarães, V. F., Souza, C. M., & Ribeiro, N. D. (1999).
- Hawkesford, M. J., Barraclough, P., & De Kok, L. J. (2012). *Molecular physiology of plant mineral nutrition*. Springer Science & Business Media.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., & Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, *11*(12), 610-617.
- Huang, J. (2004). Molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *33*, 297-319.
- IPCC. (2021). *Climate change 2021: The physical science basis*. Contribution of Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.
- Ishiyama, K., Hayakawa, T., Hayashi, H., & Chino, M. (2004). Involvement of cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice. *Planta*, *220*(4), 622-629.
- Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2006). Nitrogen use efficiency: Challenges, strategies, and prospects. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2), 187-198.

- <https://doi.org/10.1093/jxb/erj056>Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (2007). Nitrogen metabolism in plants. *Plant Physiology*, 122(3), 865-876.
- Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (2011). Nitrogen metabolism in plants. *Plant Physiology*, 122(3), 865-876.
- Lea, P. J., Mifflin, B. J. (2007). Nitrogen metabolism in plants. *Plant Physiology*, 122(3), 865-876.
- Léran, S., & Boucherez, J. (2014). Characterization of the AAP family in tomato and *Arabidopsis* reveals their involvement in amino acid transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.05.001>
- Lynch, J. P. (2019). Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture. *New Phytologist*, 223(2), 548-564.
- MAGRAMA. (2023). Informe sobre la producción agrícola en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Marschner, H. (2012). *Mineral nutrition of higher plants* (3rd ed.). Academic Press.
- Marschner, P. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd ed.). Academic Press.
- 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. *Annals of Botany*, 105(7), 1141-1157. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq028>
- MEGA Software. (n.d.). MEGA Software. Retrieved September 6, 2024, from <https://www.megasoftware.net/>
- Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 274(1-2), 1-36.
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2297-2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm113>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2009). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*, 32(2), 270-280.

Nacry, P., Bouguyon, E., & Gojon, A. (2013). Nitrogen acquisition by roots: Physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 370(1-2), 1-29.

Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Stitt, M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant*, 3(6), 973-996.

Ortiz-Lopez, A., Chang, H.-C., & Bush, D. R. (2000). Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2), 275-280. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-0)

Primer3Plus. (n.d.). *Primer3Plus*. Retrieved September 6, 2024, from <https://www.primer3plus.com/index.html>

Renau-Morata, B., Molina, R. V., Minguet, E. G., Cebolla-Cornejo, J., Carrillo, L., Marti, R., Garcia Carpintero, V., Jiménez-Benavente, E., Yang, L., Cañizares, J., Canales, J., Medina, J. & Nebauer, S. G. (2021) Integrative Transcriptomic and Metabolomic Analysis at Organ Scale Reveals Gene Modules Involved in the Responses to Suboptimal Nitrogen Supply in Tomato. *Agronomy*, 11(7). 1320.

Rouse, J. W., Haas, R. H., Schell, J. A., & Deering, D. W. (1974). Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. *NASA Spec. Publ*, 351(1), 309.

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100(1-3), 179-196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-6)

Sundberg, E., Svensson, S., & Persson, S. (2000). Amino acid transporters in plants: Structure and function. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(5), 325-335. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01226-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01226-6)

Swiss-Model. (n.d.). Swiss-Model: The Swiss online tool for protein modeling. Retrieved September 6, 2024, from <https://swissmodel.expasy.org/>

Tabuchi, M., Sugiyama, K., Ishiyama, K., Inoue, E., Sato, T., Takahashi, H., ... & Yamaya, T. (2005). Severe reduction in cytosolic glutamine synthetase activity reduces growth and grain filling in rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 46(5), 661-671.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5th ed.). Sinauer Associates.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2015). *Plant physiology and development* (6th ed.). Sinauer Associates.

TASSEL. (n.d.). TASSEL: A software tool for analyzing and visualizing high-throughput genetic data. Retrieved September 6, 2024, from <https://tassel.bitbucket.io/>

Tegeder, M., & Masclaux-Daubresse, C. (2018). Transport and metabolism of nitrogen in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 1-35. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040312>

Tognetti, J. A., Fernandez, R. E., & Galatro, A. (2006). Aspartate and asparagine metabolism in plants: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 57(7), 1395-1411.

World Health Organization (WHO). (2017). *Nitrate and nitrite in drinking-water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*. World Health Organization.

Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 153–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105532>

Yuan, L., & Zhang, L. (2020). Nitrogen uptake, translocation, and assimilation in plants: Pathways and regulatory networks. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1324. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01324>

ANEXOS

Anexo I: El uso abusivo de fertilizantes nitrogenados en la agricultura tiene una relación directa y significativa con varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por las Naciones Unidas:

- ODS 2: Hambre Cero. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición, promover la agricultura sostenible.
- ODS 6: Agua Limpia y Saneamiento. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todas las personas.
- ODS 13: Acción por el Clima. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.
- ODS 14: Vida Submarina. Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.
- ODS 15: Vida de Ecosistemas Terrestres. Gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.

Anexo II: Secuencias y concentraciones de los cebadores empleados

Tabla 1: Secuencias de cebadores diseñadas con el programa Primer3Plus

Cebador	Secuencia
AAP2 <i>primer</i> directo	CTTAGTGGTGCTTGCCTTGT
AAP2 <i>primer</i> reverso	TCCAGCAAAGAACCAGCAG
AAP4 <i>primer</i> directo	GAGCTGGACTTGTTTGATCGT
AAP4 <i>primer</i> reverso	ATCAGTTGCAAGTCCCTGGAT
AAP6 <i>primer</i> directo	GGAGCTTGGACAAGAAAATGG
AAP6 <i>primer</i> reverso	TTGATCCAATCAACCCAGT
Glutamina sintetasa 1 <i>primer</i> directo	ATTGGCGGTTTTCTGGCCC
Glutamina sintetasa 1 <i>primer</i> reverso	ACTGTCCCGGCATGACTTCACC
Glutamina sintetasa 2 <i>primer</i> directo	CGCCCAGCTTCAAACATGGACC
Glutamina sintetasa 2 <i>primer</i> reverso	AGCTTCAGCCTCAAGGGTTGGC
Asparagina sintetasa <i>primer</i> directo	TCCTTCTGGTAGGGCTGCTA
Asparagina sintetasa <i>primer</i> reverso	GCAACACCGGATAGATGGTT
Nitrato reductasa <i>primer</i> directo	CGGTTCGTGGTTGCACTTC
Nitrato reductasa <i>primer</i> reverso	CCAATTATCAGCGGTACCTTC
Glutamato deshidrogenasa 2 <i>primer</i> directo	CGTCGTTGTACCACCACTACGC
Glutamato deshidrogenasa 2 <i>primer</i> reverso	ACGCGAAAGTCGAGTGAACGG
Glutamato deshidrogenasa <i>primer</i> directo	GGTACAGCACGACAATGCAC
Glutamato deshidrogenasa <i>primer</i> reverso	CATCAGGATCAACCTCCGGG
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa <i>primer</i> directo	TGGTGCTGACTTCGTTGTTG
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa <i>primer</i> reverso	CCACAACAAACATGGGAGCA

Tabla 2: Concentraciones de cebadores empleados sus respectivas qPCR.

Cebador	Concentración (nM)
AAP2 <i>primer</i> directo	300
AAP2 <i>primer</i> reverso	300
AAP4 <i>primer</i> directo	300
AAP4 <i>primer</i> reverso	300
AAP6 <i>primer</i> directo	300
AAP6 <i>primer</i> reverso	300
Glutamina sintetasa 1 <i>primer</i> directo	300
Glutamina sintetasa 1 <i>primer</i> reverso	300
Glutamina sintetasa 2 <i>primer</i> directo	300
Glutamina sintetasa 2 <i>primer</i> reverso	300
Asparagina sintetasa <i>primer</i> directo	300
Asparagina sintetasa <i>primer</i> reverso	300
Nitrato reductasa <i>primer</i> directo	200
Nitrato reductasa <i>primer</i> reverso	200
Glutamato deshidrogenasa 2 <i>primer</i> directo	300
Glutamato deshidrogenasa 2 <i>primer</i> reverso	300
Glutamato deshidrogenasa <i>primer</i> directo	400
Glutamato deshidrogenasa <i>primer</i> reverso	400
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa <i>primer</i> directo	100
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa <i>primer</i> reverso	100

Anexo III: Datos no significativos de expresión relativa de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno

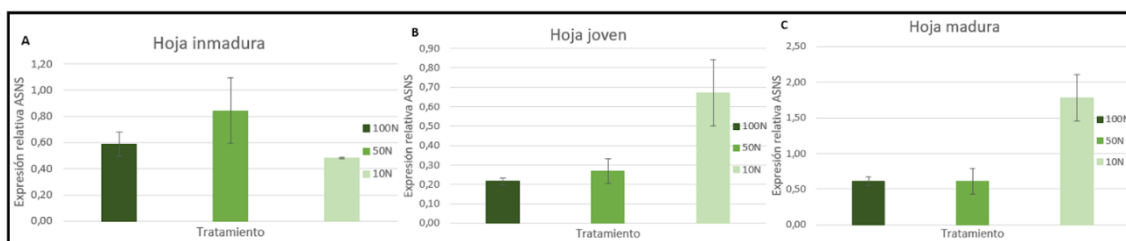


Figura 16: Expresiones del gen ASNS en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

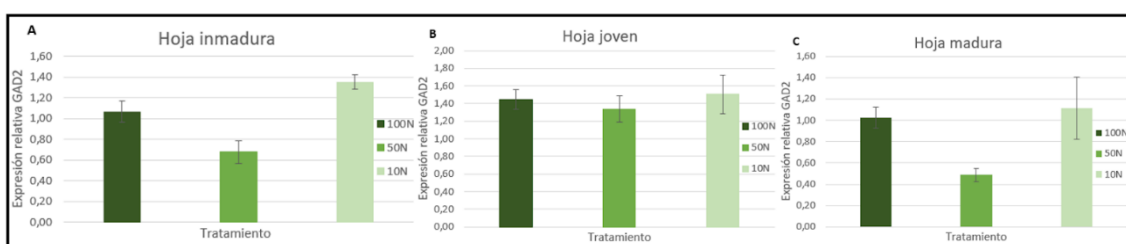


Figura 17: Expresiones del gen GAD2 en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

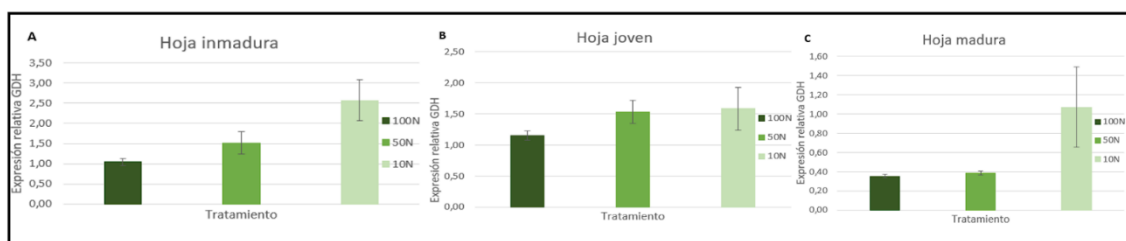


Figura 18: Expresiones del gen GDH en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

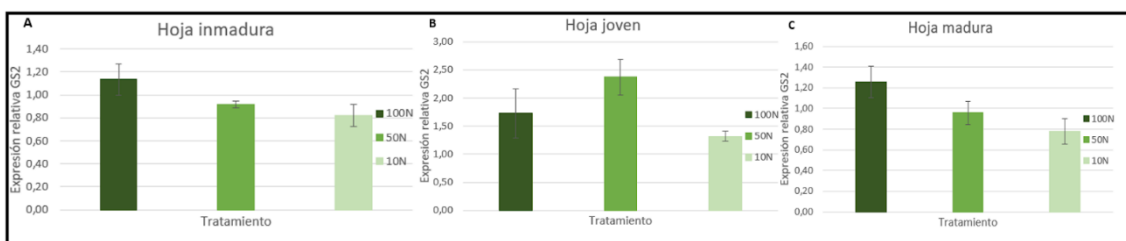


Figura 19: Expresiones del gen GS2 en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

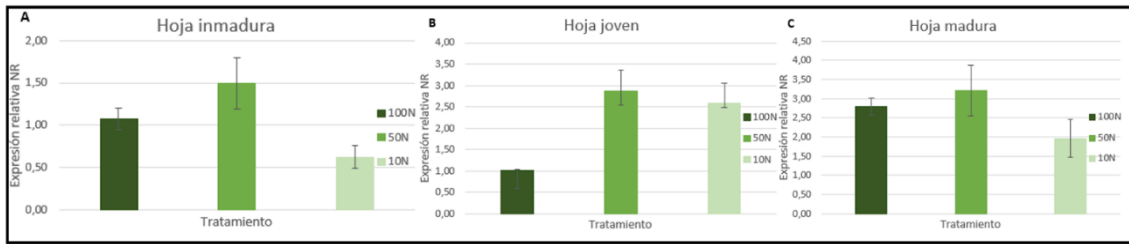


Figura 20: Expresiones del gen NR en condiciones diferenciales de nitrógeno (100%N, 50%N y 10%N), y en distintos estadios de desarrollo de la hoja (A: Hoja inmadura, B: Hoja joven y C: Hoja madura), obtenidas por medio de qPCR. Las letras hacen referencia a las diferencias significativas dentro de cada tipo de hoja entre los distintos tratamientos.

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

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

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

***Utilice tantas páginas como sea necesario.