



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

Papel de las citoquininas en la regulación de las
permeasas de aminoácidos de tipo AAP en respuesta a la
variación en la disponibilidad de nitrógeno de tomate

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Surian Marco, Lara

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a: Molina Romero, Rosa Victoria

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Papel de las citoquininas en la regulación de las permeasas de aminoácidos de tipo AAP en respuesta a la variación en la disponibilidad de nitrógeno de tomate.

RESUMEN

Las plantas disponen de mecanismos moleculares que detectan la disponibilidad de especies de nitrógeno (N) en el suelo, y adaptan su fisiología para optimizar su crecimiento a través de procesos como la asimilación del N, su distribución y su uso. Las citoquininas (CKs) participan en la señalización desde la raíz al vástago de los niveles de N en el suelo, además de ser reguladores de la fuerza de sumidero de los órganos y controlar, en las hojas, la partición de foto asimilados como azúcares y aminoácidos. Las permeasas de aminoácidos de la familia AAP son clave en diversas especies, en la distribución de aminoácidos entre fuentes y sumideros. Resultados previos en tomate han mostrado, a su vez, que su actividad depende de la disponibilidad de N. Con objeto de estudiar la implicación de ciertas permeasas (AAP2, AAP4 y AAP6) en las variaciones en el crecimiento que sufren las plantas de tomate en función del aporte de N y la posible mediación de las CKs, se ha establecido un protocolo de cultivo que permite contrastar los cambios en partición de biomasa y parámetros fotosintéticos asociados a una reducción de N y la afectación de este proceso por la aplicación de CKs. Se puede obtener una respuesta diferencial trabajando con plantas de 40 días, cultivadas en medio con concentración óptima de N (100N) de 8 mM o con un 50% de dicha concentración (50N); y sobre las que se realizan 3 aplicaciones de la CK trans-zeatina (10 μ M) en hojas. Tras 17 días de fertilización diferencial se puede observar una respuesta fisiológica diferencial y estudiar la variación en la expresión de las permeasas asociada. Las CKs producen una mayor partición de foto asimilados a las hojas jóvenes tratadas y pueden recuperar parcialmente la pérdida de biomasa que provoca la disminución en el aporte de N. La variación en la expresión de las permeasas AAP2 y AAP4 no está asociada a la variación en el aporte de N, pero disminuye con la aplicación de CKs en hojas jóvenes. La AAP6 sí que podría estar asociada a la respuesta al N, incrementando su expresión en condiciones de bajo aporte y aumentando su expresión al aplicar trans-zeatina. Estos resultados señalan que la AAP6 podría estar implicada en la señalización del nivel de N mediado por las CKs y ser una diana de interés en trabajos dirigidos a incrementar la eficiencia en el uso de N (NUE) en tomate.

Palabras claves

Tomate | Citoquininas | AAPs | Partición foto asimilados | NUE

Alumna: Dña. Lara Surian Marco

Tutor: Prof. D. Sergio González Nebauer

Cotutor: Prof. Dña. Rosa Victoria Molina Romero

Curso académico 2023-2024

Valencia, mes de septiembre de 2024

Role of cytokinins in the regulation of AAP-type amino acid permeases in response to variation in nitrogen availability in tomato.

ABSTRACT

Molecular mechanisms in plants detect the availability of nitrogen (N) in the soil and adapt their physiology to optimize their growth through processes such as N assimilation, distribution and use. Cytokinin's (CKs) are molecular mechanisms that regulate the sink strength of organs and control the partitioning of nutrients such as sugars and amino acids (aas) in leaves. These hormones also participate in root-to-shoot signalling of N levels in the soil. The amino acid permeases of the AAP family, whose activity has been shown to depend on N variability in previous studies with tomato plants, are key components in the distribution of aas between sources and sinks in several plant species. In order to study the involvement of three permeases (AAP2, AAP4 and AAP6) in N-dependent growth of tomato plants and the possible mediation of CKs, a culture protocol has been established that allows contrasting the changes in biomass partition and photosynthetic parameters associated with a reduction of N levels, and the impact of this process by the application of CKs. Significant differences in these levels can be obtained by working with 40-day-old plants grown in a medium with an optimal concentration of N of 8mM (100N), or with 50% concentration (50N), and 3 applications of trans-zeatin (tZ) CK (10 μ M) in the leaves. These differences in physiological response between treatments and thus the variation in the expression of the associated permeases can be studied after 17 days of treatment. The results show that a decrease in N levels produces a greater partition of photo assimilates and nutrients to the younger parts of the plant, making the plant able to partially recover the loss of biomass caused by this depletion. The variation in the expression of permeases AAP2 and AAP4 is not associated with the variation in N availability but decreases with the application of CKs in young leaves. AAP6 could be associated with the response to varying N levels, increasing its expression in low-supply conditions and increasing when applying tZ. Thus, AAP6 could be involved in N level signalling mediated by CKs and be a target of interest in future works aimed at increasing the efficiency of N use (NUE) in tomato.

Key words

Tomato | Cytokinin | AAPs | Photo assimilates partition | NUE

Student: Ms. Lara Surian Marco

Tutor: Prof. Sergio González Nebauer

Academic year 2023-2024

Co-tutor: Prof. Rosa Victoria Molina Romero

Valencia, september of 2024

Agradecimientos

A mi hermana por haberme apoyado durante
todo el proceso,

A mis tutores Sergio y Savi por hacer tiempo
para resolver todas mis dudas

Y a mis amigos, que cuando estoy con ellos todo
parece más fácil.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Importancia económica del tomate	1
1.2. Fertilización nitrogenada en la agricultura	1
1.3. Captación, asimilación y transporte de N en la planta.....	2
1.4. Regulación de la partición de aas en respuesta a la disponibilidad de N.....	5
2. Materiales y métodos	7
2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	7
2.2. Aplicación de tZ en hojas y raíces	8
2.3. Muestreo de biomasa fresca y peso seco	8
2.4. Medidas de parámetros fisiológicos.....	9
2.5. Trituración del material vegetal.....	9
2.6. Extracción de ARN y síntesis de cADN.....	9
2.7. Cuantificación del nivel de expresión por RT-qPCR	10
2.8. Análisis estadístico de los resultados	10
3. Resultados.....	10
3.1. Respuestas a corto plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre parámetros de crecimiento de la planta	11
3.2. Respuestas a corto plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre los parámetros fotosintéticos de la planta	12
3.3. Respuestas a largo plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre la biomasa ...	15
3.4. Respuestas a largo plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre los parámetros fotosintéticos de la planta	17
3.5. Correlaciones entre la biomasa y los parámetros fotosintéticos estudiados.....	20
3.6. Efecto de la disponibilidad de N y del tratamiento de citoquininas en la expresión de las permeasas AAP2, AAP4 y AAP6 en hoja. Interacción con el carácter fuente/sumidero de la misma	21
4. Discusión	23
5. Conclusiones.....	27
6. Bibliografía	28
7. ANEXOS.....	
7.1. ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030	
7.2. ANEXO II. Concentración y calidad del ARN	
7.3. ANEXO III. Primers utilizados para cuantificar las permeasas AAP2, AAP4 y APP6, y el gen housekeeping GADPH	
7.4. ANEXO IV. Correlaciones Pearson Producto-Momento de los parámetros evaluados.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Papel de las citoquininas como moléculas señalizadoras sistémicas entre la raíz y el vástago.	6
Figura 2: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en la biomasa total y de los distintos órganos de plantas de tomate MM, a los 3 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	12
Figura 3: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en los parámetros fotosintéticos de hoja joven de plantas de tomate Money Maker, a los 3 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	13
Figura 4: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en los parámetros fotosintéticos de hoja madura de plantas de tomate Money Maker, a los 3 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	14
Figura 5: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en la biomasa total y de los distintos órganos de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	16
Figura 6: Porcentaje del peso seco de los distintos órganos de la planta entre tratamientos, en relación a la biomasa total, en los distintos tratamientos ensayados.	16
Figura 7: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en los parámetros fotosintéticos de hoja joven de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	18
Figura 8: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en los parámetros fotosintéticos de hoja madura de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	19
Figura 9: Efecto del aporte de N y de la aplicación de citoquininas en los parámetros fotosintéticos de hoja inmadura de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	20
Figura 10: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en los niveles de expresión de AAP2 y AAP4 en relación al gen 'housekeeping' GADPH en hojas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	22
Figura 11: Efecto del aporte de nitrógeno y de la aplicación de citoquininas en los niveles de expresión de AAP6 en relación al gen 'housekeeping' GADPH en hojas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada.	23

7. ANEXOS.....

Figura S1: Coeficientes de correlación estimados de Pearson producto-momento.	
--	--

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos del experimento.....	8
Tabla 2: Secuencias de cebadores y sus respectivas concentraciones.	10
Tabla 3: Coeficientes de correlación estimados de Pearson producto-momento entre la biomasa y los parámetros fotosintéticos concentración de clorofilas, antocianinas, flavonoides, NBI, NDVI y Fv/Fm.	21
7. ANEXOS.....	.
Tabla S1: ODS relacionados con el trabajo.	
Tabla S2: Concentraciones y calidades del RNA.	
Tabla S3: Correlaciones momento producto de Pearson entre cada par de variables.	

NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

MM	Moneymaker
N	Nitrógeno
CKs	Citoquininas
tZ	Trans-Zeatina
NUE	Eficiencia en el Uso de Nitrógeno
AAP	Permeasa de aminoácidos
aas	Aminoácidos
Fv/Fm	Eficiencia fotosintética máxima del PSII
NBI	Índice de balance de nitrógeno
NDVI	Índice de vegetación de diferencia normalizada
H-tZ	Tratamiento de aplicación de trans-Zeatina en hoja
R-tZ	Tratamiento de aplicación de trans-Zeatina en raíz

1. Introducción

1.1. Importancia económica del tomate

Después de la patata, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es el segundo cultivo más importante del mundo. En 2022 se dedicaron 4.917.735 hectáreas a su producción a nivel mundial, siendo ésta de 186 millones de toneladas (t) (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2023). De la producción mundial de tomate Europa acumula el 11% y, concretamente, España es el décimo productor principal con 3.651.940 t (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2023). En el periodo de 2021/22, España dedicó el 37% de su superficie de invernadero al cultivo de esta hortaliza, destacando Andalucía, Murcia y la Comunidad Valenciana como los principales productores. Fue la tercera hortaliza de invernadero más exportada generando el 25,7% de los beneficios totales (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [MAPA], 2023).

1.2. Fertilización nitrogenada en la agricultura

El nitrógeno (N) es un elemento fundamental para el crecimiento y el desarrollo de las plantas ya que forma parte de biomoléculas como los ácidos nucleicos o las proteínas (Tegeder y Masclaux-Daubresse, 2018; Stein y Klotz, 2016). Inicialmente, la disponibilidad de este elemento estaba regulada por la actividad microbiana y el uso de abonos orgánicos, pero, con el desarrollo del proceso Haber-Bosch, en 1909, de fijación del nitrógeno en amonio (NH_4^+), el 45% del nitrógeno suministrado pasó a ser de origen antropogénico y se cuadruplicó la productividad de los cultivos. Este proceso permite alimentar al 48% de la población mundial actualmente. Sin embargo, el abuso del uso de estos fertilizantes químicos ha contribuido de forma significativa a la degradación ambiental (Stein y Klotz, 2016; Cordis, 2010).

En agricultura, el N se puede aplicar en sus formas inorgánicas, nitratos (NO_3^-) y amonios, y orgánicas, urea, aminoácidos (aas) y péptidos pequeños. Sin embargo, las formas mayoritarias de aplicación son nitratos, urea y amonio. En suelos aeróbicos, los nitratos son la forma más abundante del N, con una concentración de 1-5 milimolares (mM) (Muratore *et al.*, 2021). El tomate requiere de aproximadamente una aportación de 220 kg/ha de fertilizante para un óptimo desarrollo de biomasa y fructificación (Zotarelli *et al.*, 2009). Sin embargo, cerca del 60% del N aportado en la fertilización no es absorbido por la planta, ya que, mientras que el amonio es liberado lentamente por las partículas del suelo, el nitrato se lixivia con facilidad, propiedad que favorece que acabe en aguas superficiales y subterráneas, contaminándolas. Entre las consecuencias más relevantes del abuso de los fertilizantes nitrogenados durante el regadío, encontramos la eutrofización de las aguas superficiales y el deterioro de la calidad del agua (Muratore *et al.*, 2021; Cordis, 2010; Ministerio para la Transición Ecológica y el reto demográfico [MITECO], s. f.).

Según la organización mundial de la salud (OMS) los nitratos se encuentran entre los principales contaminantes químicos del agua. Su concentración no debe superar los 50 mg/L en el agua para consumo humano (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016). Sin embargo, en España, en el periodo 2016-2019 se mostró que, aunque las aguas superficiales se mantenían en su mayoría libres de nitratos (aunque sí que existen puntos contaminados por encima de lo que permite la ley), en el caso de los acuíferos subterráneos, la mayoría de ellos contaban con concentraciones de entre 40-50 mg/L o superiores (MITECO, s. f.). Reducir el uso de nitratos utilizados en la agricultura, mediante la optimización de la toma de N por parte de los cultivos, puede ayudar a mejorar la calidad del agua para garantizar su acceso seguro.

1.3. Captación, asimilación y transporte de N en la planta

El proceso de captación de nitratos y amonio es un transporte activo mediado, en el caso del nitrato por la familia de proteínas transportadoras NPF/NRT1, NRT2, canal de cloruro (CLC-1) y homólogo 3 asociado al canal aniónico lento (SLAC1/SLAH), y del amonio por AMT, cuya actividad es alterada en función de su disponibilidad en el suelo y la concentración de N dentro de la propia planta y se expresa principalmente en la epidermis y las raíces laterales (Muratore *et al.*, 2021; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Los transportadores NPF y NRT2 se localizan en la membrana plasmática de las células de la raíz, e introducen nitratos mediante un mecanismo simporte $2H^+/1NO_3^-$, en el citoplasma (Muratore *et al.*, 2021). Éste es posteriormente acumulado en las vacuolas, llegando a concentraciones de 100 Mm (Muratore *et al.*, 2021).

Una vez captado el nitrato, este puede ser asimilado en las raíces en caso de que la concentración de N sea baja en el medio, estimulando así el crecimiento y desarrollo de las raíces (Tegeder *et al.*, 2011; Zhang y Wu *et al.*, 2019). Sin embargo, en numerosas especies, entre las que se encuentra el tomate, este proceso tiende a producirse en el vástago, debido a la disponibilidad de energía y esqueletos carbonados proporcionados por la fotosíntesis (Tegeder *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 1996). El N una vez tomando o asimilado en las raíces es transportado al vástago a través del xilema, los productos de la asimilación en las hojas fotosintéticas son cargados en el floema y llevados hasta los sumideros (Tegeder *et al.*, 2011).

El primer paso en la asimilación del N es la reducción del nitrato a nitrito mediante la nitrato reductasa (NR) en el citoplasma, tras lo cual el nitrito pasa a los cloroplasto a través de la proteína transportadora NITR2, donde es reducido en el estroma, gracias a la nitrito reductasa (NIR), a amonio (Iqbal *et al.*, 2020; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Como ésta se trata de una molécula altamente tóxica, las plantas rápidamente la utilizan incorporándolas a glutamato para formar glutamina haciendo uso de la glutamina sintetasa (GS), lo que a su vez estimula la actividad de la glutamato sintasa (GOGAT) (Iqbal *et al.*, 2020; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). La interconversión del glutamato y la glutamina es una de las reacciones

más importantes de las plantas pues mantiene la homeostasis del N y asegura su óptima utilización (Iqbal *et al.*, 2020; Zayed *et al.*, 2023). De la GS se conocen dos genes nucleares: GS1, enzima citosólica presente tanto en raíz como en hoja que ante altas concentraciones de amonio participa en la asimilación de N en la raíz, y en su carga en el floema para trasladarlo desde las hojas maduras hasta los sumideros; GS2 está presente en el cloroplasto e involucrada en la asimilación primaria del amonio (Iqbal *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2012). La glutamato deshidrogenasa también es una enzima importante en el proceso de fijación del N, situada en las mitocondrias, se encarga de desaminar el glutamato para permitir la liberación del amonio, aunque adicionalmente puede sintetizar glutamato a partir de amonio (Iqbal *et al.*, 2020). Para incorporar el N a otros aas se requieren reacciones de transaminación, como la llevada a cabo por el aspartato aminotransferasas (AAT) en las mitocondrias y el citosol (Iqbal *et al.*, 2020).

Tras la asimilación del N en los tejidos fuente (p.e. raíces y hojas maduras) como aas y otros compuestos orgánicos, este es exportado a los sumideros, tejidos en crecimiento como hojas y raíces durante la fase vegetativa, o las flores, frutos y semillas, en la reproductiva, (Tegeder y Masclaux-Daubresse, 2018). El N inorgánico es transportado desde la raíz por el xilema, mientras que desde las hojas maduras a los sumideros se realiza por el floema. Los aas producidos en las hojas son transportados desde las células del mesófilo a través de los plasmodesmos hacia las células acompañantes o elementos cribosos del floema. La entrada a los elementos cribosos y las células de compañía puede ser simplástica o apoplástica, que requiere de transporte activo en la membrana. Una vez introducido en el sistema vascular se produce su transporte a larga distancia hacia los sumideros (Taiz y Zeiger, 2014; Rosado-Souza *et al.*, 2023).

La carga apoplástica de aas al floema en las fuentes, o la descarga en los sumideros, requiere proteínas transportadoras o permeasas. Entre las proteínas transportadoras de aas y péptidos encontramos tres familias principales: permeasas de aminoácidos/auxinas (AAP), transportadores de aminoácidos/colina (APC); y transportadores que usualmente mueven múltiples aminoácidos hacia dentro y fuera (UMAMIT). Las AAP a su vez están compuestas por 8 subfamilias que son las permeasas de aminoácidos (AAP), transportadores lisina/histidina (LHT), transportador GABA (GAT), transportador de prolina (ProT), transportadores de entrada de moléculas similares a auxinas (LAX), transportadores de aminoácidos aromáticos y neutros (ANT), transportador vesicular asociado a aaminas (VAAT), y proteínas similares a transportadores de aminoácidos (ATL) (Tegeder y Rentsch, 2010; Alzahrani, 2021).

Concretamente, las AAP son las más estudiadas. Se tratan de proteínas de moderada afinidad que transportan glutamato y aas de carga neutra en las células de las plantas, y son las principales responsables de su carga en el floema, por lo que son esenciales para el suministro de N asimilado a los sumideros (Tegeder y Rentsch, 2010). La importancia de esta familia ha sido demostrada en diversos

estudios. Perchlik y Tegeder (2018) generaron sobreexpresoras de *AAP2* en *Arabidopsis thaliana* que mostraron la misma producción de biomasa y semillas con la mitad del suministro de N respecto a las plantas silvestres (WT), mejorando la eficiencia del uso de N (NUE). Sin embargo, mutantes 'knock out' de *APP2* en pepino (*Cucumis sativus*) exhibieron un desarrollo retardado del meristemo de la raíz, así como de su elongación y una demora en el inicio del desarrollo de la raíz lateral. Todo esto fue en detrimento del vástago cuyo desarrollo se vio retrasado debido a los defectos en la raíz y a la interrupción del transporte de auxinas desde la raíz hasta la parte aérea (Yao *et al.*, 2023). En arroz, los mutantes de *AAP4* vieron interrumpido el transporte de aas neutros valina y prolina, lo que afectó negativamente al crecimiento y la biomasa de las plantas (Fang *et al.*, 2021).

Tanto en *S. lycopersicum* como en *Arabidopsis thaliana* existen 8 AAPs (Alzahrani, 2021). Aunque se ha iniciado la caracterización funcional de estos genes en la especie modelo, se dispone de poca información en tomate. En *Arabidopsis*, estas proteínas comparten afinidad por su sustrato, pero difieren en el tejido donde se expresan y sus respuestas a los estímulos ambientales (Tegeder y Rentsch, 2010; Ortiz-Lopez *et al.*, 2000). Ejemplos son la *APP8* que en *Arabidopsis* se expresa, fundamentalmente, en la siliqua y las semillas en desarrollo (Okumoto *et al.*, 2002) o la *APP3*, que se encuentra principalmente en el floema de las raíces (Okumoto *et al.*, 2004).

Los estudios realizados sobre la *APP2* en *Arabidopsis* indican que es la permeasa involucrada en la carga de foto asimilados en el floema y en la distribución de aas al embrión (Zhang *et al.*, 2010). Se expresa específicamente en las células de compañía e incrementa la NUE, así como la asimilación y la concentración de carbohidratos en los sumideros (Zhang *et al.*, 2010; Perchlik *et al.*, 2018). En cambio, la *AAP4*, está involucrada en la carga el floema, y se encuentran principalmente en las hojas maduras, las flores y el tallo (Fischer *et al.*, 1995). Las *AAP6* se localizan en el parénquima del xilema y no están involucradas directamente en la carga en el floema, pero si en la transferencia desde el xilema hasta el floema (Tegeder y Rentsch, 2010; Hunt *et al.*, 2010).

En tomate resultados previos del laboratorio sugieren, en base a los niveles de expresión observados en los diferentes órganos, que las AAP más relevantes en la partición de aas pueden ser la *AAP2*, *AAP4* y la *AAP6* (datos no publicados). Muestran una alta expresión en hojas maduras y en frutos en desarrollo, como principales fuentes y sumideros, respectivamente, de aas. Es por ello por lo que podrían considerarse dianas de interés en el incremento de la productividad de los cultivos y su tolerancia al estrés a través de una mejor NUE. Además, cabe destacar que *AAP6* aumenta su expresión en condiciones de limitación de aporte de N, por lo que puede estar implicada en las respuestas de la planta a la deficiencia de N.

1.4. Regulación de la partición de aas en respuesta a la disponibilidad de N

La disponibilidad de N en forma de nitratos y amonio en las raíces regula el metabolismo y el desarrollo de las plantas: cuando en las raíces se detecta la presencia de nitratos se produce un aumento de la expansión de las hojas, aunque este fenómeno no ocurre con el amonio; en cambio, si la concentración de nitratos en el vástago es muy elevada, el crecimiento de las raíces se ve perjudicado (Walch-Liu *et al.*, 2005). Esta comunicación bilateral entre el vástago y la raíz, en relación a la disponibilidad de N en la planta, está mediada por las citoquininas (CKs), entre otras moléculas, como los péptidos CEP [C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE] (Tabata *et al.*, 2004) y CEPD [CEP DOWNSTREAM] (Ota *et al.*, 2020). Estas fitohormonas funcionan como moléculas señalizadoras en respuesta a N, y son transportadas por el xilema y el floema a larga distancia (Sakakibara, 2021).

Las CKs están involucradas en diversos procesos de la vida de la planta, como la estimulación de la división celular o la rotura de la dormancia de las semillas, pero también en la regulación de la fuerza de sumidero, la partición de foto asimilados, y la descarga desde el floema (Roitsch y Ehneß, 2000). En raíces, causan la inhibición del crecimiento, mientras que en el vástago se estimula la expansión de las hojas y el retraso de la senescencia (Roitsch y Ehneß, 2000).

Regular la distribución de foto asimilados entre los distintos órganos de la planta le permite adaptarse a distintas situaciones de estrés a cambio de reducir el crecimiento, el desarrollo y la producción (Pérez-Alfocea *et al.*, 2010). En condiciones de falta de N se produce una reducción de la demanda de los sumideros y la acumulación de foto asimilados en las fuentes que reduce la fotosíntesis. Cuando la disponibilidad de N es muy alta los altos niveles de nitrato que se captan por las raíces estimulan la biosíntesis de CKs que son transportadas vía xilema para regular el desarrollo de los brotes (Walch-Liu *et al.*, 2005; Roitsch y Ehneß, 2000; Sakakibara, 2021).

Existen diferentes tipos de CK siendo las principales la isopentenil-adenina (iP), la trans-Zeatina (tZ) y la CK aromática y la cis-Zeatina (cZ). Sin embargo, no todas las especies moleculares de CKs están presentes en la misma proporción en xilema y floema (Sakakibara, 2021; Wheeldon y Bennett, 2021). En *Arabidopsis*, en el xilema, destaca la presencia de tZ y, por el contrario, en el floema es predominante la presencia de cZ e iP (Sakakibara, 2021). En concreto, la tZ es la señalizadora de disponibilidad de N en el medio: al producirse un aporte externo de nitratos, en las raíces se produce un aumento de la concentración y transporte de tZ hacia el vástago, o más bien de su precursor señalizador de larga distancia trans-Zeatina-ribósido (tZR), desde la raíz hasta el vástago vía xilema (Sakakibara, 2021).

La tZ, al igual que otras CKs, cuenta con una forma inactiva de unión a un ribósido, que es la principal forma que se encuentra en el xilema, la cual se reactiva a tZ en el sitio de acción. Allí la tZ y la tZR afectan el crecimiento del vástago influyendo en

el tamaño de hoja, la capacidad fotosintética de la misma y en los procesos meristemáticos, aunque solo la tZR en este último caso (Sakakibara, 2021; Wheeldon y Bennett, 2021; Glanz-Idan *et al.*, 2020).

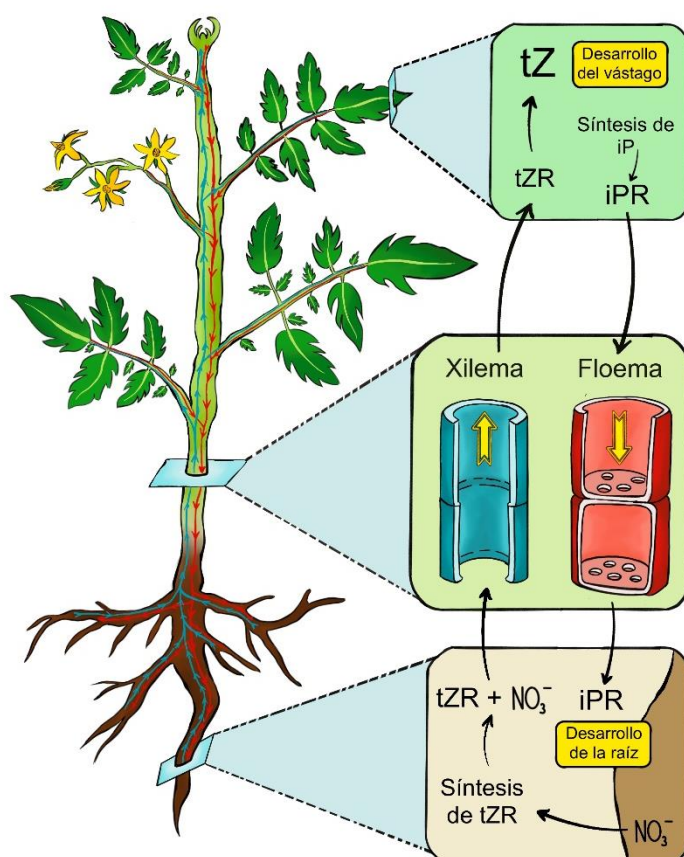


Figura 1: Papel de las citoquininas como moléculas señalizadoras sistémicas entre la raíz y el vástago. La disponibilidad de nitratos (NO_3^-) en la raíz estimula la síntesis de trans-Zeatina ribósido (tZR) que es transportado por el xilema hasta el vástago donde su forma activa, trans-Zeatina (tZ), estimula el desarrollo del vástago. La isopentenil-adenina (iP) se sintetiza en su forma ribósido (iPR) en las hojas desde donde es transportado vía floema hasta la raíz, allí estimula su desarrollo. Figura de elaboración propia basada en la información de Sakakibara, 2021; Wheeldon y Bennett, 2021; y Glanz-Idan *et al.*, 2020.

La aplicación exógena de las CKs en las hojas de las plantas incrementa la fuerza de sumidero, incrementa el crecimiento de éstas y reduce la senescencia de las mismas (Roitsch y Ehneß, 2000), lo que les permite actuar durante más tiempo como fuentes. Es interesante señalar que este tratamiento aumenta la expresión de enzimas claves en la asimilación del N como es la nitrato reductasa (Lu *et al.*, 1990).

El incremento del crecimiento en las hojas tratadas requiere de una mayor disponibilidad de aas que pueden ser sintetizados en estas mismas hojas, pero también transportarse en mayor medida hacia estos órganos. Asimismo, también podría darse una activación de la exportación de aas dada su mayor asimilación. Así pues, cabe plantearse si el efecto de las CKs podría estar parcialmente mediado

por una mayor actividad de los transportadores de aas, lo que constituye el objetivo general del presente trabajo.

Con la finalidad de abordar este objetivo general sobre el papel de los transportadores de aas en la respuesta a las citoquininas, y la influencia de la disponibilidad de nitrógeno por la planta en este proceso, nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

- 1) Definir un sistema experimental en tomate que permita estudiar el efecto de la aplicación de CKs sobre las permeasas, y la influencia de la disponibilidad de N.
- 2) Determinar el modo en que la aplicación de CKs altera la partición de la biomasa.
- 3) Relacionar las variaciones en biomasa con los cambios en parámetros fotosintéticos.
- 4) Analizar el efecto de las CKs sobre la expresión de las permeasas de aas de tipo AAP (AAP2, 4 y 6) que han mostrado mayor actividad en experiencias preliminares, tanto en condiciones de suministro óptimo de N como de deficiencia
- 5) Determinar si las CKs pueden incrementar la disponibilidad de aas en hoja en condiciones de limitación de N.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Se esterilizaron semillas de la variedad de tomate Moneymaker (MM) en una disolución 50% de lejía durante media hora. Pasado el tiempo se realizaron tres lavados con agua destilada y las semillas se dispusieron en oscuridad y a 25°C en placas Petri con papel de filtro humedecido hasta que germinaron. Posteriormente se sembraron en bandejas de alveolos con sustrato universal, y se mantuvieron en cámara de cultivo en un régimen de temperaturas de 25/18 °C (dia/noche, 16 h fotoperiodo).

Tras 19 días se seleccionaron 140 plántulas homogéneas en el estadio de 3 o 4 hojas, y se traspasaron a maceteros de 12 cm de diámetro con un sustrato de bolas (2-3 mm diámetro) de arcilla expandida (Arlita, España). Previamente se eliminó el sustrato de las raíces mediante un lavado en agua, evitando el daño del sistema radicular. Las plantas se mantuvieron en la cámara de cultivo a 15/18 °C (16h/8 h luz/oscuridad y 300 mmol m⁻²s⁻¹ de intensidad de luz led (Valoya, Finlandia).

Las plántulas se regaron cada dos o tres días mediante la solución 0.5X Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Esta solución contiene 8 mM de nitrógeno en forma de 0,5 mM NH₄H₂PO₄, 3 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O y 1 mM MgSO₄ hasta transcurridos 39 días desde su germinación.

El día 1 del tratamiento diferencial (tres días antes de la primera aplicación del tratamiento con trans-zeatina tanto a raíces como hojas jóvenes) la mitad de las plantas se fertilizaron con la solución 8 mM N, solución aporte óptimo de N en las condiciones de cultivo (100N), y la otra mitad con solución 4 mM N, aporte limitante del 50% del óptimo (50N). Se añadió 0,25 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂SO₄, 0,25 KCl y 1mM CaCl₂ a la solución 4 mM N para mantener el contenido de los demás elementos minerales constante. Estas condiciones fueron puestas a punto previamente en el laboratorio (Renau-Morata *et al.*, 2021).

2.2. Aplicación de tZ en hojas y raíces

Para ensayar el efecto de las CKs en las respuestas a la deficiencia de nitrógeno se empleó una solución de tZ (Z0917; Duchefa, Holanda) a una concentración de 10 µM. Se pulverizó tZ a hojas jóvenes o se añadió a las raíces en la solución de fertilización. La aplicación de la citoquinina se repitió semanalmente durante el experimento.

La distribución de tratamientos se muestra en la Tabla 1. Para cada tratamiento (nivel de N y aplicación de hormona) se emplearon 23 plantas. Las hojas jóvenes incluyen las recién formadas (inmaduras) hasta la 4ª hoja desde el ápice.

Tabla 1: Tratamientos del experimento. Tabla de elaboración propia.

Código tratamiento	Fertilización	Aplicación hormona
T1	8 mM N	No
T2	4 mM N	No
T3	8 mM N	Hojas
T4	4 mM N	Hojas
T5	8 mM N	Raíces
T6	4 mM N	Raíces

2.3. Muestreo de biomasa fresca y peso seco

Se muestreo la biomasa de las plantas de los seis tratamientos dos veces: una al inicio del experimento transcurridos seis días desde el comienzo del riego diferencial y tres desde la aplicación de la tZ, y otros 17 días después de la primera aplicación de tZ y 3 días después de la última aplicación del tratamiento en hojas jóvenes y raíces.

En los muestreos de biomasa se tomó el peso de la planta, el tallo, el vástago, la raíz, las hojas jóvenes y las hojas maduras. Se consideraron hojas jóvenes todas aquellas que hubiesen sido tratadas con tZ desde el inicio, y las maduras eran las no tratadas sin incluir los cotiledones.

En el primer muestreo se evaluaron 9 plantas (3 réplicas con 3 plantas por réplica), mientras que en el segundo fueron 12 (3 réplicas con cuatro plantas por réplica). Para el análisis biomolecular en la primera toma de biomasa, se guardó una hoja

madura e inmadura de cada planta. En la segunda toma, además de las hojas maduras y jóvenes, se tomó muestra de las inmaduras (2 por planta) y las raíces. Todas las muestras de biomasa destinadas al análisis biomolecular fueron congeladas en nitrógeno líquido a $-195,8^{\circ}\text{C}$ para posteriormente ser almacenadas en un congelador a -80°C hasta su uso.

El peso seco se tomó solo en el caso del segundo muestreo de biomasa. Se guardaron el tallo, la raíz, las hojas jóvenes y las hojas maduras de las 12 plantas recolectadas en una estufa a 70°C durante 8 días, tras lo cual se pesaron.

2.4. Medidas de parámetros fisiológicos

Para caracterizar la evolución de la limitación del aporte de N y el efecto de la aplicación de CKs, se empleó el medidor Dualex (Force A), que determina el contenido en clorofila, antocianinas y flavonoides; el Polypen (PSI Inst, Chequia), que determina ciertos parámetros espectroscópicos relacionados con el estado de la planta como el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI); y el MINIPAM que mide la fluorescencia de las clorofilas, que permite determinar la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m), que da idea del grado de fotoinhibición del fotosistema. A partir de las estimas de pigmentos, el Dualex calcula el parámetro índice de balance de N (NBI) que está relacionado con el contenido de N de la planta. Se realizaron medidas semanales durante los 17 días que duró el experimento.

El primer conjunto de datos se tomó tres días después de la primera aplicación y en las hojas jóvenes (hoja joven más desarrollada) y maduras. El segundo una semana después y fueron de las hojas maduras, como la hoja más antigua, las jóvenes, como la más madura tratada y las intermedias como una entre las maduras y las jóvenes, pero sin ser tratada. La tercera vez se realizó en 14 plantas (todas las que restaban tras el primer muestreo de biomasa) de las que se tomó información de las hojas maduras, jóvenes e inmaduras.

2.5. Trituración del material vegetal

El material vegetal (hojas) se trituró con nitrógeno líquido en un mortero, con movimientos de compresión y rotación hasta obtener un polvo fino evitando que se descongelase. Se pesó una alícuota de cada réplica (aprox. 0,12 g) y el resto se guardó en el arcón de -80°C . Todo el material vegetal se almacena en congelador -80°C hasta la extracción de RNA.

2.6. Extracción de ARN y síntesis de cADN

La extracción de RNA se realizó siguiendo el protocolo de Plants Mini Total RNA Kit (Ibi Scientific). La concentración de ARN y su calidad fueron analizados espectrofotométricamente (Epoch, Biotek) (Anexo II). La síntesis de cADN a partir de ARN se realizó siguiendo el Protocolo Takara PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) en un termociclador CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)

incubando la muestra a 37°C durante 15 minutos, seguido de una subida de temperatura a 85°C por 5 segundos.

2.7. Cuantificación del nivel de expresión por RT-qPCR

Los cebadores utilizados para cuantificar las permeasas *AAP2*, *AAP4* y *APP6*, y el gen housekeeping *GADPH* y sus concentraciones se encuentran en la tabla 2. El tamaño de los productos. El protocolo seguido para la RT-qPCR es el siguiente: se inicia con 30 segundos 95°C, seguido de 49 ciclos de 5 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C y finaliza con un último ciclo a 95°C durante 10 segundos. El incremento de temperatura de 0,5°C cada 5 segundos desde 65°C hasta 95°C sirve para obtener la curva de fusión del cADN.

Tabla 2: Secuencias de cebadores y sus respectivas concentraciones. Tabla de elaboración propia.

Gen	Código	Cebador	Secuencia	Concentración (nM)
<i>AAP2</i>	Solyc06g060110.2	Directo	TGGTGCTTGCCTTGTTATCTC	300
		Reverso	CAACTCCAGCAAAAGAACCAG	
<i>AAP4</i>	Solyc04g077050.2	Directo	GAGCTGGACTTGTTTGATCGT	200
		Reverso	ATCAGTTGCAAGTCCCTGGAT	
<i>AAP6</i>	Solyc07g066010.2	Directo	TGGAGCTTGGACAAGAAAATGG	300
		Reverso	CCTCAATTGATCCAATCAACCCC	
<i>GADPH</i>	Solyc05g014470	Directo	TGGTGCTGACTTCGTTGTTG	100
		Reverso	CCACAACAAACATGGGAGCA	

2.8. Análisis estadístico de los resultados

La existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos, para las diversas variables estudiadas (biomasa fresca y seca, parámetros fotosintéticos, y nivel de expresión de los genes *AAP2*, *AAP4* y *AAP6*) fueron analizadas mediante un ANOVA simple y posterior test de rangos múltiples utilizando el programa Statgraphics Centurion 19 Versión 19.6.03. Las correlaciones de Pearson entre las variables estudiadas se calcularon con el mismo paquete estadístico.

3. Resultados

Con objeto de establecer un sistema que permitiera estudiar la implicación de las permeasas en las variaciones en el crecimiento que sufren las plantas en función del aporte de N, y que están mediadas por las CKs, se llevó a cabo un ensayo preliminar que permitiera contrastar los cambios en biomasa y parámetros fotosintéticos asociados a una reducción de N, y cómo podría verse afectado este proceso por la aplicación de CKs. Para ello, se ensayaron 2 tipos de aplicaciones de CKs (10 µM de tZ) bien en hojas (H-tZ), bien en raíces (R-tZ), en plantas sometidas a dos regímenes de fertilización: aporte óptimo (100N) y aporte reducido en un 50% (50N). Dichos resultados se comparan con los respectivos controles 50N y 100N sin CKs. El comportamiento de las plantas de tomate, en estos 6

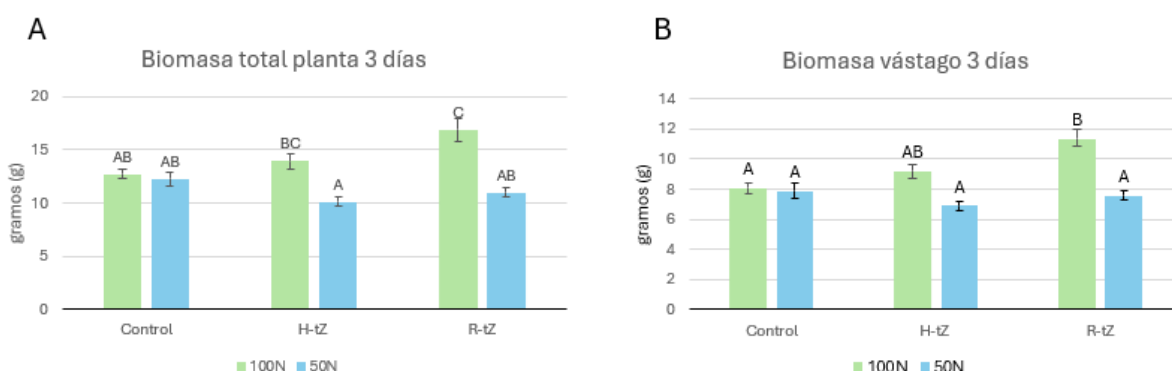
tratamientos diferentes, se observó a corto (3 días) y más largo plazo (17 días). La respuesta de las plantas se evaluó mediante los cambios en la biomasa y en los distintos parámetros fotosintéticos: concentración de clorofila, flavonoides, antocianinas, NBI, Fm/Fv y NDVI.

3.1. Respuestas a corto plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre parámetros de crecimiento de la planta

A los 3 días tras la aplicación del tratamiento de fertilización con menor disponibilidad de N, no se encontraron diferencias significativas en la biomasa total por el efecto del aporte de este elemento (Figura 2A). Esta uniformidad entre los controles no tratados con CKs, pero con distintos niveles de fertilización, se observó tanto en el vástago (Figura 2B) como la raíz (Figura 2C). En el vástago, tampoco se observaron diferencias en la biomasa de tallo, ni en hojas maduras o jóvenes (Figura 2D-F).

Sin embargo, sí que se observaron diferencias en la biomasa de la planta por efecto de la aplicación de citoquininas en condiciones de aporte completo de N (100N; Figura 2A). La aplicación de tZ en la raíz provocó un aumento de la biomasa total de la planta, debido a un incremento de la biomasa del vástago (Figura 2B), resultado de incrementos tanto del tallo como en ambos tipos de hojas (Figura 2D-F). También se observó un aumento de la biomasa de las hojas jóvenes, cuando estas son tratadas con tZ (Figura 2D). Aunque, no se encontraron efectos significativos para este tratamiento en los demás órganos de la planta, el valor medio de biomasa es consistentemente mayor, con la excepción de la raíz. Cuando las plantas son cultivadas en condiciones de falta de disponibilidad de N, no se observó, sin embargo, un efecto de la aplicación de CKs en la biomasa de los distintos órganos, ya sean aplicadas en hoja o en raíz (Figura 2A -F).

Cabe destacar que, aunque no se observaron diferencias en biomasa entre los controles por efecto del nivel de aporte de N, sí que se produjeron disminuciones significativas del tamaño de la planta en condiciones 50N cuando las plantas son tratadas con CKs, y de forma más acusada cuando el tratamiento es en las raíces (Figura 2A -F). Estas diferencias son debidas al incremento consistente en los valores medios de biomasa provocado por las CKs en condiciones de N óptimas.



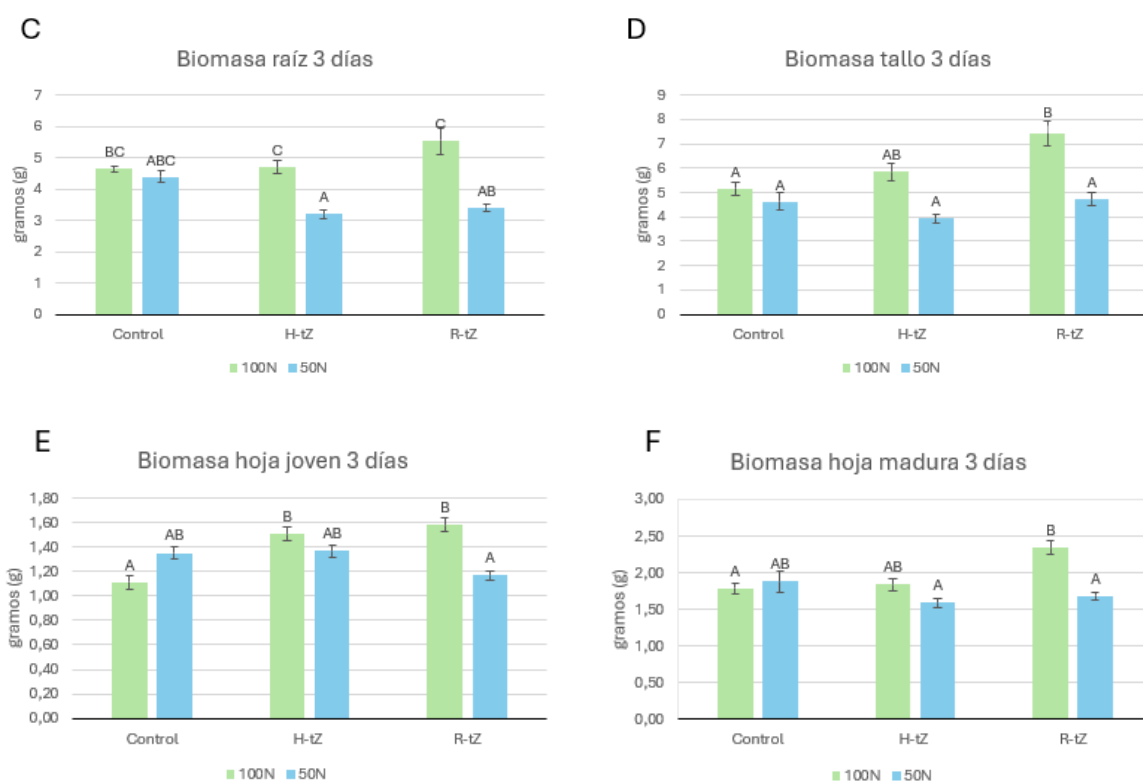


Figura 2: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en la biomasa total y de los distintos órganos de plantas de tomate MM, a los 3 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Biomasa total de la planta; B) Biomasa vástago; C) Biomasa raíz; D) Biomasa tallo; E) Biomasa hoja joven.; F) Biomasa hoja madura. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de biomasa de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración

3.2. Respuestas a corto plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre los parámetros fotosintéticos de la planta

De manera similar a la biomasa, a nivel fisiológico, las estimas de contenido en pigmentos (clorofilas, antocianinas y flavonoides) en hojas jóvenes, a los 3 días de iniciarse la fertilización diferencial, no mostraron un efecto del aporte de N (Figura 3A-C). Tampoco se observaron diferencias en los parámetros NBI y NDVI, asociados al estado nutricional de N, ni en F_v/F_m , indicativo de fenómenos de fotoinhibición del aparato fotosintético (Figura 3D-F). En lo que respecta a las hojas maduras, en ninguno de los seis parámetros mencionados anteriormente, se ven tampoco diferencias significativas debidas a la disponibilidad de N (Figura 4).

En hoja joven, los tratamientos H-tZ, en condiciones 100N, incrementan la eficiencia fotosintética del PSII (F_v/F_m) y el valor de NBI, disminuyendo el contenido de flavonoides. Los demás parámetros estudiados no mostraron cambios debidos a este efecto de aplicación de tZ en hoja (Figura 3A-D). Su aplicación en raíz no tiene efectos significativos en ninguno de los parámetros medidos (Figura 3A-D). En condiciones de falta de disponibilidad de N, la aplicación de citoquininas en hoja

sólo tiene efecto en el contenido de flavonoides, disminuyéndolo. La aplicación de CK en raíz, en estas condiciones de falta de N, disminuye la eficiencia fotosintética y el valor de NDVI en la hoja joven.

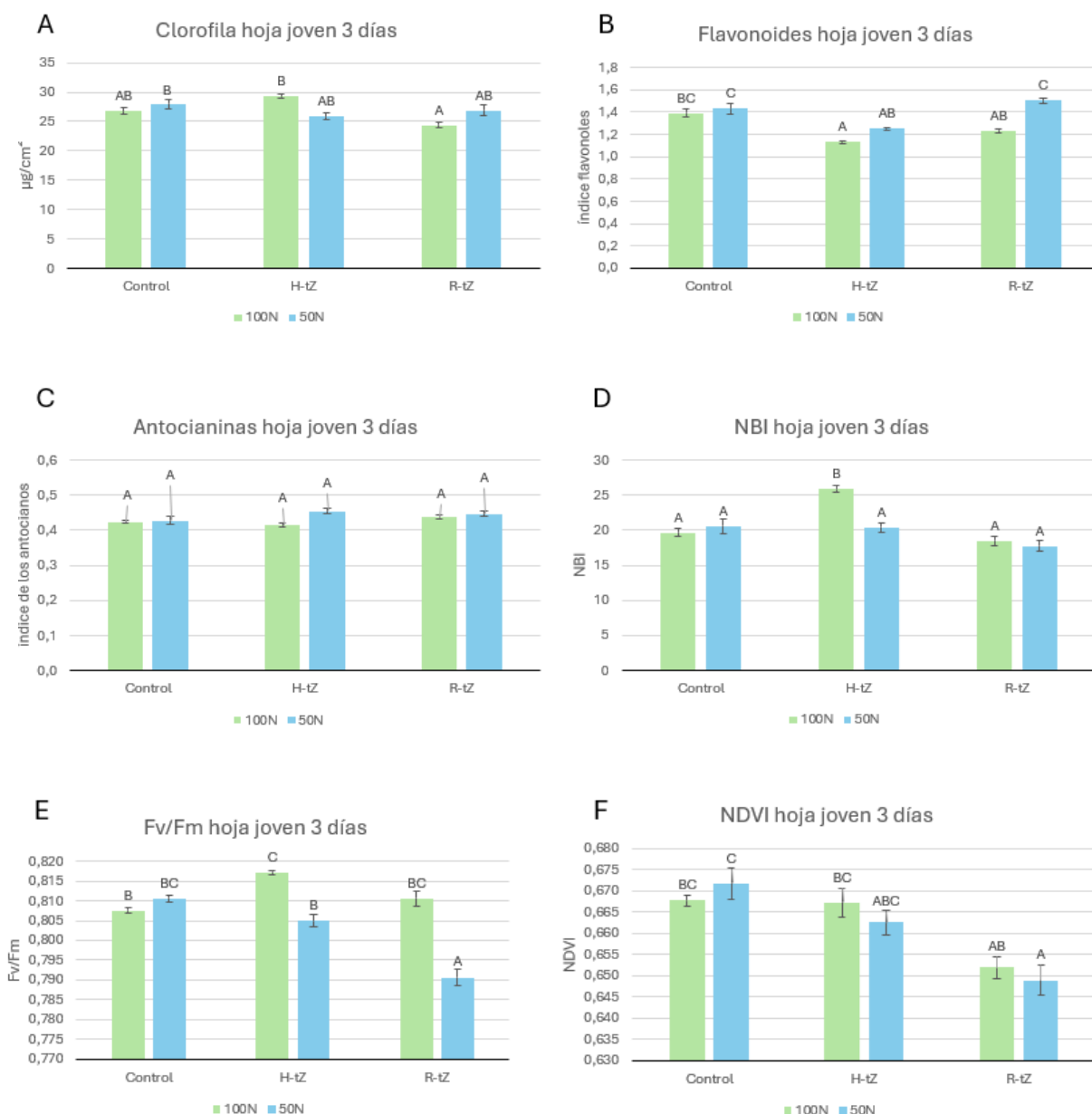


Figura 3: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en los parámetros fotosintéticos de hoja joven de plantas de tomate Money Maker, a los 3 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Clorofila; B) Flavonoides; C) Antocianinas; D) NBI; E) Fv/Fm; F) NDVI. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

En las hojas maduras de plantas no tratadas con CKs, a los 3 días de establecer la fertilización diferencial, tampoco se observaron diferencias en ninguno de los parámetros estudiados relacionados con la fotosíntesis (Figura 4A-D).

La aplicación de tZ, en condiciones óptimas de disponibilidad de N, no produjo cambios en los parámetros estudiados, con independencia del órgano al que se aplique (Figura 4A-D). En condiciones de deficiencia de N, la aplicación de CKs en hojas incrementa los índices NBI y NDVI en las hojas maduras (Figuras 4D-F), mientras que su aplicación en raíz provoca un aumento de flavonoides y antocianinas, pigmentos protectores en situaciones de estrés (Figura 4B-C).

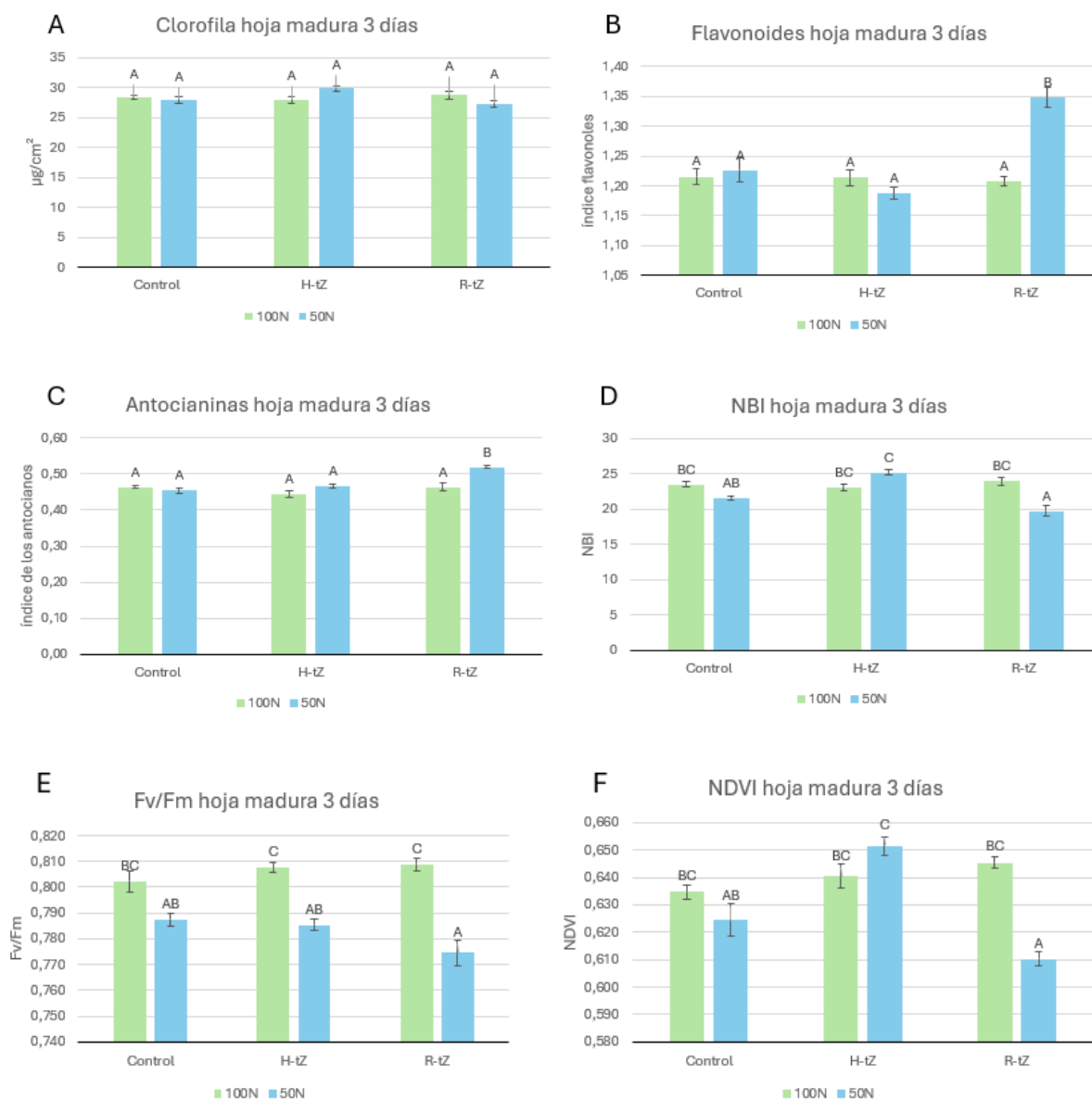
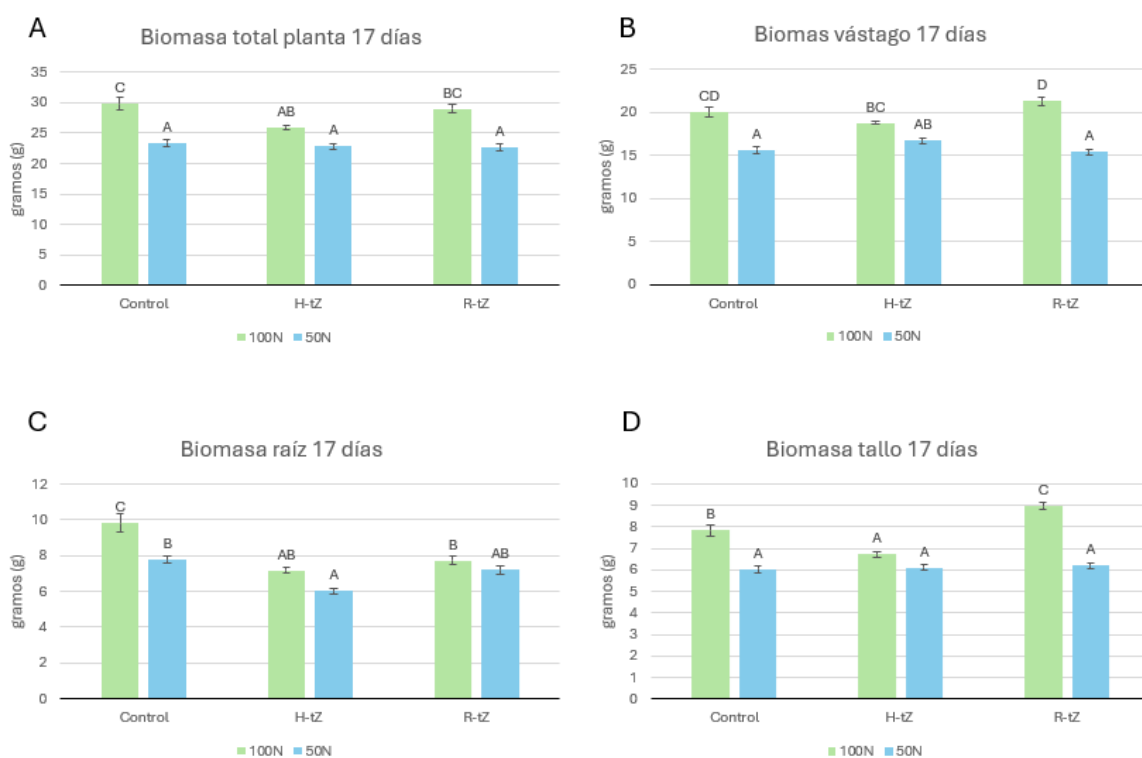


Figura 4: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en los parámetros fotosintéticos de hoja madura de plantas de tomate Money Maker, a los 3 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Clorofila; B) Flavonoides; C) Antocianinas; D) NBI; E) Fv/Fm; F) NDVI. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

3.3. Respuestas a largo plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre la biomasa

A los 17 días, ya se observó una reducción en biomasa debida a la falta de disponibilidad de N, en todos los órganos estudiados de las plantas control (Figura 5A-F). En condiciones óptimas de N, la aplicación de CKs en hojas jóvenes produce un incremento del peso en este tipo de hojas, y una disminución de peso en los restantes órganos (raíz, tallo y hoja madura) (Figura 5A-F). La aplicación en raíz disminuye el crecimiento de la raíz (Figura 5C) y aumenta el del tallo (Figura 5D). En relación al efecto de las CKs en plantas crecidas con baja disponibilidad de N, hay que destacar que la adición de CKs en hojas jóvenes disminuye el efecto negativo de la falta de aporte de N en este tipo de hojas (Figura 5E). Sin embargo, disminuye el peso de la raíz, en relación a plantas no tratadas (Figura 5C). En el resto de las medidas de biomasa, la aplicación de CKs en hoja o en raíz no tuvo efecto, en estas condiciones.



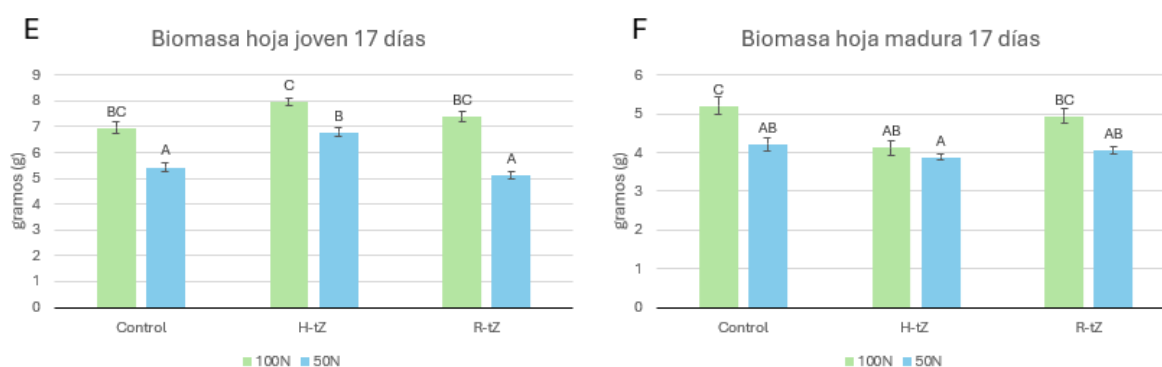


Figura 5: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en la biomasa total y de los distintos órganos de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Biomasa total de la planta; B) Biomasa vástago; C) Biomasa raíz; D) Biomasa tallo; E) Biomasa hoja joven.; F) Biomasa hoja madura. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de biomasa de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

Al analizar la distribución del porcentaje de peso seco en la planta, observamos que, cuando se aplican CKs en hojas, hay una variación en la partición de foto asimilados, de forma que una mayor cantidad de éstos son distribuidos a las hojas jóvenes, disminuyendo el porcentaje de materia seca que se particiona a la raíz (Figura 6). La aplicación de CKs en raíz también presenta un efecto, aunque de menor cuantía, en que incrementa la partición de biomasa a las hojas jóvenes y al tallo, pero sólo en condiciones de fertilización óptima.

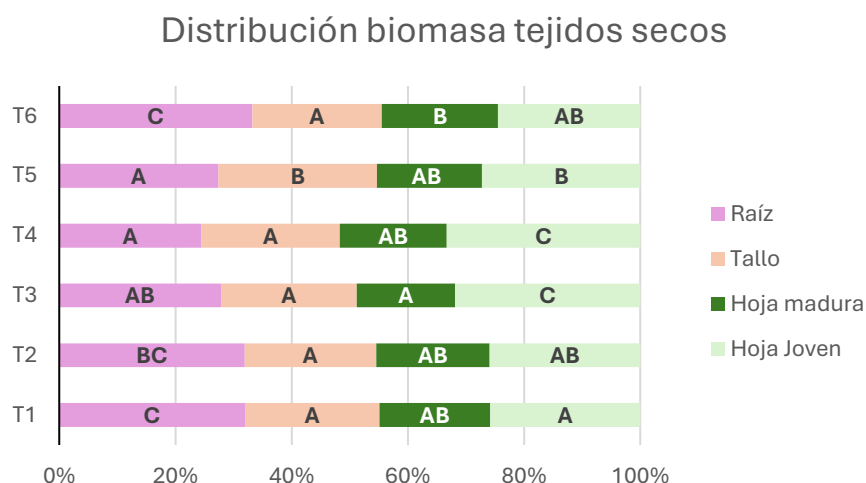
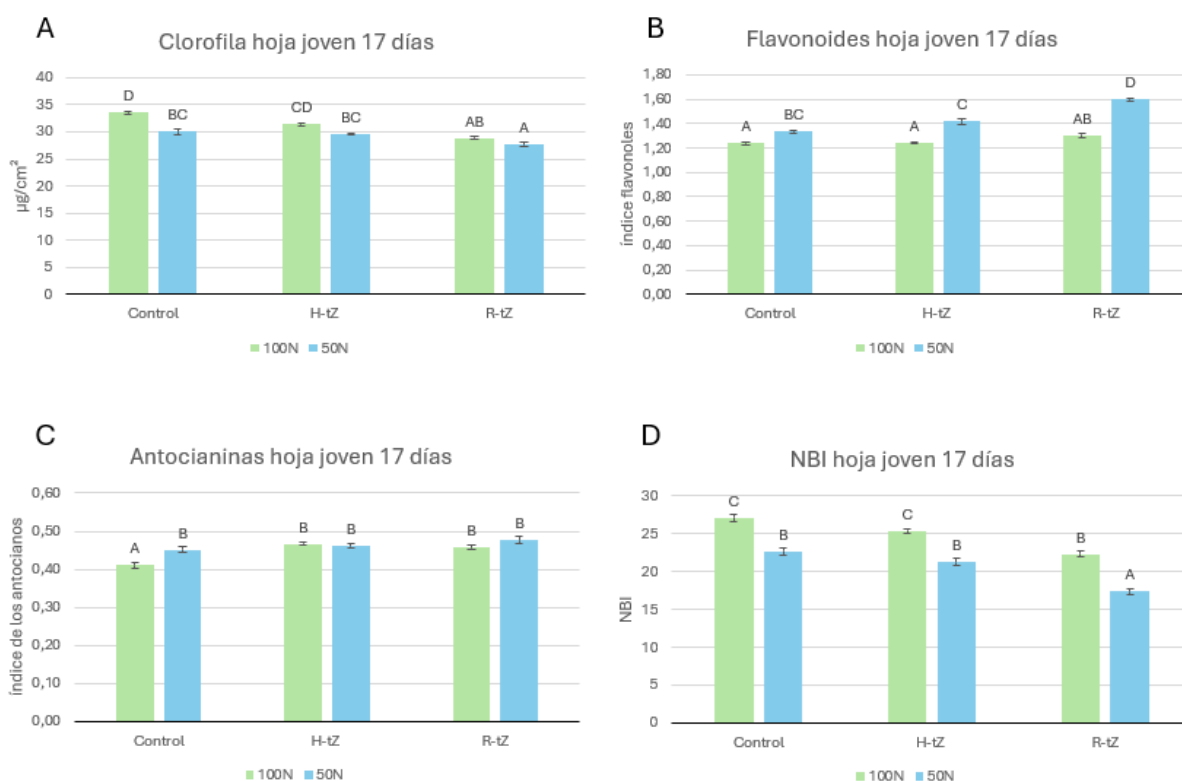


Figura 6: Porcentaje del peso seco de los distintos órganos de la planta entre tratamientos, en relación a la biomasa total, en los distintos tratamientos ensayados: T1-control 100N; T2 Control 50N; T3 H-tZ 100N; T4 H-tZ 50N; T5 R-tZ 50N; T6 R-tZ 50N. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de biomasa de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

3.4. Respuestas a largo plazo de la aplicación de CKs y la disponibilidad de N sobre los parámetros fotosintéticos de la planta

Las hojas jóvenes, a los 17 días tras la aplicación de la fertilización nitrogenada diferencial, mostraron un descenso en la cantidad de clorofilas y en el valor del índice NBI, así como una mayor cantidad de antocianos y flavonoides, al disminuir el aporte de N (Figura 7).

Al aplicar CKs en hoja, en condiciones 100N, observamos un incremento en antocianinas y una disminución en la eficiencia fotosintética del PSII y del índice NDVI en estas hojas jóvenes. La aplicación en raíz, en estas condiciones, también provoca una subida de las antocianinas y una disminución del NDVI, además de disminuir la cantidad de clorofilas y el NBI. La disminución del aporte de N en plantas tratadas con citoquininas produce una mayor disminución de la eficiencia fotosintética del PSII y del índice NDVI que en las plantas sin tratar, con independencia del órgano al que se apliquen las hormonas (Figura 7), pero una menor disminución de las clorofilas.



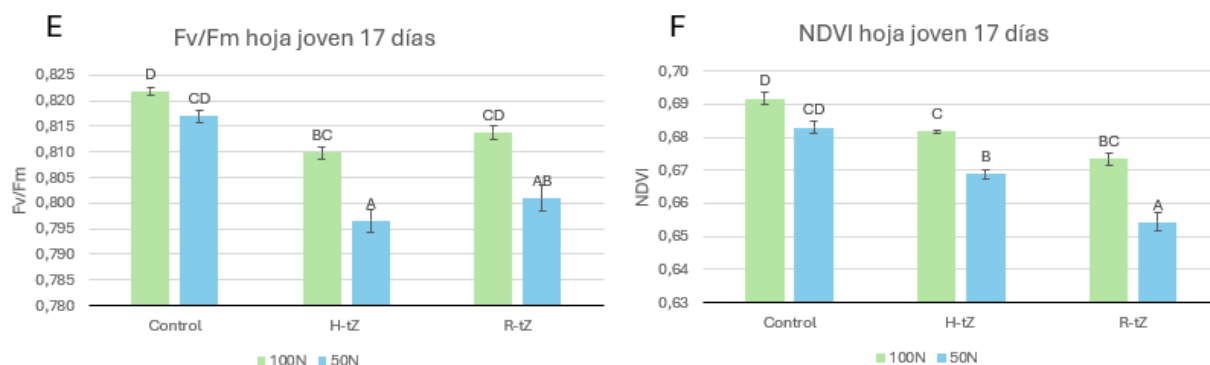
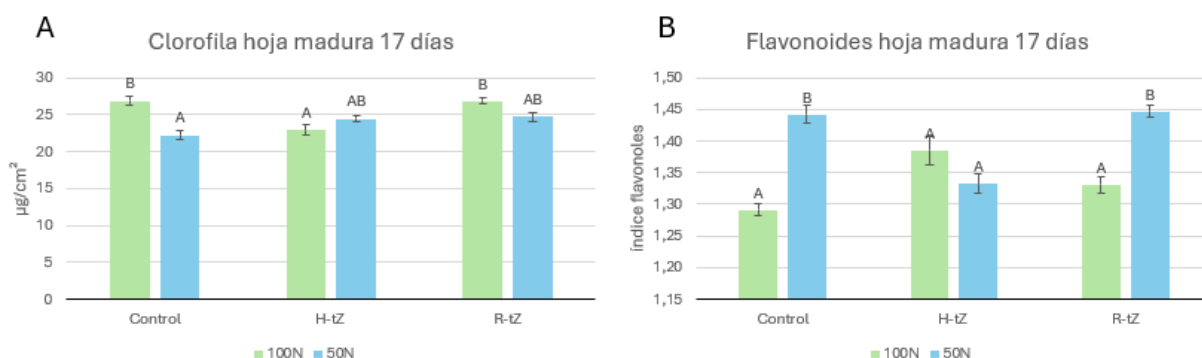


Figura 7: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en los parámetros fotosintéticos de hoja joven de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Clorofila; B) Flavonoides; C) Antocianinas; D) NBI; E) Fv/Fm; F) NDVI. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

Las hojas maduras, al igual que las jóvenes, tras 17 días de tratamiento 50N, mostraron una disminución de aquellos parámetros relacionados positivamente con la eficacia fotosintética y un buen estado fisiológico de la planta (contenido en clorofilas, Fv/Fm, NBI, NDVI), así como un incremento del contenido de pigmentos asociados a situaciones de estrés (antocianinas y flavonoides) (Figura 8). Hay que señalar que estas reducciones son de mayor cuantía en este tipo de hojas maduras. La aplicación de CKs en hoja joven provoca, en hojas maduras de plantas crecidas en condiciones óptimas de N, cambios similares a los descritos ante la disminución del aporte nitrogenado: descenso en contenido en clorofilas, Fv/Fm, NBI, NDVI, e incremento en antocianinas. La aplicación de CKs en raíces, en estas condiciones de aporte óptimo de N, sólo conduce a un incremento en antocianinas (Figura 8C). Sin embargo, en condiciones de N limitado, las plantas tratadas con CKs en hojas jóvenes o en raíz, tienen valores consistentemente superiores al control para el contenido en clorofilas, Fv/Fm, NBI y NDVI, lo que hace que las diferencias entre los dos tratamientos de fertilización disminuyan.



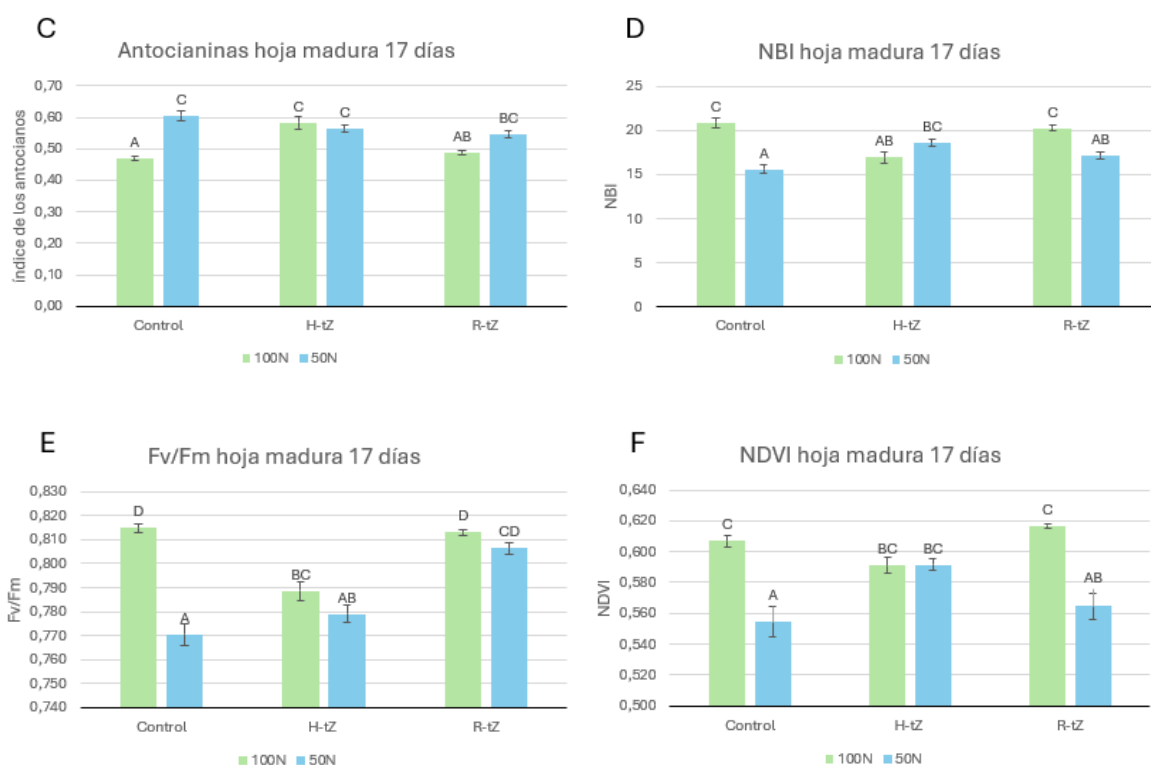


Figura 8: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en los parámetros fotosintéticos de hoja madura de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Clorofila; B) Flavonoides; C) Antocianinas; D) NBI; E) Fv/Fm; F) NDVI. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

La respuesta de las hojas inmaduras, tras 17 días de fertilización 50N, es similar a la desarrollada por las hojas jóvenes, con un descenso en algunos parámetros relacionados con la eficacia fotosintética, como NBI y Fv/Fm, y un incremento de los valores medios del contenido en pigmentos con funciones protectoras del estrés, como los flavonoides (Figura 9), pero siendo las diferencias de menor cuantía que en las hojas maduras (Figura 8). Además, el contenido en clorofilas y el valor del NDVI se mantienen, y el descenso en NBI es menor que en hojas jóvenes. El tratamiento de CKs en hoja, en condiciones 100N, sólo produce una disminución de la eficiencia del PSII (Figura 9E). En estas plantas tratadas, la reducción del N no produce ninguna variación de los parámetros estudiados en las hojas inmaduras. Sin embargo, dicha reducción del N, en plantas tratadas con CKs en raíces da lugar a descensos mayores de Fv/Fm, NBI y NDVI que en el control sin tratar con CKs (Figuras 9D-F).

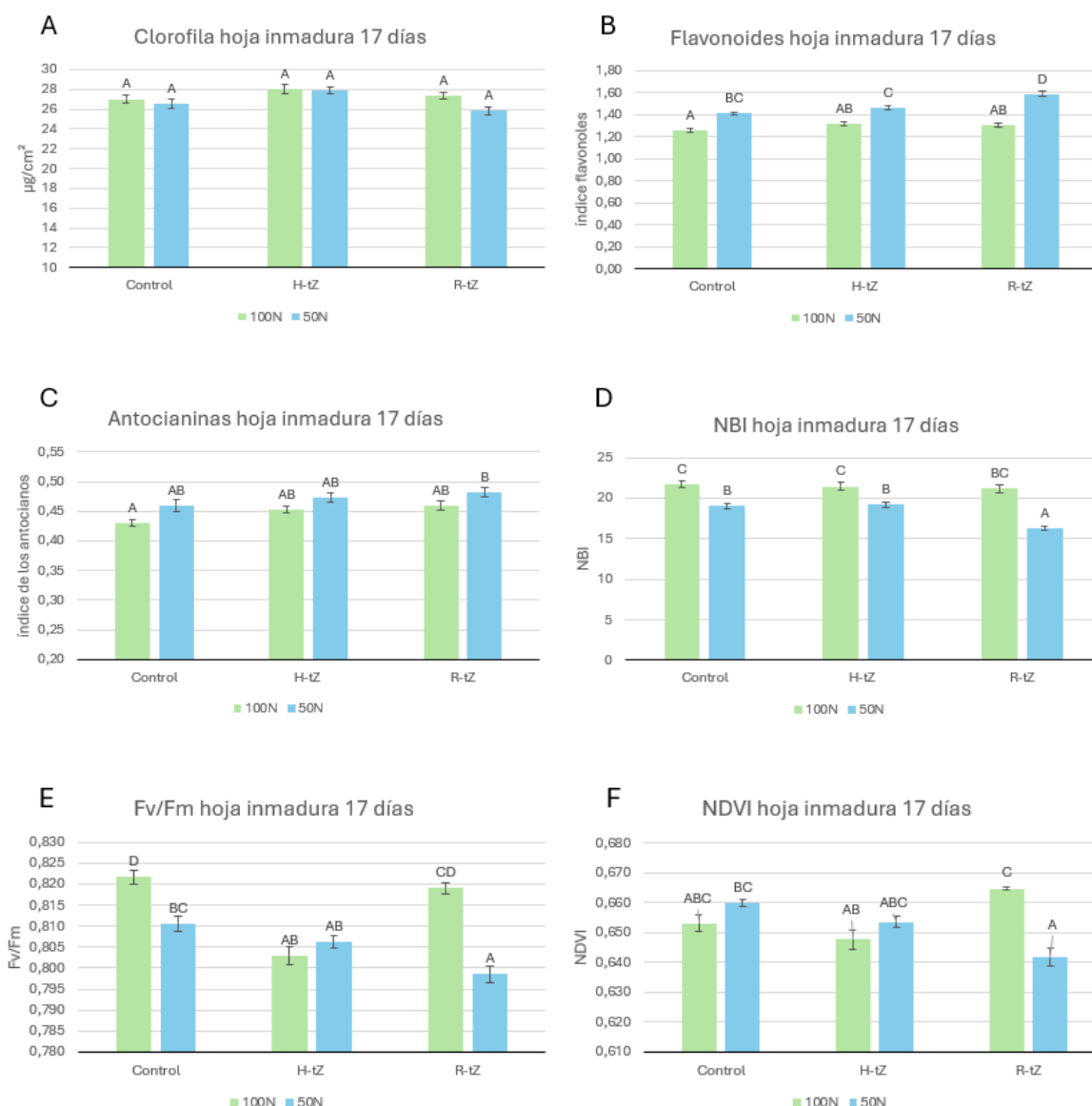


Figura 9: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ); tratamiento trans-Zeatina en raíz (R-tZ)) en los parámetros fotosintéticos de hoja inmadura de plantas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) Clorofila; B) Flavonoides; C) Antocianinas; D) NBI; E) Fv/Fm; F) NDVI. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

3.5. Correlaciones entre la biomasa y los parámetros fotosintéticos estudiados

Los coeficientes de correlación lineal, a nivel de tratamiento, entre las distintas variables estudiadas, y calculado a partir del muestreo realizado a los 17 días de haber establecido la fertilización diferencial, nos indican que las variaciones en biomasa están positivamente correlacionadas con el contenido de clorofila en hoja, y los índices NBI e NDVI. Es decir, aquellos tratamientos que dan lugar a plantas con mayor biomasa son aquellos que también presentan un mayor valor de estos

parámetros. Asimismo, existe una correlación negativa entre la biomasa y el contenido en antocianinas. La variable Fv/Fm también se considera significativa y relacionada positivamente con la biomasa (Tabla 3). Ello nos indica que los parámetros fotosintéticos seleccionados podrían ser buenos marcadores para la producción de biomasa de plantas en el estado fisiológico ensayado.

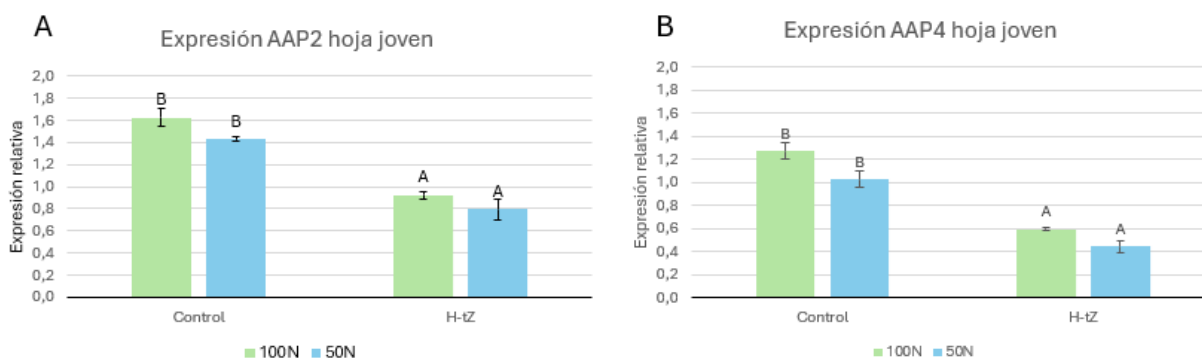
Tabla 3: Coeficientes de correlación estimados de Pearson producto-momento. El rango de las magnitudes de las correlaciones va de -1, correlación negativa, a +1, correlación positiva. Un p-Valor inferior a 0,05 ($P < 0.05$) se consideró significativo. Tabla de elaboración propia.

	Coeficientes de correlación estimados de Pearson producto-momento					
Biomasa	NDVI	NBI	Clorofilas	Flavonoides	Antocianinas	Fv/Fm
Coeficientes de correlación	0,85	0,84	0,86	-0,48	-0,78	0,57
p-Valor	0,0004	0,0007	0,0004	0,1112	0,0031	0,0541

3.6. Efecto de la disponibilidad de N y del tratamiento de citoquininas en la expresión de las permeasas *AAP2*, *AAP4* y *AAP6* en hoja. Interacción con el carácter fuente/sumidero de la misma

La expresión de las distintas *AAPs* se evaluó en hoja joven e inmadura, con carácter de sumidero, y en hoja madura con carácter de fuente de foto asimilados. Sólo se estudió la respuesta a largo plazo, a los 17 días tras el establecimiento de la fertilización diferencial, dado que a corto plazo no se observó un efecto claro en la biomasa de la disminución del aporte de nitrógeno.

Los resultados muestran una respuesta diferente, en función del tipo de permeasa estudiada, y del tipo de hoja considerada. La expresión de las permeasas *AAP2* y *AAP4* no se ve afectada por los factores estudiados en hojas maduras, que son fundamentalmente órganos exportadores de foto asimilados (Figura 10E-F). Sin embargo, la permeasa *AAP6* incrementa su expresión significativamente en estas hojas con carácter de fuente, con independencia del nivel de aporte nitrogenado, al tratar la planta con CKs (Figura 11).



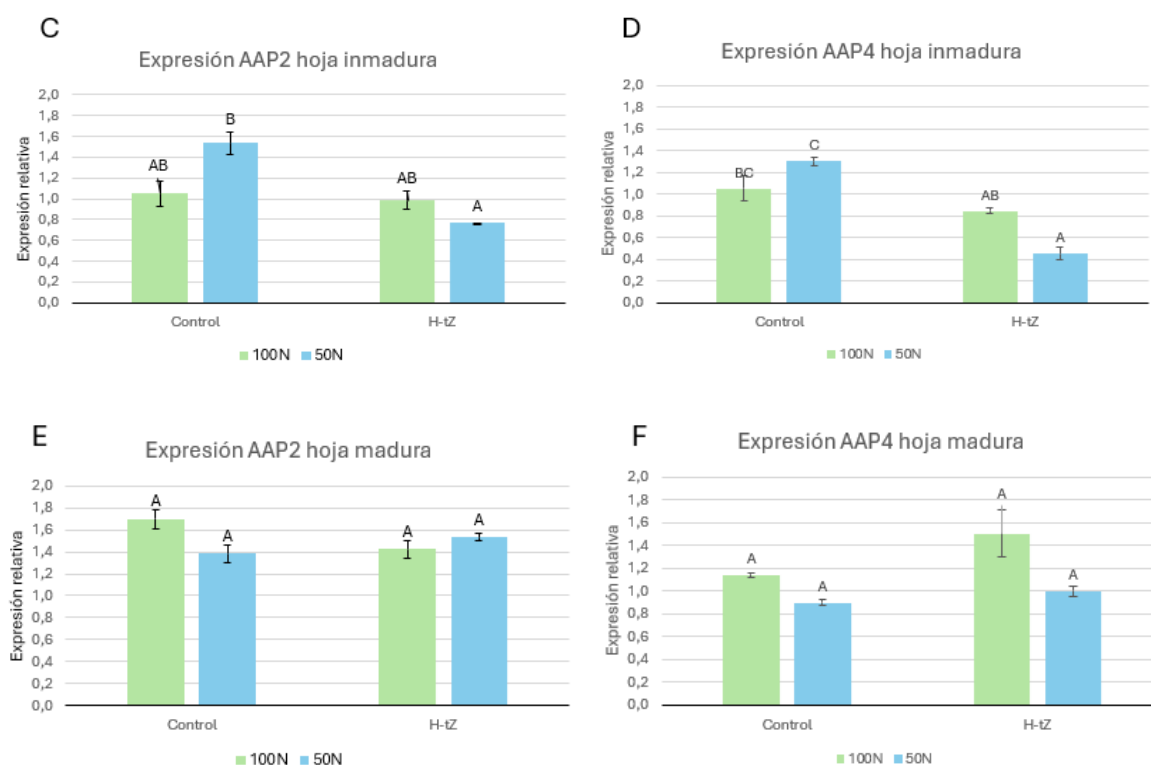


Figura 10: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ)) en los niveles de expresión de *AAP2* y *AAP4* en relación al gen 'housekeeping' *GADPH* en hojas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) *AAP2* hoja joven; B) *AAP4* hoja joven; C) *AAP2* hoja inmadura; D) *AAP4* hoja inmadura; E) *AAP2* hoja madura; F) *AAP4* hoja madura. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura

En hojas inmaduras y jóvenes, por el contrario, las permeasas *AAP2* y *AAP4* sí que se ven afectadas por el tratamiento hormonal, disminuyendo su expresión en las plantas tratadas con CKs (Figura 10A-D). En hojas jóvenes, este resultado se presenta en ambas condiciones ensayadas de aporte de N, mientras que en las hojas inmaduras sólo se da en condiciones de deficiencia de fertilización nitrogenada. En estas hojas, la permeasa *AAP6* incrementa su expresión cuando disminuye el aporte de N. El tratamiento con CKs tiene el mismo efecto, pero sólo en condiciones de fertilización óptima (Figura 11A-B).

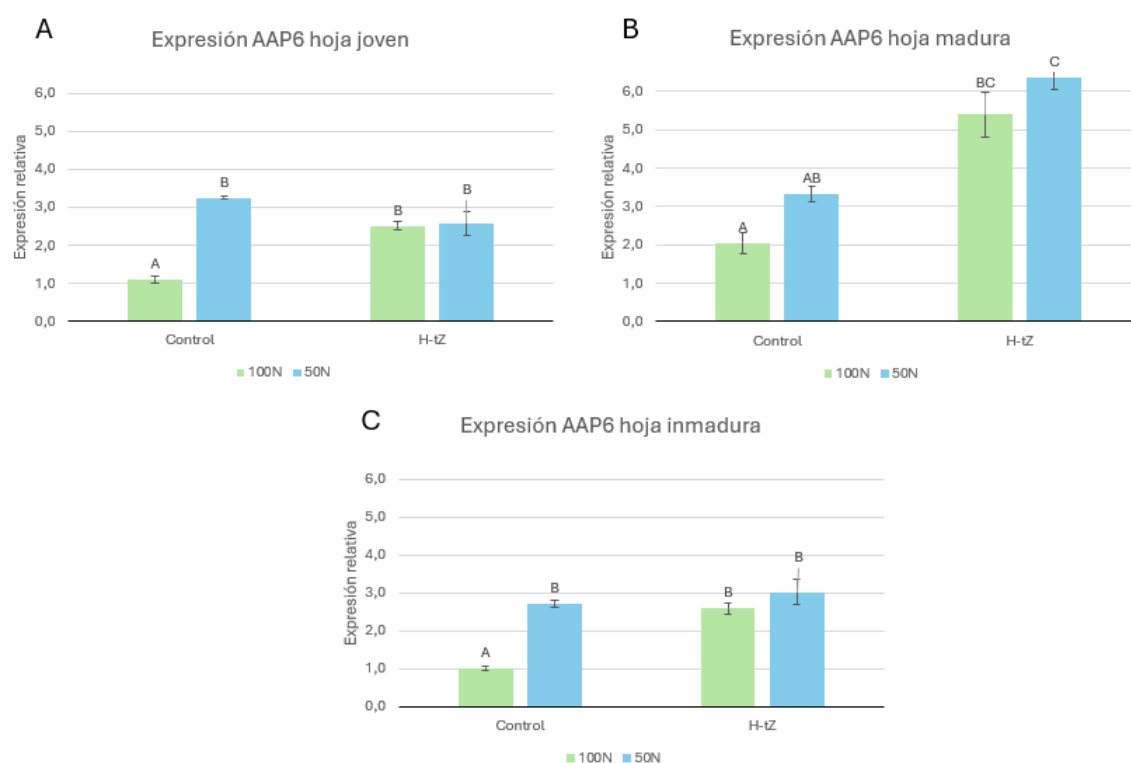


Figura 11: Efecto del aporte de nitrógeno (100N vs 50N) y de la aplicación de citoquininas (Control; tratamiento trans-Zeatina en hoja (H-tZ)) en los niveles de expresión de *AAP6* en relación al gen 'housekeeping' *GADPH* en hojas de tomate Money Maker, a los 17 días de establecer las diferencias en fertilización nitrogenada. A) *AAP6* hoja joven; B) *AAP6* hoja joven; C) *AAP6* hoja inmadura. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros de los tratamientos ($P < 0.05$). Figura de elaboración propia.

4. Discusión

Cuantitativamente, el N es el nutriente mineral más importantes para las plantas. La deficiencia de este elemento afecta a su desarrollo, reduciendo su capacidad fotosintética, su crecimiento (Mu y Chen, 2021; Zhao *et al.*, 2017) y afectando su productividad (Fracchiolla *et al.*, 2021). La fertilización de los cultivos resulta pues vital para asegurar una producción máxima, y desde la revolución verde la agricultura se ha basado en una aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, aproximadamente sólo la mitad del N aportado como fertilizante es absorbido por las plantas (Cordis, 2010), el resto se lixivia acabando en aguas superficiales o subterráneas (MITECO, s. f.). Las consecuencias en el medio ambiente de este uso masivo del N son conocidas y peligrosas (acidificación del agua y la tierra, eutrofización, pérdida de biodiversidad) para la salud de la fauna y flora, especialmente en los ecosistemas marinos costeros (Howarth, 2004). Por esta razón, la mejora de la NUE en los cultivos de interés económico, como es el tomate, es de gran interés y ha provocado un aumento de los trabajos sobre los procesos moleculares involucrados en el metabolismo del N (Liu *et al.*, 2022). La NUE se puede separar en dos componentes: la eficiencia de captación de N (NUpE) y la eficiencia de utilización de N (NUtE). El primero hace referencia a la capacidad

de las raíces de captar el N del suelo, proceso influenciado por múltiples variables como la disponibilidad del N en el suelo o la actividad de los transportadores de N; y el segundo indica cuanto del N tomado es asimilado y empleado para la formación de biomasa (Xu *et al.*, 2020).

Existen múltiples moléculas que las plantas utilizan como señalizadoras de la disponibilidad de N, una de ellas es el propio nitrato, pero también se han identificado ciertos péptidos y hormonas como las CKs (Sakakibara, 2021; Tabata *et al.*, 2004; Ota *et al.*, 2020). La disponibilidad de N controla la biosíntesis y acumulación de CKs en los diferentes tejidos de las plantas. Cuando la disponibilidad es alta, aumenta la concentración de CKs en las raíces. La CKs es transportada a la parte aérea donde promueve la actividad de los meristemos, pero también incrementa la fuerza de sumidero del tejido en donde se concentre (Sakakibara, 2021; Roitsch y Ehneß, 2000).

Se han descrito diversos genes diana que permiten incrementar la NUE, entre ellos los transportadores de nitrato *NRT2* (Zhang *et al.*, 2023) o de amonio *AMT1* (Gao *et al.*, 2023), encargados de la captación de N por parte de las raíces, o las *AAP* (Perchlik y Tegeder, 2018; Ji *et al.*, 2020), permeasas transportadoras de aas. Las AAPs están implicadas en el transporte de aas de carga neutra, y son de vital importancia en el desarrollo correcto de las plantas y la producción de biomasa (Yao *et al.*, 2023; Fang *et al.*, 2021). La alteración de su actividad también ha demostrado tener efecto sobre la concentración de CKs en los tejidos alterados, demostrando una relación entre las CKs y la actividad de los estos transportadores (Götz *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2019).

En este trabajo, hemos establecido las condiciones experimentales para poder ensayar el efecto del N y de la aplicación de CKs sobre la expresión de las AAPs en tomate. Las AAPs podrían estar reguladas por el nivel de N disponible para la planta y ser dianas de las CKs que actúan como señalizadoras del estado nutricional. De esta forma, estarían implicadas en los cambios en la fuerza de sumidero provocados por las CKs.

En tomate, la limitación de N afecta la fisiología y morfología de la planta. Los efectos a nivel de biomasa no se aprecian hasta aproximadamente una semana tras el cambio en la fertilización (Martínez *et al.*, 2005). En este trabajo, no se observó el efecto de la limitación del 50% del aporte de N a los 3 días para ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo, a los 17 días la biomasa de los distintos órganos sufrió una disminución en los tratamientos 50N.

A corto plazo, la aplicación de CKs en la raíz incrementó la biomasa del vástago, tanto en hojas como tallo, en condiciones de aporte completo de N. Resultados coincidentes con la literatura preexistente donde se ha descrito que la aplicación de CKs promueve la actividad de los meristemos, induciendo la morfogénesis, incrementando el número de células en división, el tamaño de las hojas (Gordon *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2003), así como retrasando su senescencia (Gan *et al.*,

1995). Cabe destacar que la aplicación foliar, sólo tuvo efecto sobre la biomasa del órgano de aplicación (hoja joven). A los 17 días, la aplicación de CKs en hojas afectó a la partición de foto asimilados, que se dirigen preferentemente a las hojas jóvenes. Sin embargo, en plantas de mayor tamaño radicular, no hay un efecto significativo de la aplicación de CKs en raíces. En tomate, trabajos previos han descrito efectos similares cuando se ha sobreexpresado la síntesis de CKs, aunque cuando la aplicación realizada es exógena el impacto es menor (Schwartz *et al.*, 2016).

La aplicación exógena de CKs ha demostrado poder suplir temporalmente la falta de nutrientes esenciales como el N en *Plantago major* L., incrementando la ratio de vástago/raíz. Aunque esta capacidad es solo temporal. A partir de los 7 días, la ratio disminuye incapaz de mantener el ritmo de crecimiento de una planta con nutrición completa (Kuiper y Staal, 1987). En nuestro experimento en tomate, también se observa este efecto a los 17 días cuando se aplicó CKs en las hojas jóvenes en plantas con limitación en el aporte de N. En estas condiciones, se mantiene la partición de fotoasimilados a las hojas jóvenes, descendiendo la biomasa de los restantes órganos, fundamentalmente la de la raíz. Estos resultados indican que las condiciones descritas de aplicación de CKs en hojas y su efecto a los 17 días es un modelo válido para determinar si las AAPs están mediando el efecto de la disponibilidad de N por CKs.

La fotosíntesis permite la conversión del dióxido de carbono y agua en moléculas orgánicas y oxígeno, usando la luz en los cloroplastos, siendo los productos de este proceso la principal fuente de biomasa en los cultivos (Li *et al.*, 2024; Mu *et al.*, 2021). Los pigmentos principales encargados de la absorción de la radiación fotosintéticamente activa son los carotenoides y las clorofilas (Li *et al.*, 2024). El exceso de luz absorbida puede disiparse como calor o emitirse como fluorescencia (Murchie y Lawson, 2013), que se relaciona con el parámetro Fv/Fm, indicador del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II y, por tanto, del estrés en las hojas. Otros parámetros comúnmente utilizados para evaluar el estrés de las plantas son el NBI, la acumulación de antocianinas y flavonoides, y el NDVI. El NBI es un indicador del estatus interno del N en la planta, se calcula midiendo la ratio clorofila/flavonoides, de manera que un NBI alto indica un mejor estado de salud de la planta (Flores-Saavedra *et al.*, 2024). Esto se debe a la relación lineal existente entre la concentración de clorofila y la fertilización de N (Ercoli *et al.*, 1993; Kulsum *et al.*, 2007), ya que se trata de un elemento fundamental no solo de la estructura de la clorofila, sino de todo el aparato fotosintético (Evans y Clarke, 2019). Los flavonoides son metabolitos secundarios y tienen una función protectora en la planta como moléculas antioxidantes que pueden proteger ante los radicales libres de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Shen *et al.*, 2022), moléculas altamente oxidantes que se generan ante estreses abióticos o bióticos que, como consecuencia, producen la inhibición del crecimiento de la planta, un menor rendimiento, la reducción de la concentración de la clorofila y de la eficiencia fotosintética (Naing *et al.*, 2021). Esta función antioxidante también es compartida

por las antocianinas, que también funcionan como pigmentos antioxidantes (Naing *et al.*, 2021). Por ello, tanto las antocianinas como los flavonoides incrementan la tolerancia a los estreses y son un buen indicativo del estado interno de la planta. El NDVI se calcula a partir de la reflectancia de la luz de las ondas roja e infrarroja cercana. Un NDVI bajo indica niveles altos de estrés (Elliott *et al.*, 2015). En general, ante una mayor disponibilidad de N, mayor es la concentración de clorofilas, el Fv/Fm, el NDVI y la biomasa producida, así como menor la acumulación de antocianinas y flavonoides, y, por tanto, mayor el NBI (Flores-Saavedra *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2023; Qin *et al.*, 2023).

Los resultados de nuestro trabajo han mostrado una correlación elevada del incremento en biomasa con los parámetros NDVI, NBI, Fv/Fm, contenido en clorofilas y antocianinas. Esto permite emplearlos como marcadores de estudios posteriores de mejora de la NUE. Como en el caso de la biomasa, estos parámetros no muestran variaciones significativas a corto plazo. Otros autores sí que han descrito efectos significativos a nivel fisiológico en tan solo un día de fertilización reducida en tomate, aunque puede deberse a que el déficit de N era completo en ese caso (Martínez *et al.*, 2005). Las correlaciones identificadas parecen indicar que el efecto de las CKs sobre la producción de biomasa puede explicarse tanto por la mayor fuerza de sumidero como por una mayor capacidad fotosintética. En experimentos previos en tomate, un aumento de la concentración de tZ en las hojas se ha relacionado con una mayor tasa fotosintética debido a una mayor cantidad de carbohidratos (Glanz-Ilan *et al.*, 2020). En arroz la aplicación de CKs exógenas, como la 6-benzialminopurina (6-BA) o la N-(2-cloro-4 piridil)-N'-fenilurea (CPPU), han demostrado también tener un efecto positivo sobre la fotosíntesis de las hojas fuente, incrementado el contenido de la clorofila y mejorando la capacidad de las hojas para absorber y utilizar energía lumínica, en el primer caso con un aporte de N adecuado (Wang *et al.*, 2020) y en el segundo en condiciones de estrés hídrico revertiendo la supresión de la proteína RuBisCO (Gujjar *et al.*, 2020).

Entre los dos tipos de hojas estudiadas: jóvenes (órgano sumidero de fotoasimilados) y maduras (órgano fuente), las consecuencias de la limitación de N se observan más marcadamente en las hojas maduras. Estos resultados coinciden con la literatura previa: en tomate la actividad de la fuente se ve más afectada que el sumidero en condiciones de deficiencia de N (Kanai *et al.*, 2008). Sin embargo, la aplicación de tZ reduce las diferencias entre grupos de fertilización, disminuyendo los valores de 100N y aumentando ligeramente los de 50N. La aplicación de CKs en hojas jóvenes parece generar en las hojas maduras una respuesta similar a la disminución del N, posiblemente debido a que este tratamiento hace exportar más N a las hojas jóvenes. La aplicación de CKs exógenas genera un aumento de la fuerza de sumidero provocando una acumulación de metabolitos como aas y sacarosa (Mothes y Engelbrecht, 1961; Zhu *et al.*, 2024). En *Arabidopsis*, la CK está involucrada en la regulación de genes como *SUS1*; una sacarosa sintasa; y transportadores de azúcares, como *STP1*, *SUC1* o *SWEET* (Brenner *et al.*, 2005; Jian *et al.*, 2016). En el transporte de la sacarosa, *SWEET* se encarga de su

liberación al apoplasto y SUC de su carga en el floema (Jian *et al.*, 2016). Su alteración tiene efectos sobre la acumulación de azúcares en los sumideros y el desarrollo y crecimiento de la planta (Zhang *et al.*, 2024). La CK puede modificar la expresión de las permeasas como las AAPs (Brenner *et al.*, 2005), cuya actividad es determinante en la partición de aas.

La AAP2 y la AAP4 estudiadas en *Arabidopsis* están involucradas en la carga del floema de los aminoácidos neutros y no aromáticos (Berg *et al.*, 2021; Tegeder y Ward, 2012; Zhang *et al.*, 2010). En tomate se desconoce el papel de las permeasas AAP2 y AAP4, aunque muestran una importante expresión en hojas maduras (datos no publicados). En este trabajo hemos encontrado un patrón de expresión similar en ambas permeasas en respuesta a los factores estudiados. En hojas maduras, las variaciones en la carga de aminoácidos por efecto de las CKs o N no parecen estar mediadas por estas permeasas. En hojas inmaduras, de carácter de sumidero, se da un descenso de la expresión de AAP2 y AAP4 en condiciones de deficiencia de N cuando se aplican CKs. Esto podría explicarse por un incremento de la fuerza de sumidero mediado por descarga simplástica. En la hoja joven, de posible carácter mixto fuente-sumidero, se observa una disminución de la expresión de estas permeasas al tratar con CKs. Nuestros resultados podrán sugerir un papel dual de estas permeasas tanto en la carga como en la descarga del floema. Estudios previos han indicado que la expresión de AAP2 estaba regulada negativamente tanto en *Arabidopsis* como en *Brassica* por las CK (Brenner *et al.*, 2005), al igual que AAP4 y AAP6 en *Brassica* (McIntyre *et al.*, 2021).

En *Arabidopsis*, AAP6 se encuentra en el parénquima del xilema y en órganos sumidero predominantemente (raíces, hojas sumidero y caulinares) (Rentsch *et al.*, 1996). Se trata de una permeasa de alta afinidad, lo que explica su localización y su función de transferencia de aas desde el xilema, donde la concentración de aminoácidos es inferior, hasta el floema (Tegeder y Rentsch, 2010; Hunt *et al.*, 2010). El incremento de la expresión de la AAP6 en tomate en condiciones de deficiencia de N y en todos los tipos de hoja podría indicar un papel tanto en la carga como en la descarga de aas. El aumento de expresión por adición de CKs en la hoja madura refuerza su importancia en la carga desde las hojas maduras. En soja se ha descrito que la sobreexpresión de AAP6 potenció la transferencia de aas desde las fuentes hacia los sumideros en condiciones de N deficientes, estimulando su crecimiento y ayudando a mantener el verdor de las hojas (Liu *et al.*, 2020). Esto apoya el papel propuesto para AAP6 en las fuentes, aunque quedaría por demostrar si se trata de genes ortólogos. Sin embargo, no hay datos previos indicando su implicación en la descarga en sumideros, como sugieren nuestros resultados.

5. Conclusiones

En este trabajo hemos establecido las condiciones experimentales para poder ensayar el efecto de la disponibilidad de N y de la aplicación de CKs sobre la expresión de las AAPs en tomate. Concretamente, mediante la aplicación de una

solución 10 μ M de tZ en hojas en desarrollo en plantas crecidas en un sustrato inerte y fertilizado con una solución tipo Hoagland con niveles diferenciales de aporte de N.

Se ha encontrado una correlación positiva de la variación en biomasa en respuesta a N y CK con el nivel de clorofila y parámetros relacionados como NDVI y NBI, y negativa con el contenido en antocianinas.

La aplicación de CK no ha provocado cambios en la biomasa total de la planta, pero sí una variación en la partición de fotoa asimilados, que se dirigen fundamentalmente a la hoja tratada, y provocando un incremento de su biomasa. Este efecto también se observó en condiciones de deficiencia de N. Cabe destacar que la CK compensa el efecto de disminución de la biomasa con el menor aporte N en el órgano tratado.

La expresión de las permeasas AAP2 y AAP4 muestra un patrón de variación similar frente a N y CKs. No muestran respuesta al disminuir el aporte de N. En hojas maduras, la expresión no es afectada por el aporte de CK mientras que, en hojas en desarrollo, la aplicación de CK disminuye su expresión.

La disminución de N incrementa la expresión de la AAP6 en hojas en desarrollo. Asimismo, se produce una mayor expresión de esta permeasa por aplicación de CKs en condiciones control, aunque la disminución de N no supone un incremento adicional de esta expresión. Estos resultados indican que la AAP6 puede estar mediando en el cambio de partición de foto asimilados a los órganos tratados con CKs, lo que la convierte en una posible diana de interés en futuros trabajos dirigidos a incrementar la eficiencia en el uso de N (NUE) en tomate.

6. Bibliografía

- Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR). (Septiembre de 2015). Resumen de salud pública: nitratos y nitritos. https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs204.pdf&ved=2ahUKEwiK05jh14WIAxWuiP0HHc0-GlcQFnoECBQQAQ&usq=AOvVaw2RFgg68N3_yvI3CJq_awKF
- Alzahrani, F. O. (2021). Genome Wide Analysis of Amino Acid Transporter Superfamily in *Solanum lycopersicum*. *Plants*, 10(2), 289. <https://doi.org/10.3390/plants10020289>
- Berg, J. A., Hermans, F. W. K., Beenders, F., Abedinpour, H., Vriezen, W. H., Visser, R. G. F., Bai, Y., & Schouten, H. J. (2021). The amino acid permease (AAP) genes CsAAP2A and SlAAP5A/B are required for oomycete susceptibility in cucumber and tomato. *Molecular plant pathology*, 22(6), 658–672. <https://doi.org/10.1111/mpp.13052>
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmölling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 44(2), 314–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2005.02530.x>
- Cordis, C. (8 octubre de 2010). *El nitrógeno antropogénico, una amenaza para la flora y fauna*. CORDIS | European Commission. <https://cordis.europa.eu/article/id/32627-people-squeezing-life-out-of-organisms-with-nitrogen/es>
- Elliott, N. C., Backoulou, G. F., Brewer, M. J., & Giles, K. L. (2015). NDVI to Detect Sugarcane Aphid Injury to Grain Sorghum. *Journal of economic entomology*, 108(3), 1452–1455. <https://doi.org/10.1093/jeet/tov080>

- Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A., & Massantini, F. (1993). Relationship between nitrogen and chlorophyll content and spectral properties in maize leaves. *European Journal Of Agronomy*, 2(2), 113-117. [https://doi.org/10.1016/s1161-0301\(14\)80141-x](https://doi.org/10.1016/s1161-0301(14)80141-x)
- Evans, J. R., & Clarke, V. C. (2019). The nitrogen cost of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 70(1), 7–15. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery366>
- Evans, R. D., Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., & Ehleringer, J. R. (1996). Nitrogen isotope composition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. T-5) grown under ammonium or nitrate nutrition. *Plant Cell & Environment.*, 19(11), 1317–1323. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00010.x>
- Fang, Z., Wu, B., & Ji, Y. (2021). The Amino Acid Transporter OsAAP4 Contributes to Rice Tillering and Grain Yield by Regulating Neutral Amino Acid Allocation through Two Splicing Variants. *Rice*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00446-9>
- Fischer, W., Kwart, M., Hummel, S., & Frommer, W. B. (1995). Substrate Specificity and Expression Profile of Amino Acid Transporters (AAPs) in Arabidopsis. *Journal Of Biological Chemistry*, 270(27), 16315-16320. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.16315>
- Flores-Saavedra, M., Villanueva, G., Gramazio, P., Vilanova, S., Mauceri, A., Abenavoli, M. R., Sunseri, F., Prohens, J., & Plazas, M. (2024). Nitrogen use efficiency, growth and physiological parameters in different tomato genotypes under high and low N fertilisation conditions. *Plant Physiology And Biochemistry*, 208, 108447. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108447>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (22 de junio de 2023). Visitado el 10 de mayo de 2024. *Production / Crops and livestock products – Metadata*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Fracchiolla, M., Renna, M., Durante, M., Mita, G., Serio, F., & Cazzato, E. (2021). Cover Crops and Manure Combined with Commercial Fertilizers Differently Affect Yield and Quality of Processing Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Organically Grown in Puglia. *Agriculture*, 11(8), 757. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080757>
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science*, 270(5244), 1986-1988. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1986>
- Gao, S., Yang, Y., Guo, J., Zhang, X., Feng, M., Su, Y., Que, Y., & Xu, L. (2023). Ectopic Expression of Sugarcane ScAMT1.1 Has the Potential to Improve Ammonium Assimilation and Grain Yield in Transgenic Rice under Low Nitrogen Stress. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(2), 1595. <https://doi.org/10.3390/ijms24021595>
- Glanz-Idan, N., Tarkowski, P., Turečková, V., & Wolf, S. (2019). Root–shoot communication in tomato plants: cytokinin as a signal molecule modulating leaf photosynthetic activity. *Journal Of Experimental Botany*, 71(1), 247-257. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz399>
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., & Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 106(38), 16529-16534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908122106>
- Gotz, K., Staroske, N., Radchuk, R., Emery, R. J. N., Wutzke, K., Herzog, H., & Weber, H. (2007). Uptake and allocation of carbon and nitrogen in *Vicia narbonensis* plants with increased seed sink strength achieved by seed-specific expression of an amino acid permease. *Journal Of Experimental Botany*, 58(12), 3183-3195. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm164>
- Gujjar, R. S., Banyen, P., Chuekong, W., Worakan, P., Roytrakul, S., & Supaibulwatana, K. (2020). A Synthetic Cytokinin Improves Photosynthesis in Rice under Drought Stress by Modulating the Abundance of Proteins Related to Stomatal Conductance, Chlorophyll Contents, and Rubisco Activity. *Plants*, 9(9), 1106. <https://doi.org/10.3390/plants9091106>
- Howarth, R. (2004). Human acceleration of the nitrogen cycle: drivers, consequences, and steps toward solutions. *Water Science & Technology*, 49(5-6), 7-13. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0731>

- Hunt, E., Gattolin, S., Newbury, H. J., Bale, J. S., Tseng, H., Barrett, D. A., & Pritchard, J. (2009). 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. (2019). 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>
- Ji, Y., Huang, W., Wu, B., Fang, Z., & Wang, X. (2020). The amino acid transporter AAP1 mediates growth and grain yield by regulating neutral amino acid uptake and reallocation in *Oryza sativa*. *Journal Of Experimental Botany*, 71(16), 4763-4777. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa256>
- Jian, H., Lu, K., Yang, B., Wang, T., Zhang, L., Zhang, A., Wang, J., Liu, L., Qu, C., & Li, J. (2016). Genome-Wide Analysis and Expression Profiling of the SUC and SWEET Gene Families of Sucrose Transporters in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01464>
- Kanai, S., Adu-Gymfi, J., Lei, K., Ito, J., Ohkura, K., Moghaieb, R. E., El-Shemy, H., Mohapatra, R., Mohapatra, P. K., Saneoka, H., & Fujita, K. (2008). N-deficiency damps out circadian rhythmic changes of stem diameter dynamics in tomato plant. *Plant Science*, 174(2), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.006>
- Kuiper, D., & Staal, M. (1987). The effects of exogenously applied plant growth substances on the physiological plasticity in *Plantago major* ssp. *pleiosperma*: Responses of growth, shoot to root ratio and respiration. *Physiologia Plantarum*, 69(4), 651-658. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb01980.x>
- Kulsum, M. U., Baque, M. A., & Karim, M. A. (2007). Effects of Different Nitrogen Levels on the Leaf Chlorophyll Content Nutrient Concentration and Nutrient Uptake Pattern of Blackgram. *Pakistan Journal Of Biological Sciences*, 10(2), 250-254. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.250.254>
- Li, X., Zhang, W., Niu, D., & Liu, X. (2024). Effects of Abiotic Stress on Chlorophyll Metabolism. *Plant Science*, 112030. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112030>
- Liu, Q., Wu, K., Song, W., Zhong, N., Wu, Y., & Fu, X. (2022). Improving crop nitrogen use efficiency toward Sustainable green Revolution. *Annual Review Of Plant Biology*, 73(1), 523-551. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070121-015752>
- Liu, S., Wang, D., Mei, Y., Xia, T., Xu, W., Zhang, Y., You, X., Zhang, X., Li, L., & Wang, N. N. (2020). Overexpression of GmAAP6a enhances tolerance to low nitrogen and improves seed nitrogen status by optimizing amino acid partitioning in soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 18(8), 1749-1762. <https://doi.org/10.1111/pbi.13338>
- Lu, J., Ertl, J. R., & Chen, C. (1990). Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Molecular Biology*, 14(4), 585-594. <https://doi.org/10.1007/bf00027504>
- Martinez, V., Amor, D., & Marcelis, L. F. M. (2005). Growth and physiological response of tomato plants to different periods of nitrogen starvation and recovery. *The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology*, 80(1), 147-153. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.1151190>
- 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>
- McIntyre, K. E., Bush, D. R., & Argueso, C. T. (2021). Cytokinin Regulation of Source-Sink Relationships in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers In Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.677585>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (20 de abril de 2023). Visitado el 11 de mayo de 2024. *Análisis campaña 2022/23 de hortalizas*. https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/analisiscampanahortalizas2022-23-20deabrilde2023_tcm30-652059.pdf&ved=2ahUKEWjo8rW6sIWGAxUVVqQEhU67BwgQFnoECBwQAQ&usg=AOvVaw1eV60BXFg5qXPAFLeZmXTWÇ
- Ministerio para la Transición Ecológica y el reto demográfico (MITECO). (S. f). Visitado el 13 de mayo de 2024. *Impacto de los nitratos y pesticidas en el uso y calidad de las aguas*.

<https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/proteccion-nitratos-pesticidas/impacto-calidad-agua.html>

- Mothes, K., & Engelbrecht, L. (1961). Kinetin-induced directed transport of substances in excised leaves in the dark. *Phytochemistry*, 1(1), 58-62. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)82812-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82812-5)
- Mu, X., & Chen, Y. (2021). The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. *Plant Physiology And Biochemistry*, 158, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.019>
- Muratore, C., Espen, L., & Prinsi, B. (2021). Nitrogen Uptake in Plants: The Plasma Membrane Root Transport Systems from a Physiological and Proteomic Perspective. *Plants*, 10(4), 681. <https://doi.org/10.3390/plants10040681>
- Murchie, E., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal Of Experimental Botany*, 64(13), 3983-3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Naciones Unidad (UN). (25 de septiembre de 2015). Visitado el 22 de julio de 2024. Objetivos de desarrollo sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/>
- Naing, A. H., & Kim, C. K. (2021). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1711-1723. <https://doi.org/10.1111/pp1.13373>
- Okumoto, S., Koch, W., Tegeder, M., Fischer, W. N., Biehl, A., Leister, D., Stierhof, Y. D., & Frommer, W. B. (2004). Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *Journal Of Experimental Botany*, 55(406), 2155-2168. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh233>
- 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. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(47), 45338-45346. <https://doi.org/10.1074/jbc.m207730200>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Visitado el 15 de mayo de 2024. *Nitrate/Nitrite*. <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/water-sanitation-and-health/chemical-hazards-in-drinking-water/nitrate-nitrite>
- Ortiz-Lopez, A., Chang, H., & Bush. (2000). Amino acid transporters in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2), 275-280. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00144-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00144-9)
- Ota, R., Ohkubo, Y., Yamashita, Y., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2020). Shoot-to-root mobile CEPD-like 2 integrates shoot nitrogen status to systemically regulate nitrate uptake in Arabidopsis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14440-8>
- 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>
- Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., Ghanem, M. E., & Dodd, I. C. (2010). Hormonal regulation of source - sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Functional Plant Biology*, 37(7), 592. <https://doi.org/10.1071/fp10012>
- Qin, K., Dong, X., & Leskovaar, D. I. (2023). Improving tomato nitrogen use efficiency with lignite-derived humic substances. *Scientia Horticulturae*, 321, 112243. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112243>
- Renau-Morata, B., Molina, R., Minguet, E. G., Cebolla-Cornejo, J., Carrillo, L., Martí, R., García-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. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071320>
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., & Frommer, W. B. (1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *The Plant Cell*, 8(8), 1437-1446. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1437>
- Roitsch, T., & Ehneß, R. (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*, 32(2/3), 359-367. <https://doi.org/10.1023/a:1010781500705>

- Rosado-Souza, L., Yokoyama, R., Sonnewald, U., & Fernie, A. R. (2023). Understanding source–sink interactions: Progress in model plants and translational research to crops. *Molecular Plant*, 16(1), 96-121. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.11.015>
- Sakakibara, H. (2020). Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *The Plant Journal*, 105(2), 421-430. <https://doi.org/10.1111/tpj.15011>
- Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS). (21 de mayo de 2018). Visitado el 24 de julio de 2024. Nitrogen and Water. <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/nitrogen-and-water>
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 383, 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Shwartz, I., Levy, M., Ori, N., & Bar, M. (2016). Hormones in tomato leaf development. *Developmental Biology*, 419(1), 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.023>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94-R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
- Sun, J., Jin, L., Li, R., Meng, X., Jin, N., Wang, S., Xu, Z., Liu, Z., Lyu, J., & Yu, J. (2023). Effects of Different Forms and Proportions of Nitrogen on the Growth, Photosynthetic Characteristics, and Carbon and Nitrogen Metabolism in Tomato. *Plants*, 12(24), 4175. <https://doi.org/10.3390/plants12244175>
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., & Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*, 346(6207), 343-346. <https://doi.org/10.1126/science.1257800>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2014). *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Sinauer Assoc. Inc, Sunderland. EEUU
- Tegeder, M., & Masclaux-Daubresse, C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist*, 217(1), 35-53. <https://doi.org/10.1111/nph.14876>
- Tegeder, M., & Rentsch, D. (2010). Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides. *Molecular Plant*, 3(6), 997-1011. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq047>
- Tegeder, M., & Ward, J. M. (2012). Molecular Evolution of Plant AAP and LHT Amino Acid Transporters. *Frontiers In Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00021>
- Tegeder, M., Rentsch, D., & Patrick, J. W. (2011). Organic Carbon and Nitrogen Transporters. En *Plant cell monographs* (pp. 331-352). https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_15
- Walch-Liu, P., Filleur, S., Gan, Y., & Forde, B. G. (2005). Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. *Photosynthesis Research*, 83(2), 239-250. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2080-9>
- Wang, J., Wu, B., Lu, K., Wei, Q., Qian, J., Chen, Y., & Fang, Z. (2019). The Amino Acid Permease 5 (OsAAP5) Regulates Tiller Number and Grain Yield in Rice. *PLANT PHYSIOLOGY*, 180(2), 1031-1045. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00034>
- Wang, Y., Lu, J., Ren, T., Li, P., Liu, Q., & Li, X. (2020). Effects of exogenous cytokinin on photosynthesis, senescence, and yield performance of inferior rice tillers grown under different nitrogen regimes. *Photosynthetica*, 58(1), 137-145. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.170>
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell*, 15(11), 2532-2550. <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>
- Wheeldon, C. D., & Bennett, T. (2021). There and back again: An evolutionary perspective on long-distance coordination of plant growth and development. *Seminars In Cell And Developmental Biology*, 109, 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.06.011>
- Xu, G., & Takahashi, H. (2020). Improving nitrogen use efficiency: from cells to plant systems. *Journal Of Experimental Botany*, 71(15), 4359-4364. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa309>

- Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review Of Plant Biology*, 63(1), 153-182. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105532>
- Yao, X., Li, H., Nie, J., Liu, H., Guo, Y., Lv, L., Yang, Z., & Sui, X. (2023). Disruption of the amino acid transporter CsAAP2 inhibits auxin-mediated root development in cucumber. *New Phytologist*, 239(2), 639-659. <https://doi.org/10.1111/nph.18947>
- Zayed, O., Hewedy, O. A., Abdelmoteleb, A., Ali, M., Youssef, M. S., Roumia, A. F., Seymour, D., & Yuan, Z. (2023). Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction. *Biomolecules*, 13(10), 1443. <https://doi.org/10.3390/biom13101443>
- Zhang, K., Wu, Y., & Hang, H. (2019). Differential contributions of NO₃⁻/NH₄⁺ to nitrogen use in response to a variable inorganic nitrogen supply in plantlets of two Brassicaceae species in vitro. *Plant Methods*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0473-1>
- Zhang, L., Tan, Q., Lee, R., Trethewy, A., Lee, Y., & Tegeder, M. (2010). Altered Xylem-Phloem Transfer of Amino Acids Affects Metabolism and Leads to Increased Seed Yield and Oil Content in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(11), 3603-3620. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073833>
- Zhang, X., Feng, J., Zhao, R., Cheng, H., Ashraf, J., Wang, Q., Lv, L., Zhang, Y., Song, G., & Zuo, D. (2023). Functional characterization of the GhNRT2.1e gene reveals its significant role in improving nitrogen use efficiency in Gossypium hirsutum. *PeerJ*, 11, e15152. <https://doi.org/10.7717/peerj.15152>
- Zhang, X., Sun, J., Liu, X., & Jiang, J. (2024). SISWEET10a negatively regulates sucrose transport in tomato fruit. *Vegetable Research*, 4(1), 0. <https://doi.org/10.48130/vegres-0024-0018>
- Zhao, L., Li, K., Wang, Q., Song, X., Su, H., Xie, B., Zhang, X., Huang, F., Chen, X., Zhou, B., & Zhang, Y. (2017). Nitrogen Starvation Impacts the Photosynthetic Performance of *Porphyridium cruentum* as Revealed by Chlorophyll a Fluorescence. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08428-6>
- Zhu, L., Liao, Y., Lin, K., Wu, W., Duan, L., Wang, P., Xiao, X., Zhang, T., Chen, X., Wang, J., Ye, K., Hu, H., Xu, Z., & Ni, J. (2024). Cytokinin promotes anthocyanin biosynthesis via regulating sugar accumulation and MYB113 expression in Eucalyptus. *Tree Physiology*, 44(1). <https://doi.org/10.1093/treephys/tpad154>
- Zotarelli, L., Dukes, M., Scholberg, J., Munoz-Carpena, R., & Icerman, J. (2009). Tomato nitrogen accumulation and fertilizer use efficiency on a sandy soil, as affected by nitrogen rate and irrigation scheduling. *Agricultural Water Management*, 96(8), 1247-1258. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.03.019>