



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

Respuesta de transportadores de nitrato a la deficiencia de
nitrógeno en cultivares de tomate con eficiencia en el uso
de nitrógeno (NUE) diferencial

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Rodríguez Santamarta, Victoria

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a: Molina Romero, Rosa Victoria

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

Universitat Politècnica de València

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)**

Grado en Biotecnología



**RESPUESTA DE TRANSPORTADORES
DE NITRATO A LA DEFICIENCIA DE N
EN CULTIVARES DE TOMATE CON
NUE DIFERENCIAL**

Alumno: Victoria Rodríguez Santamarta

Tutor: Sergio González Nebauer
Cotutora: Rosa Victoria Molina Romero

Curso académico 2021/2022
València, Julio 2022

Alumna: Victoria Rodríguez Santamarta

Tutor: Sergio González Nebauer

Cotutora: Rosa Victoria Molina Romero

Titulación: Biotecnología

Valencia, Julio 2022

Título:

Respuesta de transportadores de nitrato a la diferencia de N en cultivares de tomate con NUE diferencial.

Resumen:

Actualmente existe una gran preocupación por los problemas ambientales. Entre estos problemas destaca el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados para mantener un alto rendimiento de los cultivos, y poder alimentar a la población actual que crece cada año de forma exponencial. Esta sobrefertilización provoca contaminación de suelos y acuíferos, y ha contribuido al cambio climático. Además de mejoras en el manejo de los cultivos, en este contexto, es de gran importancia el desarrollo de cultivares con mayor eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE). La mejora genética enfocada al desarrollo de cultivares con elevada NUE requiere el conocimiento de las bases moleculares y fisiológicas de los procesos que componen la NUE, los cuales se pueden agrupar en absorción y utilización del nitrógeno. El conocimiento de la NUE disponible hasta el momento se restringe a pocas especies, fundamentalmente *Arabidopsis thaliana* y arroz. Siendo el tomate uno de los cultivos hortícolas más demandados, tanto para su consumo en fresco como en conserva, sería crucial el desarrollo de genotipos que requieran una menor aportación de nitrógeno, incrementando de esta forma la NUE y pudiendo reducir considerablemente el uso de fertilizantes nitrogenados.

La captación de N desde el suelo se produce principalmente en forma de nitratos. Se han descrito numerosos transportadores de nitrato en *Arabidopsis*, pero se conoce poco acerca de los implicados en la captación de esta molécula en tomate, y especialmente en las células del mesófilo, donde se considera que es incorporado mayoritariamente en tomate para su asimilación como aminoácidos. En un trabajo previo de este laboratorio, se identificaron en tomate MoneyMaker unos transportadores de la familia NPF que variaban su expresión en condiciones de limitación en el aporte de N, por lo que sugerían que podían tener un papel importante en las respuestas a la deficiencia en este macronutriente.

En este proyecto, se estudia la existencia de diferencias en el crecimiento vegetativo entre varios genotipos de tomate, seleccionados por sus diferencias en NUE, para relacionarlo con la expresión en hojas de los transportadores de nitrato *NPF1.17* y *NPF2.11*. Como resultados más destacables de este trabajo se obtuvo, en primer lugar, que los cultivares presentaron respuestas muy diferentes ante la carencia de nitrógeno. Es de destacar que la deficiencia de N afectó en menor medida a los parámetros de crecimiento en los genotipos MM y 82, y que el cultivar 32 fue el cultivar que se vio más afectado por la bajada de N. Además, se obtuvieron correlaciones significativas entre los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* con los parámetros estudiados al variar el aporte de N, siendo de especial importancia las correlaciones positivas que presentan ambos genes con la biomasa. El gen *NPF2.11* presentó correlación con la biomasa en tres de los genotipos estudiados, mientras que el gen *NPF1.17*, solamente varía de forma significativa en los genotipos MM y 70, que presentan valores altos de NUE y una elevada producción.

Palabras clave:

Tomate, nitrato, transportador, fertilizantes, biomasa, eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE)

Student: Victoria Rodríguez Santamarta

Professor: Sergio González Nebauer

Co-professor: Rosa Victoria Molina Romero

Degree: Biotechnology

Valencia, July 2022

Title:

Response of nitrate transporters to the difference of N in tomato cultivars with differential NUE.

Summary:

There is currently great concern about environmental problems. Among these problems is the excessive use of nitrogen fertilizers to maintain a high yield of crops, and to be able to feed the current population that grows exponentially every year. This overfertilization causes contamination of soils and aquifers and has contributed to climate change. In addition to improvements in crop management, in this context, the development of cultivars with greater efficiency in the use of nitrogen (NUE) is of great importance. Genetic improvement focused on the development of cultivars with high NUE requires knowledge of the molecular and physiological bases of the processes that make up the NUE, which can be grouped into absorption and use of nitrogen. The knowledge of the NUE available so far is restricted to a few species, mainly *Arabidopsis thaliana* and rice. Being the tomato one of the most demanded horticultural crops, both for fresh and canned consumption, it would be crucial to develop genotypes that require a lower contribution of nitrogen, thus increasing the NUE and being able to considerably reduce the use of nitrogen fertilizers.

The uptake of N from the soil occurs mainly in the form of nitrates. Numerous nitrate transporters have been described in *Arabidopsis*, but little is known about those involved in the uptake of this molecule in tomato, and especially in mesophilic cells, where it is incorporated mostly in tomato for assimilation as amino acids. In a previous work of the laboratory, transporters of the NPF family were identified in Moneymaker tomato that varied their expression under conditions of limitation in the contribution of N, so they suggested that they could have an important role in the responses to the deficiency in this macronutrient.

This project studies the existence of differences in vegetative growth between several tomato genotypes, selected for their differences in NUE, to relate it to the expression in leaves of nitrate transporters *NPF1.17* and *NPF2.11*. As the most remarkable results of this work, it was obtained, in the first place, that the cultivars presented very different responses to the lack of nitrogen. It is noteworthy that N deficiency affected to a lesser extent the growth parameters in genotypes MM and 82 and that cultivar 32 was the cultivar that was most affected by the decrease in N. In addition, significant correlations were obtained between the *NPF1.17* and *NPF2.11* genes with the parameters studied by varying the contribution of N, being of special importance the positive correlations that both genes present with the biomass. The *NPF2.11* gene showed correlation with biomass in three of the genotypes studied while the *NPF1.17* gene, although its correlation with biomass was only significant for the MM and 70 genotypes, these have high NUE values and a high production.

Keywords:

Tomato, nitrate, conveyor, fertilizers, biomass, nitrogen use efficiency (NUE)

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Reducción del uso de fertilizantes nitrogenados: un reto para la agricultura	1
1.2 Absorción, transporte y asimilación de nitrógeno	2
1.3 Transportadores de nitratos	4
1.4 Transportadores de amonio y urea	7
1.5 Deficiencia de nitrógeno en plantas: efectos a corto y largo plazo	8
1.6 Herramientas para la mejora de la NUE en tomate	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Material vegetal y tratamientos	11
3.1.1 Cultivares	11
3.1.2 Tratamientos	12
3.2 Genes estudiados	12
3.3 Germinación de semillas	13
3.4 Crecimiento y desarrollo	13
3.5 Medidas y análisis	13
3.5.1 Análisis de parámetros fotosintéticos: SPAD y fluorescencia	13
3.5.2 Muestreo y medidas de biomasa	14
3.5.3 Extracción RNA	14
3.5.4 Análisis mediante RT-qPCR	15
3.6 Análisis estadístico	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Variación entre cultivares en respuesta a la disminución del aporte de N para caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo	17
4.2 Variación entre cultivares en la expresión de los genes <i>NPF1.17</i> y <i>NPF2.11</i> en respuesta al déficit de nitrógeno	20
4.3 Análisis de componentes principales (PCA)	22
5. DISCUSIÓN	26
5.1 Diferencias en el desarrollo vegetativo de los cultivares en suministro subóptimo de nitrógeno y su relación con la NUE.	26
5.2 Relaciones entre la expresión de los genes <i>NPF1.17</i> y <i>NPF2.11</i> y los parámetros estudiados.	28
6. CONCLUSIONES	29
7. BIBLIOGRAFÍA	29

Índice de tablas

Tabla 3.1: Composición de las soluciones nutritivas propuesta por Hoagland y Arnon, basada en las proporciones de macro y micronutrientes absorbidas por plantas de tomate en concentraciones 8mM (solución completa 100N) y 4mM (50N).	12
Tabla 3.2 Mix de reactivos para la retrotranscripción.....	15
Tabla 3.3 Temperaturas de incubación para la reacción de retrotranscripción.....	.15
Tabla 3.4. Protocolo de la RT-qPCR.....	16
Tabla 4.1. Tabla de Pesos de los Componentes. Variables: Altura, SPAD (cantidad de clorofila), Biomasa (peso en fresco), Fv/Fm (rendimiento cuántico máximo), Φ PhiPSII (eficiencia efectiva del PSII), 2.11 (NPF2.11), 1.17 (NPF1.17)	21

Índice de figuras

Figura 1.1 NUE y sus componentes.	2
Figura 1.2. Esquema de los procesos de transporte de nitrógeno (N) y las relaciones fuente-sumidero a nivel de planta completa.	3
Figura 1.3. Red de plantas NUE.	4
Figura 1.4 Funciones fisiológicas de los transportadores de nitrato <i>NPF</i> de <i>Arabidopsis</i>	5
Figura 1.5 Regulación de la asignación de nitrato foliar en respuesta al suministro externo de nitrato (NO_3^-) en <i>Arabidopsis</i>	6
Figura 1.6. Línea del tiempo para los principales descubrimientos sobre nitratos en los últimos años.	10
Figura 3.1 Producción y NAE en genotipos MM, CV28, CV32, CV35, CV57, CV70, CV78, CV82. Gráficas obtenidas de estudios realizados por este laboratorio aún no publicadas. Se realizaron siguiendo a Weih et al., 2005.....	11
Figura 4.1 Medida de biomasa de cuatro genotipos de <i>Solanum lycopersicum L</i> en fase de desarrollo vegetativo para dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N) durante el muestreo realizado con fecha de 16 de marzo.	17
Figura 4.2 Altura medida en cuatro cultivares de <i>Solanum lycopersicum L</i> . en desarrollo vegetativo tras 14 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte suficiente de nitrógeno (100N) y aporte limitante (50N) en fecha 4 de marzo de 2022 dada en cm.....	18
Figura 4.3 Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la fotosíntesis en hojas jóvenes de plantas en fase de desarrollo vegetativo. Medida de SPAD, cantidad de clorofila, en hoja joven de cuatro genotipos de <i>Solanum lycopersicum L</i> . en dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno de aporte completo de nitrógeno (100N) y otro de aporte limitante de nitrógeno (50N) en fecha de 15 de marzo de 2022.	18

Figura 4.4 Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la fotosíntesis en hojas jóvenes de plantas en fase de desarrollo vegetativo. Medida del rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) y eficiencia efectiva del fotosistema II (PSII), medidos en condiciones de oscuridad y en luz respectivamente, para cuatro genotipos de <i>Solanum lycopersicum L</i> en dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N) en fecha de 15 de marzo de 2022.	19
Figura 4.5. Datos de expresión del gen <i>NPF1.17</i> en los cultivares estudiados MM, CV32, CV70, CV82 en hojas jóvenes para dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N)	20
Figura 4.6. Datos de expresión del gen <i>NPF2.11</i> en los cultivares estudiados MM, CV32, CV70, CV82 en hojas jóvenes para dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N).	20
Figura 4.7 Pesos de las componentes.	22
Figura 4.8 Diagrama de Dispersión. Distribución de las tres réplicas de los genotipos estudiados en cada componente.....	22
Figura 4.9 Relaciones lineales entre las variables en un rango de colores.....	23
Figura 4.10. Modelo ajustado de la regresión simple para la correlación entre biomasa y la expresión del gen <i>NPF2.11</i> . $r = 0,632^{**}$	24
Figura 4.11. Muestra la representación del modelo ajustado de la regresión simple para la correlación entre biomasa y la expresión del gen <i>NPF1.17</i> $r = 0,51^{*}$	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Reducción del uso de fertilizantes nitrogenados: un reto para la agricultura

En general, el 1,5-2% de la biomasa seca de la planta consiste en nitrógeno (**Frink, et al., 1999**) por lo que es el macronutriente esencial que se encuentra en mayor cantidad en las plantas, siendo por ello su disponibilidad clave en el crecimiento y la productividad de éstas. El nitrógeno es un componente clave en enzimas, vitaminas, clorofila y otros componentes de la célula, todos ellos esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas, lo que hace que el nitrógeno sea uno de los nutrientes más valiosos para obtener una buena producción (**Guardiola J.L., 2022**).

Los nutrientes nitrogenados pueden ser captados por la planta en forma inorgánica (tanto en forma de nitrato [NO₃-] como de amonio [NH₄+]) u orgánica (en forma de urea, aminoácidos y péptidos) (**Wang, et al., 2018**). La aplicación de nitrógeno en suelos es necesaria ya que las plantas lo requieren en gran cantidad y a menudo muestran deficiencias de este. El suelo puede perder nitrógeno a lo largo del tiempo, estas pérdidas se deben fundamentalmente a la desnitrificación, volatilización y lixiviación (**Morales, et al., 2019**). La desnitrificación consiste en el proceso por el que los óxidos de nitrógeno (NO₃ y NO₂) son reducidos a óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O) por la enzima reductasa, transformándose finalmente en nitrógeno gaseoso (N₂), lo que implica pérdidas de nitrógeno en el suelo que llegan a la atmósfera. También, la volatilización ocasiona mermas de nitrógeno significativas en suelos secos, ácidos y calcáreos debido a que el amoníaco (NH₃) es un gas volátil, y la lixiviación, que consiste en el transporte de nitrógeno por el agua a las zonas profundas del suelo donde no llegan las raíces de las plantas haciendo que no sea aprovechable por los cultivos. La lixiviación de nitratos (NO₃) es inevitable a pesar de la implementación de mejores prácticas agrícolas, tales como el manejo del recurso hídrico y la adecuada fertilización nitrogenada (**Morales, et al., 2019**). Esto hace que las plantas solo pueden utilizar un máximo del 75% del aporte de nitrógeno (**Gutiérrez, et al., 2012**).

Por todo ello, dados su elevado requerimiento y la facilidad con que se pierde del suelo, el N es considerado como uno de los insumos más utilizado en la agricultura, a nivel mundial, después del agua (**Frink, et al., 1999**). El consumo de fertilizantes nitrogenados es actualmente muy elevado, concretamente de 118 millones de toneladas por año en todo el mundo, lo que representa el 59% del total de fertilizantes (**FAO 2017**). Aunque la producción y aplicación masiva de estos fertilizantes nitrogenados ha permitido mantener el gran incremento del rendimiento de los cultivos durante el pasado siglo, el uso excesivo de los mismos también ha generado importantes problemas medioambientales. El N al pasar por otros ecosistemas terrestres, reduce la biodiversidad, contamina el aire, el agua y agrava el calentamiento global (**Morales, et al., 2019**). Un ejemplo de ello es la proliferación descontrolada de algas fitoplanctónicas (eutrofización), debido al exceso de nutrientes presentes en las aguas en las que se acumulan compuestos nitrogenados, que provoca efectos adversos en las masas de agua afectadas, como lagos o embalses. Además, otro efecto perjudicial de los fertilizantes nitrogenados son los procesos de producción, los cuales generan importantes emisiones de óxido nitroso, un gas de efecto invernadero y contribuyente clave del calentamiento global (**Vidal, et al., 2020**). El exceso de N prolonga el período de crecimiento vegetativo, retrasa la madurez, disminuye el contenido de azúcar, y también atrae plagas de insectos y causa epidemias de enfermedades (**Fu, et al., 2015**). Su uso también está generando problemas a nivel de salud humana. El nitrato no absorbido se filtra al agua subterránea, lo que genera la contaminación pozos y acuíferos contaminando el agua para consumo humano. También causa problemas al llegar a la atmósfera en estado gaseoso. Estudios publicados en la revista WHO sobre poblaciones humanas indican que la exposición a largo plazo al NO₂ a niveles elevados puede provocar una disminución de la función pulmonar y aumentar el riesgo de aparición de síntomas respiratorios.

Sin embargo, para satisfacer las demandas de una población en crecimiento se necesita generar un elevado rendimiento en los cultivos, por lo que se debe hacer uso de grandes cantidades de

fertilizantes nitrogenados. Por las razones explicadas anteriormente, debido a los altos costos de los fertilizantes nitrogenados en la producción agrícola, y también por el efecto nocivo contaminante de estos para el medio ambiente, sería deseable desarrollar estrategias para reducir el insumo de nitrógeno y, al mismo tiempo, mantener la productividad. Una comprensión más completa de las bases moleculares y fisiológicas de la absorción de N y del metabolismo de las plantas puede revelar estrategias para lograr estos objetivos, (Vidal, et al., 2020 y Wang, et al., 2020) aumentando de esta forma la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE) para la producción en cultivos.

Actualmente, una gran parte de la investigación en este contexto se centra en el estudio de la eficiencia en el uso del N (NUE) Este parámetro depende de diversos factores fisiológicos y metabólicos, como la absorción de nitrógeno del suelo, la asimilación de nitrógeno en las raíces, el transporte a otras partes de la planta, la interacción entre las fuentes y los sumideros, así como de los mecanismos de señalización y regulación del contenido en N (Fu, Y. et al., 2015). La NUE se puede definir como la producción de biomasa de la planta por unidad de nitrógeno absorbida, y se compone de dos términos. En primer lugar, la capacidad de la planta para absorber N del suelo denominada "eficiencia de absorción de nutrientes" (NUpE) y, en segundo lugar, la capacidad de la planta para transferir N a los órganos y el utilizado para su propio rendimiento, conocida como "eficiencia de utilización de nutrientes" (NUtE) (Abenavoli, et al., 2016) (Figura 1.1)

Por lo tanto, la identificación de genes capaces de mejorar el crecimiento de las plantas en condiciones de bajo N se considera fundamental para desarrollar una agricultura sostenible. Aunque en los últimos años se han realizado trabajos para identificar, mediante estudios agronómicos, fisiológicos y genéticos, los pasos limitantes de la NUE en especies de cultivo en función de las condiciones ambientales y se han identificado algunos genes cuya expresión mejora la absorción y asimilación de nitrógeno, la información disponible sobre los genes que podrían mejorar potencialmente el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones limitantes de nitrógeno sigue siendo insuficiente (Sakuraba et al., 2021). Se hace necesario saber más sobre genotipos que puedan regular al alza el sistema de transporte de nitratos, y modular su arquitectura radicular para responder de forma adaptativa al bajo contenido de nitrógeno (Abenavoli et al., 2016 e Iqbal et al., 2020)

$$NUpE = N \text{ contenidos en planta} / N \text{ supplied}$$

$$NUtE = \text{Rendimiento} / N \text{ contents in plant}$$

$$NUE = NUpE \times NUtE$$

Figura 1.1 NUE y sus componentes. Fuente: Fu et al., 2015, FEBSletters

1.2 Absorción, transporte y asimilación de nitrógeno

La absorción de nitrógeno en las plantas está altamente regulada. Las plantas absorben nitrato a través de transportadores localizados en la membrana plasmática de células epidérmicas y corticales de la raíz en un amplio rango de concentraciones y utilizando varios mecanismos de transporte, incluidos sistemas de transporte de alta y baja afinidad constitutivos e inducibles por diferentes formas de nitrógeno. El nitrógeno es absorbido fundamentalmente en forma inorgánica,

como NO_3^- (nitrato) y NH_4^+ (amonio). El nitrato (NO_3^-) es la fuente principal de N en la mayor parte de sistemas naturales (Vidal, E. et al., 2020). Es altamente móvil y fácilmente disponible en el suelo debido a su forma aniónica (Jin, et al., 2015). El nitrato constituye la forma nitrogenada que induce el mayor número de transportadores tanto de afinidad alta como de afinidad baja. Además, induce la síntesis de otros enzimas como el nitrato reductasa (NR) y el nitrito reductasa (NiR), que son enzimas de asimilación de nitrato. Asimismo, afecta a las enzimas de la vía GOGAT para la asimilación de amoníaco (Wang, et al., 2001) (Figura 1.2).

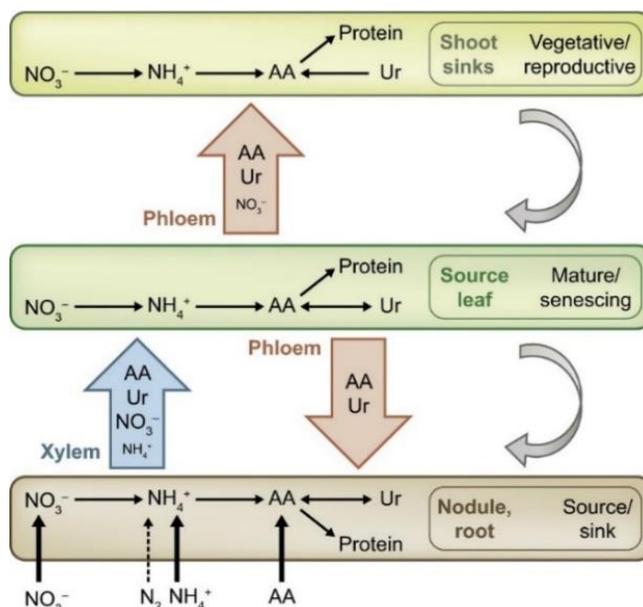


Figura 1.2. Esquema de los procesos de transporte de nitrógeno (N) y las relaciones fuente-sumidero a nivel de planta completa. Los flujos de N desde el suelo hasta la raíz, la hoja y los sumideros implican el transporte a corta y larga distancia de N inorgánico y orgánico. El xilema y el floema conectan las fuentes con los sumideros y son esenciales para la movilización de N. Fuente: Zhao et al., 2018. International journal of molecular sciences.

El nitrógeno, en su forma de nitrato, debe ser incorporado en aminoácidos. Para ello, se hace necesaria su reducción a nitrito. Este proceso se lleva a cabo mediante el enzima nitrato reductasa (NR). A continuación, el nitrito resultante se reduce, a su vez, a amoníaco por el nitrito reductasa (NiR) en las células del mesófilo. La asimilación de amoníaco a aminoácidos se lleva a cabo a través de la glutamina sintasa (GS), glutamina oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), y de la asparagina sintetasa (ASN) (Khrook, et al., 2010).

La asimilación puede tener lugar en las hojas o raíces, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. De esta forma, los aminoácidos y el nitrato se transportan a través del xilema hasta las hojas (Zhao, L. et al., 2015). Las enzimas citosólicas GS1 y GS2 desempeñan un papel importante en la asimilación primaria de N en las raíces, especialmente en condiciones de elevado contenido en nitrato (Lothier, et al., 2011). Las isoformas de GS1, inducida en las células del mesófilo durante la senescencia de las hojas, promueven la carga de N en el floema para su traslocación y de esta forma reasimilar el amoníaco generado en el catabolismo de aminoácidos (Lothier, et al., 2011). En *Arabidopsis thaliana*, la familia de genes GS abarca cinco genes bien estudiados que codifican para las diferentes isoenzimas GS1, (GLN1;1 a GLN1;5). GS2 está codificado por un solo gen, GLN2;0 y los mutantes

defectuosos en esta isoenzima aún no están caracterizados en el modelo vegetal *Arabidopsis*. Se cree que el GS2 está involucrado en la eficiencia del uso de N. Estudios en plantas diferentes a *Arabidopsis*, como la cebada, han demostrado que los mutantes con ausencia de GS2 no son viables (Ferreira, et al., 2019). Sin embargo, no existe correlación entre la presencia de GS2 en

las raíces y la asimilación de nitratos (Ferreira, et al., 2019). Por otro lado, las isoformas de *GOGAT* son dependientes de ferredoxina y se encuentran en cloroplastos del mesófilo, mientras que *NADH-GOGAT* está presente en las células de hojas y raíces, lo cual contribuye aún más a la asimilación de N (Tegeder, et al., 2018).

Cuando las formas de nitrógeno han ingresado a la planta pueden ser almacenados por los tejidos radiculares, reducidos y sintetizados en aminoácidos, o depositados en el xilema para su transporte a través del tallo. Los nitratos se acumulan en las vacuolas en conexión con el citosol y se pueden almacenar en las vacuolas de las raíces, brotes y órganos de almacenamiento, desde donde puede ser recuperados. El nitrato almacenado en las vacuolas puede ser un depósito de N que se utilizará cuando el suministro externo de N es bajo.

Para decidir la cantidad de nitrato que se almacenará en las vacuolas para su uso posterior y la partición de nitrato asignado a otros tejidos, las plantas deben controlar de manera efectiva los niveles de suministro externo de nitrato, responder a la demanda de nitrógeno de sus diferentes tejidos y, finalmente, comunicar sistemáticamente la información para activar las enzimas metabólicas y los transportadores a través de la transcripción o regulación postranscripcional. (Wang et al., 2001 y Wang et al., 2018).

1.3 Transportadores de nitratos

Las proteínas transmembrana son imprescindibles en la absorción de nitrato y para su transporte y translocación entre células, tejidos y órganos. Existen cuatro familias de proteínas transmembrana que participan en estos procesos, la familia de transportadores de nitrato 1 *NRT1*/Transportador de péptidos PTR también conocido como *NPF*, la familia de transportadores de nitrato 2 (*NRT2*), la familia del canal de cloruro *CLC* y el canal de anión de activación lenta *SLAC* (Liu et al., 2022). Todos estos transportadores se expresan en diferentes partes de la planta para participar en la distribución y el metabolismo de los nitratos (Chao, et al., 2021) (Figura 1.3).

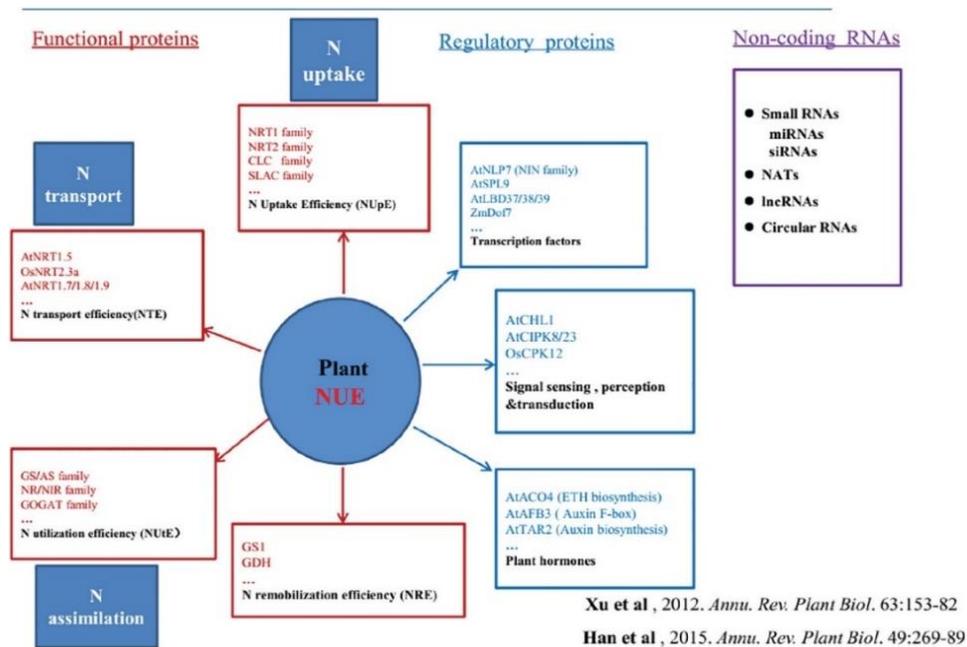


Figura 1.3. Red de plantas NUE. En las plantas, se sabe que cuatro familias de transportadores están involucradas en la absorción y el transporte de nitrato. Fuente: Iqbal et al., 2020. *Journal of the science of food and agriculture*.

En las plantas, los miembros de *NPF/NRT1* se caracterizaron, inicialmente, como transportadores de nitratos o péptidos (Leran, et al., 2014). En *Arabidopsis*, los transportadores de la familia *NPF* tienen de forma general, una baja afinidad por NO_3^- . Los miembros de *NPF* se dividen en ocho subfamilias (de *NPF1* a *NPF8*). *NPF6.3*, conocido como *AtNRT1.1*, fue el primer miembro descubierto como transportador de nitratos en *Arabidopsis*. Anteriormente, *NRT1.1* se identificó como un transportador de nitrato de doble afinidad, que trabaja en concentraciones bajas y altas de nitrato (Bohnoer, et al., 2015). Posteriormente, se demostró que *NRT1.1* controla la arquitectura radicular actuando como un sensor de nitrato potencial, y que se encuentra involucrado en la respuesta primaria de nitratos. Un estudio del laboratorio de Crawford identificó un mutante con una respuesta defectuosa al nitrato, y se determinó que la mutación estaba localizada en *NRT1.1* (Wang, et al., 2009) La caracterización del mutante reveló que cuando las plantas utilizan nitrato, el papel de *NRT1.1* se pierde, y son otros sensores como el *NiR* o *NRT2.1* los dominantes en la respuesta a N. (Wang, et al., 2009 y Bouguyon, et al., 2015) (Figura 1.4)

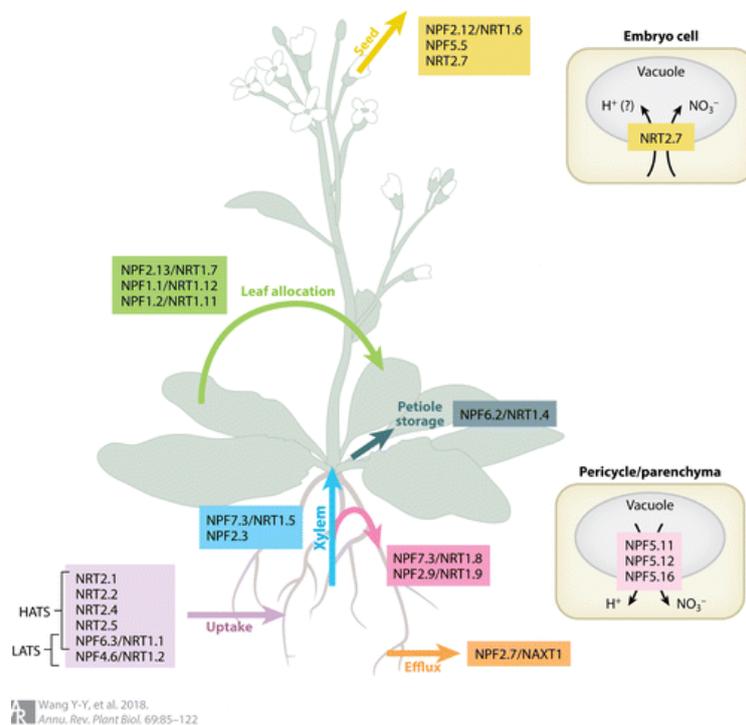
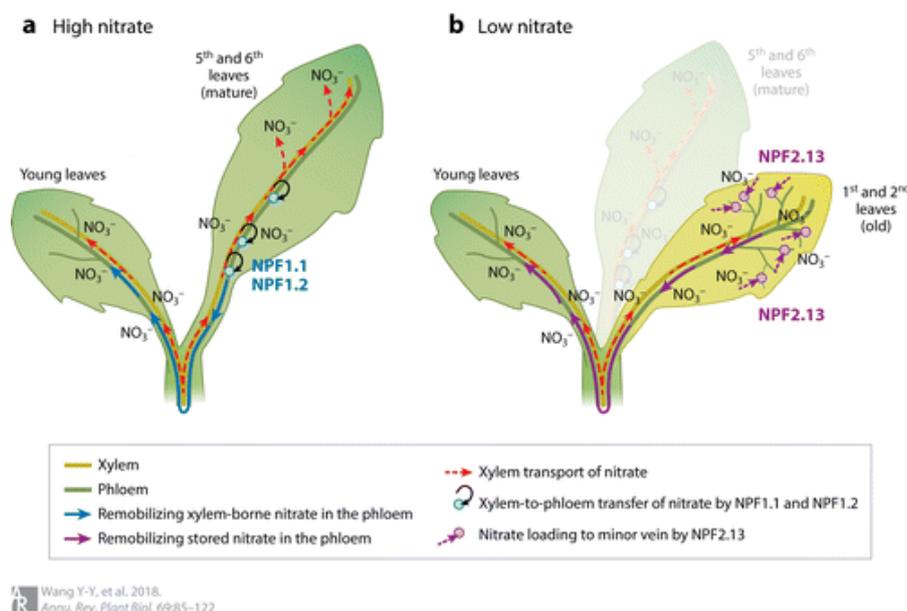


Figura 1.4 Funciones fisiológicas de los transportadores de nitrato *NPF* de *Arabidopsis*. Se muestran las funciones de absorción y salida de nitrato del suelo, así como el transporte de raíz a brote, la distribución de nitrato entre las hojas y el desarrollo de semillas. Abreviaturas: HATS, sistema de transporte de alta afinidad. LATS, sistema de transporte de baja afinidad. *NPF*, familia de transportadores de nitratos 1 (*NRT1*) /transportadores de péptidos (*PTR*); *NRT*, transportadores de nitratos. Fuente: Wang Y. et al., 2018. Annual review of plant biology

Más adelante, algunos miembros de *NPF* se identificaron en diferentes plantas, demostrándose que se comportan como transportadores de dipéptidos. Sin embargo, en los últimos años, varios estudios evidenciaron que algunos miembros de *NPF/NRT1* podrían transportar una gama aún más amplia de sustratos, incluyendo nitrito, cloruro, auxina (IAA), ácido abscísico (ABA), jasmonatos (JA), giberelinas (GA) y glucosinolatos. Además, algunos de los miembros de *NPF* incluso pueden transportar más de un sustrato diferente: nitrato / IAA, nitrato / ABA, nitrato / glucosinolatos, péptidos / aminoácidos o GA / JA. (Chao, et al., 2021) (Figura 1.5) Otros ejemplos de importantes participantes en la redistribución de nitrato a través del xilema, pertenecientes a la familia *NPF/NRT1* son *NPF1.1* y *NPF1.2* de *Arabidopsis*, los que se encargan de generar un crecimiento en la planta. La subfamilia *NPF2* contiene transportadores de nitrato, fitohormonas y glucosinolatos en *Arabidopsis*, *NPF2.3*, como transportador radicular, contribuye

a la translocación de nitratos a hojas bajo estrés salino. Otro ejemplo es *NPF2.12* que es responsable del desarrollo embrionario temprano dependiente de nitratos. Existen cinco miembros de *NPF* que son capaces de transportar glucosinolatos en la subfamilia *NPF2* (Chao, et al., 2021) como es el caso del transportador *NPF2.11* (Chao, et al., 2021)



Wang Y-Y, et al. 2018. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69:85-122

Figura 1.5 Regulación de la asignación de nitrato foliar en respuesta al suministro externo de nitrato (NO_3^-) en *Arabidopsis*. Se muestran los transportadores *NPF1.1*, *NPF1.2* y *NPF2.13*. Si la concentración de nitrato es suficiente este es transportado por el xilema y se redistribuye mediante *NPF1.1* y *NPF1.2* por el floema de las hojas viejas para sustentar a las hojas jóvenes en desarrollo. Sin embargo, si el suministro de nitrato es limitado, el nitrato almacenado en las hojas viejas es removilizado por *NPF2.13* en el floema para satisfacer la demanda de nitrógeno en las hojas jóvenes. Abreviatura: *NPF*, familia de transportadores de nitrato 1 (*NRT1*)/transportadores de péptidos (*PTR*). Fuente: Wang Y. et al., 2018 *Annual review of plant biology*

Además, algunos transportadores pertenecientes a la familia *NRT1/NPF* se encargan de transportar nitrato a las partes aéreas. Algunos de ellos como *AtNPF7.3*, *AtNPF7.2* y *AtNPF2.9* participan en este transporte de larga distancia. En primer lugar, *NRT1.5* se expresa en las células del periciclo y carga el nitrato en el xilema. *AtNPF7.2* se expresa en las células del parénquima del xilema y también tiene la función de descargar el nitrato. Por último, *AtNPF2.9* se expresa en las células acompañantes del floema, eliminando el nitrato de la savia y actuando en el transporte de nitrato a la raíz. (Fu, et al., 2015)

En general, las proteínas *NRT1/NPF* son sistemas de transporte de baja afinidad (LATS), mientras que las proteínas *NRT2* corresponden a sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) (Miller, et al., 2007). Hasta la fecha, se ha demostrado que *NRT1.1*, *NRT1.2*, *NRT2.1*, *NRT2.2*, *NRT2.4* y *NRT2.5* desempeñan un papel clave en la absorción radicular de NO_3^- . Sin embargo, está claro que la actividad de HATS depende predominantemente de la proteína *NRT2.1*. De hecho, mutantes para *NRT2.1* han perdido hasta el 75% de la actividad de HATS (Jacquot, et al., 2020). La isoforma *NRT2.1* que contribuye de forma importante a la actividad HATS total, necesita una proteína asociada llamada *NAR2.1* para funcionar. (Lupini, 2017) *NAR2* forma un complejo con *NRT2* para mantener su estabilidad. El genoma de arroz, el cuál es mucho mayor al de *Arabidopsis*, tiene solo cuatro genes *NRT2* y dos genes *NAR2*. (Wang, et al., 2018) *AtNRT2.1* y *AtNRT2.2* se conocen como dos de los genes responsables de la absorción de nitrato de alta afinidad en *Arabidopsis*. También se ha demostrado en varios estudios que *AtNRT2.4* y *AtNRT2.5* están involucrados en la absorción de nitrato, pero su contribución solamente aparece

a bajas concentraciones de nitrógeno. Todos estos transportadores se expresan en zonas distintas de la raíz. *AtNRT2.1* se expresa en la zona vieja de la raíz principal, *AtNRT2.4* en la parte más joven de la raíz primaria y la región distal de las raíces laterales, y *AtNRT2.5* en los pelos radiculares de las raíces primarias y laterales (Wang, et al., 2018).

1.4 Transportadores de amonio y urea

Además del nitrato, el amonio también es una forma inorgánica de nitrógeno que las plantas pueden absorber directamente del suelo. En los suelos secos, el nitrato sirve como la fuente de nitrógeno principal. Sin embargo, en suelos húmedos, o ácidos, el amonio sustituye al nitrato como principal forma de nitrógeno. Los costos de energía para la planta en el proceso de absorción y utilización de amonio son menores que con el nitrato ya que al suministrar ambas formas de N, la capacidad de absorción de alta afinidad del amonio es significativamente mayor que la del nitrato, independientemente del estado nutricional de N de las plantas. Esto indica una preferencia relativa por el amonio sobre el nitrato de los HATS correspondientes en las raíces. (Gu, et al., 2013).

La absorción de amonio en las plantas está dominada por el sistema de absorción de amonio de alta afinidad, cuya capacidad para absorber amonio aumenta con el aumento de la concentración suministrada y alcanza la saturación a aproximadamente 1mM. En una amplia gama de organismos, el transporte de amonio a través de las membranas está mediado por proteínas de la familia transportador de amonio permeasa/proteína Rheus (*AMT/MEP/Rh*) En *Arabidopsis thaliana*, cuatro homólogos de la familia *AMT* (*AMT1;1*, *AMT1;2*, *AMT1;3* y *AMT1;5*) y un homólogo de la subfamilia *MEP* (*AMT2;1*) se expresan en las raíces, mientras que *AMT1;4* está altamente expresado en el polen (Yuan et al., 2009). Las proteínas de tipo *AMT1* expresadas en raíz *AMT1;1*, *AMT1;2*, *AMT1;3* y *AMT1;5* son los principales transportadores de la absorción de amonio de alta afinidad en las raíces de *Arabidopsis*. Dos de estos transportadores, *AMT1;1* y *AMT1;3*, muestran una localización predominante en las células rizodérmicas y corticales, incluidos los pelos radiculares, y son responsables de aproximadamente dos tercios de la capacidad de absorción de amonio de alta afinidad en las raíces. La localización de *AMT1;2* en la membrana plasmática de las células endodérmicas y corticales, a su vez, indica que puede mediar en la absorción de amonio que entra en la raíz a través de la ruta de transporte apoplásico. (Giehl, et al., 2017). En la planta modelo *Arabidopsis*, *AtAMT2* se concentra preferentemente en el periciclo tras la exposición a amonio. Existe además una cooperación de *AtAMT2* con *AtAMT1;2*, o *AtAMT1;3* en el proceso de translocación de amonio desde la raíz (Hao, et al., 2020).

Las plantas, además de formas inorgánicas de N, también son capaces de absorber urea. En los tejidos vegetales, la urea se encuentra en concentraciones de micro a milimolares que se derivan principalmente de dos fuentes. Por un lado, la urea presente en el suelo de forma natural aportada por la degradación de la materia orgánica, y los excrementos animales. Por otro lado, aquella que se obtiene como una forma importante de nitrógeno (N) a partir de fertilizantes utilizados en la producción agrícola (Bohner, et al., 2015). Aunque las interacciones de NO_3^- y NH_4^+ en la captación y asimilación son bien conocidas, las interacciones de la urea con estas formas de N inorgánico están poco estudiadas. Algunos estudios han demostrado que la urea ejerce un efecto represor sobre la entrada de NO_3^- , al tiempo que aumentaba la absorción de NH_4^+ en las plantas de *Arabidopsis*, interfiriendo también con los genes relacionados con la vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (*GS-GOGAT*) (Lupini, et al., 2017).

El transporte de alta afinidad de urea está mediado por el transportador específico de sustrato *DUR3*. Esta proteína se ha localizado principalmente en las raíces donde participa en la absorción de urea. *DUR3*, además, es capaz de recuperar la urea del apoplasto foliar y contribuye a una exportación más eficiente de amonio desde las hojas senescentes. En ausencia de esta función de removilización, los niveles de urea disminuyen a largo plazo. El transporte de urea de baja

afinidad está mediado por acuaporinas pertenecientes al tonoplasto (TIP) o por proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs) (Bohner, et al., 2015).

1.5 Deficiencia de nitrógeno en plantas: efectos a corto y largo plazo

El nitrógeno es el elemento mineral esencial que se encuentra en mayor concentración en la planta (Guardiola, 2022) y su disponibilidad regula el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante redes de señalización de dicha disponibilidad que puede tener efectos a corto y largo plazo. El efecto a corto plazo consiste en una respuesta primaria a los nitratos. Un elevado número de genes implicados en el transporte de nitratos (*NRT*) y su reducción (*NIA* y *NiR*), varían su expresión después de un breve periodo de exposición a una aportación de nitrato. De hecho, algunos de estos genes son inducidos en cuestión de pocos minutos. Los efectos a largo plazo están representados por la influencia del nitrato en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluidos efectos sobre la morfogénesis de las raíces, la floración de las plantas, la latencia de semillas, el cierre estomático, el ritmo circadiano y el transporte de auxina. Los efectos del nitrato sobre el desarrollo de las raíces están bien estudiados y ya se han identificado varios genes esenciales involucrados en este proceso (Zhao, et al., 2018).

Por todo lo anterior, una deficiencia en nitrógeno induce un gran número de cambios en el sistema vegetal, todos ellos perjudiciales (de Bang, et al., 2011). Una leve deficiencia de N es capaz de generar la elongación de la raíz primaria y de las raíces laterales, mientras que, de forma contraria, una deficiencia grave del mismo o una deficiencia prolongada inhibe el crecimiento general de la raíz. La elongación de la raíz lateral durante una deficiencia leve de nitrógeno depende en gran parte de la acción de las auxinas, como se ha demostrado en varios estudios. Durante una deficiencia grave o prolongada, *NTR1.1* se encarga de eliminar las auxinas de los primordios presentes en la raíz lateral inhibiendo de esta forma su crecimiento. (de Bang, et al., 2011 y Gruber et al., 2013). Por el contrario, altas concentraciones de nitrato reprimen el transporte de auxinas a zonas alejadas de los primordios radiculares, estimulando el crecimiento radicular. (de Bang, et al., 2011). Además de la auxina, otros responsables de la inhibición del crecimiento lateral radicular son los péptidos como *CLAVATA3 (CLV3)*, que se inducen a través de una vía de señalización dependiente de *CLAVATA1* (de Bang, et al., 2011).

El síntoma más fácilmente observable generado por una deficiencia de N son hojas cloróticas, denominadas así debido a que la clorosis se propaga uniformemente (clorosis general) a toda la hoja por la disminución del proceso de síntesis de clorofila o también por la descomposición de las proteínas de unión a la clorofila existentes en los fotosistemas (Hundson, et al., 2011). La asimilación de nitrógeno en el cloroplasto se encuentra acoplada a la biosíntesis de clorofila mediante la vía *GS/GOGAT*, el glutamato es el principal precursor de las clorofilas (Hundson, et al., 2011) Debido a esto, existe una fuerte correlación entre el contenido de clorofila de las plantas y su estado de N (Havé, et al., 2017 y de Bang, et al., 2021).

Todos los compuestos que contienen nitrógeno son capaces de desplazarse fácilmente por el floema, por ello las hojas más viejas actúan como la principal fuente de N durante situaciones de deficiencia en este compuesto. Suministran N a tejidos en desarrollo, como hojas, semillas y flores. Como consecuencia, todos estos síntomas serán visibles primeramente en las hojas más viejas. (de Bang, et al., 2011). Como se ha dicho anteriormente, otro efecto negativo de un nivel de N bajo es la floración temprana en comparación con la floración producida en condiciones de N altas, aunque una inanición de N prolongada puede hacer que la floración termine sucediendo en un tiempo comparable con el de altas concentraciones de N en *A.thaliana* (Ya-Ling et al., 2017).

1.6 Herramientas para la mejora de la NUE en tomate

Nuestro trabajo se ha desarrollado en el tomate, (*Solanum lycopersicum L.*), que es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial (Lupini, et al., 2017). Se produjeron más de 180 millones de toneladas de tomate para consumo y procesamiento en fresco (FAO). El fruto de la planta del tomate es un producto importante en la alimentación humana, siendo una fuente de flavonoides, compuestos fenólicos, vitaminas C y E, licopeno, caroteno, ácido fólico, ácido potásico y xantofilas. Sin embargo, la utilización de elevadas concentraciones de fertilizantes N (entre 250-300kg/ha) para conseguir el máximo rendimiento en sistemas de cultivo extensivo está ocasionando graves problemas en la actualidad (Zhao, et al., 2018).

La identificación de genotipos de tomate con variabilidad para la NUE, así como la posterior identificación de rasgos fisiológicos y moleculares contrastantes, puede utilizarse para desarrollar estrategias de mejora (Lupini, et al., 2017) que pueden tener un importante potencial en agricultura.

Un objetivo importante para poder implantar una agricultura sostenible es el poder descifrar las complejas redes reguladoras que subyacen a las respuestas al nitrógeno en las plantas, comprender los mecanismos moleculares y los procesos fisiológicos reguladores del metabolismo del nitrógeno (Figura 1.6).

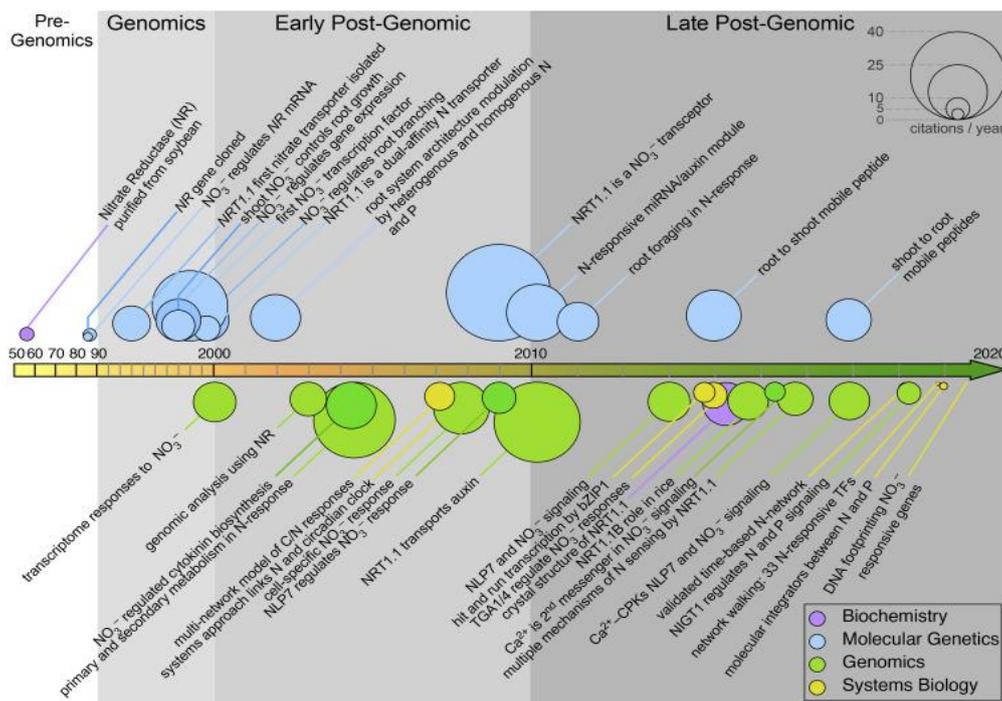


Figura 1.6. Línea del tiempo para los principales descubrimientos sobre nitratos en los últimos años. Representa una cronología de algunas de las publicaciones clave en la señalización de nitratos durante los últimos 70 años. Fuente: Vidal et al., 2020 *The Plant Cell*.

El enfoque ómico ha permitido investigar las interacciones entre redes complejas que participan en el metabolismo del N, entre ellas se encuentran los procesos de absorción, transporte y regulación de N, además del metabolismo de aminoácidos (Fukushima et al., 2014).

Además, el progreso de la metabolómica ha proporcionado información básica sobre las respuestas de las plantas a los cambios fisiológicos o ambientales desencadenados por el estado N (Fukushima, et al., 2014). Los datos ómicos masivos que describen componentes celulares

como metabolitos facilitan el estudio de las interacciones entre estos componentes (redes reguladoras transcripcionales, interacciones proteína-proteína y vías metabólicas). En el análisis de redes, los antecedentes teóricos de la estadística, los procedimientos para construir redes de asociación y los enfoques de inferencia de redes son importantes para la interpretación biológica de los conjuntos de datos ómicos (**Fukushima, et al., 2014**). Un ejemplo de estas herramientas son los análisis transcriptómicos que se han realizado para caracterizar las respuestas de expresión génica a la inanición de N o al suministro limitado de N en plantas modelo como *Arabidopsis* y en *Solanum tuberosum*. Cada uno de estos estudios reveló genes compartidos y expresados diferencialmente en respuesta a la falta de nitratos, participantes en procesos relacionados con el metabolismo del C y N, el transporte transmembrana y la fotosíntesis. Debe añadirse que se han detectado respuestas comunes en otros análisis de plantas de tomate en condiciones de inanición de otros macronutrientes como azufre y potasio (**Fukushima, et al., 2014**).

Debido a la gran relevancia económica del tomate, la identificación de genes que codifican para transportadores claves involucrados en la adaptación a un suministro subóptimo de N sería de gran interés para el desarrollo de nuevas variedades con una NUE mejorada (**Zhao, et al., 2018**). La secuenciación recientemente completada del genoma del tomate brinda ahora acceso a un mayor número de genes previamente identificados en especies modelo como *Arabidopsis* donde ya han sido identificados como importantes participantes en la absorción y asimilación de NO_3^- (**Abenavoli, et al., 2016**).

Hasta ahora, las diferencias en NUE para tomate se han relacionado con características morfológicas y con las diferencias en la expresión de los transportadores de nitrógeno como las familias de transportadores *NRT1*, *NRT2*, *AMT* y el transportador de urea (*SIDUR3*) (**Fu, et al., 2018**).

Sin embargo, solamente se han estudiado con mayor profundidad los genes *LeNRT1.1*, *LeNRT1.2*, *LeNRT2.1*, *LeNRT2.2* y *LeNRT2.3*. Se conoce que los cinco se expresan en raíces y son inducidos por nitrato, pero ninguno de ellos se ha estudiado funcionalmente (**Fu, et al., 2018**).

2. OBJETIVOS

En trabajos previos se identificaron en tomate los genes de los transportadores de nitrato *NPF1.17* y *NPF2.11* que variaban su expresión en respuesta al N. En el presente TFG se estudia la relación entre la expresión de estos genes con el crecimiento vegetativo empleando cultivares con NUE contrastante. Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio de la variación entre cultivares de parámetros relacionados con el crecimiento vegetativo (biomasa, contenido en clorofilas, eficiencia cuántica efectiva y máxima del fotosistema II) y de su respuesta a la deficiencia de N.
2. Análisis de la variación de la expresión de los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* en hojas entre genotipos y en respuesta a la limitación del aporte de N.
3. Estudio de las correlaciones entre los parámetros de crecimiento y la expresión de los genes *NPF1.17* y *NPF2.11*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y tratamientos

3.1.1 Cultivares

En este proyecto se estudiaron cuatro genotipos de la especie *Solanum lycopersicum L.* conocidos como tomate tipo cuarenteno (CV70), tipo cagón (CV32), pequeño de colgar (CV82) y el cultivar comercial Moneymaker (MM). El cultivar MM fue utilizado como control. En estudios previos con estos cultivares realizados en este laboratorio se demostró la existencia de diferencias significativas en la eficiencia de uso de nitrógeno (NUE).

En primer lugar, el cultivar CV32 (tomate tipo cagón) es el que presenta la reducción más elevada respecto a la NAE al someterse a un bajo aporte de nitrógeno. Presenta una NAE alta en aportes suficientes, pero esta desciende cuando se generan condiciones limitantes de este macronutriente esencial. Por otro lado, el cultivar CV82 (tomate pequeño de colgar), a pesar de que en concentraciones de nitrógeno normales presente valores de NAE reducidos, es el cultivar que se mantiene más estable con un descenso mínimo de NAE entre las dos condiciones. Por último, el cultivar MM (Moneymaker), utilizado como cultivar de referencia en el proyecto, representa los valores más elevados en NAE tanto en condiciones normales como limitantes de nitrógeno. Cabe destacar que el cultivar CV70 (tomate tipo cuarenteno) también presenta valores de NAE elevados para ambas condiciones presentando además una producción más elevada que para el resto de cultivares estudiados, siendo mayor incluso que para el cultivar MM. (Figura 3.1).

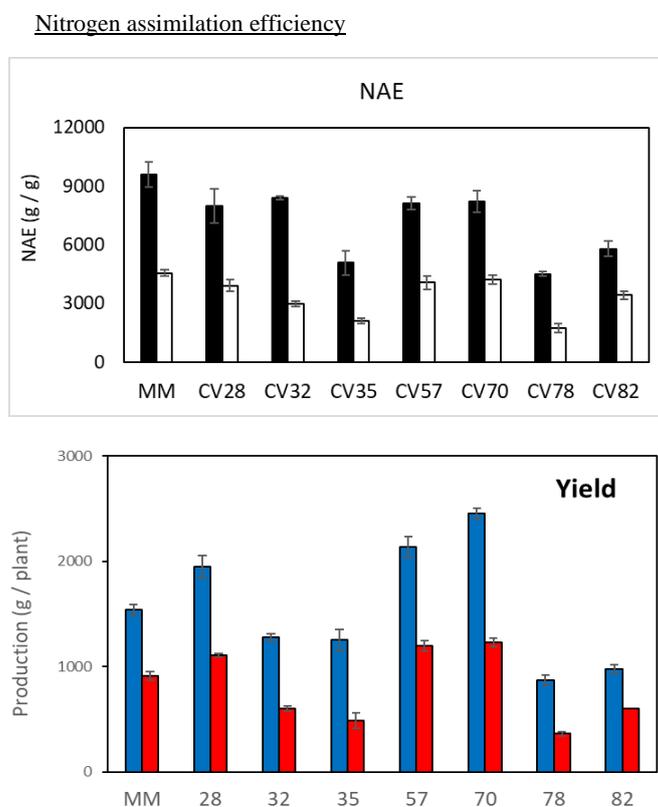


Figura 3.1 Producción y NAE en genotipos MM, CV28, CV32, CV35, CV57, CV70, CV78, CV82. Gráficas obtenidas de estudios realizados por este laboratorio aún no publicadas. Se realizaron siguiendo a Weih et al., 2005

3.1.2 Tratamientos

Las plantas se cultivaron en dos niveles de fertilización nitrogenada basados en la solución de Hoagland y Arnon (1950): solución completa con un aporte suficiente de nitrógeno de 8 mM (100N) y limitante, que aporta la mitad de nitrógeno que la completa, 4 mM N (50N) (**Tabla 3.1**). El resto de los componentes (macro y micronutrientes) se mantuvieron constantes variando las sales empleadas. Por un lado, una solución completa 100N se utilizó como medio control y el medio 50N se utilizó para poder observar las diferencias en la capacidad de los cultivares estudiados para resistir el déficit de nitrógeno.

Tabla 3.1: Composición de las soluciones nutritivas propuesta por Hoagland y Arnon, basada en las proporciones de macro y micronutrientes absorbidas por plantas de tomate en concentraciones 8mM (solución completa 100N) y 4mM (50N). Concentración de las soluciones stock de las sales utilizadas y mL usados por litro de solución nutritiva.

Macronutrientes	100N	50N
1M NH ₄ PO ₄	1mL	0.5mL
1M KNO ₃	6mL	3mL
1M Ca (NO ₃) ₂	4mL	2mL
1M MgSO ₄	2mL	2mL
1M KH ₂ PO ₄	0	0,5mL
0,5M K ₂ SO ₄	0	2mL
1M KCl	0	0,5mL
1M CaCl ₂	0	2mL
Micronutrientes	100N	50N
Fe	0,5mL	0,5mL
Micros	0,5mL	0,5mL

3.2 Genes estudiados

Se eligieron los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* para estudiar su expresión en la especie de tomate *Solanum lycopersicum* L. Se eligieron ambos genes para este proyecto ya que se ha demostrado en trabajos previos de este laboratorio que ambos tienen una elevada expresión en hoja de varios cultivares de *S. lycopersicum*.

Existe un gen homólogo a *NPF2.11* de tomate en *Arabidopsis* que codifica para un transportador específico de glucosinolatos dependiente de protones de alta afinidad crucial para el transporte de glucosinolatos derivados de metionina y triptófano a las semillas (**Wang Y, et al., 2018**). El gen *NPF1.17* no tiene homólogos en *Arabidopsis* (**Wang Y, et al., 2018**). Además, existen genes de la misma familia en *Arabidopsis* que participan en el transporte de nitratos, como es el caso de *NPF1.1* y *NPF1.2* los cuales transportan el nitrato por el xilema en condiciones suficientes de nitrógeno, y el caso del transportador *NPF2.13* que redistribuye el nitrato almacenado en hojas viejas hasta las hojas jóvenes para que continúen su desarrollo en condiciones de carencia de nitrógeno (**Wang Y, et al., 2018**).

3.3 Germinación de semillas

En primer lugar, se distribuyeron las semillas, previamente esterilizadas con lejía, en semilleros con fibra de coco en fecha de 27 de enero. Se colocó mediante pinzas una semilla por cuadrante de cada semillero. Los semilleros se recubrieron con film, se guardaron en la cámara de cultivo a 23/18°C 16/8 h luz/oscuridad y se regaron con agua hasta alcanzar la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas. El film se retiró tras la germinación para aclimatar las plántulas.

3.4 Crecimiento y desarrollo

Los semilleros se mantuvieron en cámara durante 3 semanas a una temperatura comprendida en el rango de 23°C-18°C en ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por día. El riego fue únicamente con 100mL de solución completa (100N) por plántula durante su desarrollo en semillero y se realizó dos veces por semana.

Las plantas se trasplantaron a macetas de 1L de capacidad en fecha de 23 de febrero, una vez que estas habían alcanzado el tamaño suficiente. Como sustrato para las macetas se utilizó fibra de coco. Se colocaron dos plantas por maceta habiendo en cámara una cantidad de 40 macetas con un total de 10 plantas para cada tratamiento y genotipo. Al día siguiente se aplicaron los tratamientos diferenciales tanto 100N como 50N. El riego se mantuvo dos días por semana y al mismo tiempo se anotaron las diferencias en el crecimiento de los genotipos en ambos tratamientos midiendo su altura con regla y observando cómo se adapta cada genotipo a la carencia de nitrógeno. Las medidas de altura se realizaron en fechas 24 de febrero y 4 de marzo.

El cultivo en cámara se prolongó durante tres semanas más, hasta registrar diferencias en el crecimiento entre tratamientos de las plantas del genotipo de referencia MM, momento en el que se procedió con el muestreo.

3.5 Medidas y análisis

3.5.1 Análisis de parámetros fotosintéticos: SPAD y fluorescencia

Para comprobar que existían diferencias entre genotipos y tratamientos, se analizaron los parámetros fotosintéticos de SPAD y fluorescencia.

Las medidas SPAD permiten determinar el índice relativo de clorofila en las hojas, lo que está estrechamente relacionado con el nivel de nitrógeno en la planta y por tanto con su estado nutricional. El contenido en clorofilas se estimó empleando un medidor SPAD502. En cada planta se midió en hoja joven (3-4ª hoja desde el ápice) y hoja vieja iniciando senescencia (3-4ª hoja desde la base del tallo). Las medidas SPAD (contenido en clorofila en hojas) se realizaron en fechas 4, 11 y 15 de marzo.

Por otro lado, la medida de la fluorescencia de la clorofila es una herramienta no destructiva, ampliamente utilizada en estudios que involucran respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés ambiental. Además, permite evaluar el estado fotosintético y detectar cambios fisiológicos y ambientales de las plantas. Es una técnica habitual en fisiología vegetal con diferentes ámbitos de aplicación, tales como la evaluación de parámetros de crecimiento y desarrollo, la detección de situaciones de estrés o respuestas de las plantas a los cambios ambientales (**Jiménez-Suancha, et al., 2015**).

Para poder comprobar si existe un estrés en condiciones de nitrógeno limitado (50N), se midió la eficiencia efectiva del PSII (PhiPSII) que explica el aprovechamiento de los electrones para la fotosíntesis, es decir, proporciona un valor estimado del flujo de transporte electrónico y fotosíntesis total. También se midió el rendimiento cuántico máximo (ratio F_v/F_m) conocido como el ratio entre la fluorescencia variable (F_v) o diferencia entre fluorescencia máxima (F_m) y fluorescencia mínima (F_o) (Maxwell, et al., 2000).

Antes de tomarse las medidas en oscuridad, se adaptaron las plantas a condiciones de oscuridad durante unos 15 minutos. En condiciones estresantes para la planta, como en este caso una deficiencia de un macronutriente esencial como es el nitrógeno aumenta la fluorescencia mínima (F_o) reduciéndose la fluorescencia variable (F_v), y de esta forma el ratio F_v/F_m que refleja una bajada del rendimiento cuántico del fotosistema II. La fluorescencia mínima (F_o) se midió tras haberse adaptado la planta a oscuridad mientras que la fluorescencia máxima (F_m) se midió una vez se emitió sobre la hoja un haz intenso de luz. Este estímulo luminoso hace que el número de centros activos disponibles se reduzcan incrementándose el rendimiento de fluorescencia de las clorofilas. Este proceso se conoce como 'quenching' y es producido por el desvío del flujo de electrones consecuencia de la apertura de estomas como consecuencia a la aplicación de luz. (Maxwell, et al., 2000).

Las medidas de fluorescencia se tomaron tanto en luz como en oscuridad en fechas 11 y 15 de marzo. La fluorescencia en oscuridad se determinó empleando un medidor de fluorescencia de clorofilas MINIPAM (Walz, Alemania) y para medir la fluorescencia en luz se utilizó LI-6400 (LI-Cor, Licon USA). Ambas medidas, tanto fluorescencia como SPAD, se consideran medidas rápidas no destructivas que informan de los cambios producidos a nivel de hoja.

3.5.2 Muestreo y medidas de biomasa

Una vez comprobado mediante estas medidas que existían ciertas diferencias por genotipo y tratamiento se realizó el muestreo en fecha de 16 de marzo tras 21 días de fertilización diferencial. Se hicieron medidas de peso en fresco de biomasa de las plantas y se recolectaron hojas jóvenes de cada genotipo para ambos tratamientos. De cada tratamiento y genotipo se muestrearon 3 réplicas provenientes de 3 plantas diferentes cada una, se trituraron con nitrógeno líquido y se guardaron en congeladores a -80°C .

3.5.3. Extracción RNA

Se extrajo el RNA necesario para los análisis de expresión RT-qPCR y el resto de las pruebas mediante el kit Total RNA Mini Kit (TAKARA). Las extracciones se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor. Se pesaron 300mg del material vegetal ya triturado para cada réplica y se colocaron en eppendorfs rotulados de 2mL. Las extracciones se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor.

Una vez extraído se cuantificó el RNA y se analizó su concentración, así como su calidad mediante los ratios 260/280 y 260/230 mediante el Nanodrop Epoch (Biotek, EEUU).

La absorbancia se mide a 260 nm (A260), donde los ácidos nucleicos absorben la luz con mayor intensidad. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La relación 260/280 refleja la pureza del RNA. Debe estar entre 1,8 y 2,1, si la relación es inferior, podría indicar la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben a 280 nm. La relación 260/230 se utiliza como una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos. Los valores de 260/230 deben estar en el intervalo de 2,0-2,2, si la relación es inferior a la esperada, podría indicar la presencia de contaminantes que absorban a 230 nm (Thermo Fisher Scientific).

3.5.4 Análisis mediante RT-qPCR

La RT-qPCR se puede realizar en un ensayo de un paso o de dos pasos. Los ensayos de un solo paso combinan la transcripción inversa y la PCR en un solo tubo, utilizando una transcriptasa inversa junto con una DNA polimerasa. En los ensayos de dos pasos, los pasos de transcripción inversa y PCR se realizan en tubos separados, con diferentes tampones, condiciones de reacción y cebadores (**Thermo Fisher Scientific**). En el caso de este trabajo, se utilizó un ensayo en dos pasos.

3.5.4.1 Retrotranscripción

Una vez extraído el RNA este debió ser transformado a cDNA. La reacción consiste en la síntesis de cDNA a partir del RNA molde de la muestra, mediante la amplificación realizada por el enzima retrotranscriptasa PrimeScript, los hexámeros aleatorios de DNA y los cebadores OligodT. La transcripción reversa se llevó a cabo mediante el kit PrimeScript RT reagent Kit de (TAKARA).

Tabla 3.2 *Mix de reactivos para la retrotranscripción.*

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

Tabla 3.3 *Temperaturas de incubación para la reacción de retrotranscripción.*

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

En primer lugar, con el objetivo de obtener cDNA suficiente para las pruebas concentración de los primers para la qPCR, así como para la PCR cuantitativa (qPCR) de ambos transportadores, se escaló el volumen de la reacción a un volumen final de 15 μ l por reacción, volumen que permitió transcribir un total de 1,5 μ g de RNA por muestra.

3.5.4.2 Análisis de expresión: qPCR

Para analizar la expresión de los genes estudiados se utilizó el cDNA extraído de las veinticuatro muestras procedentes de las tres réplicas biológicas por genotipo, con un total de cuatro genotipos (MM, CV32, CV70 y CV82), y por tratamiento, suficiente (100N) o limitante (50N) en el aporte de nitrógeno. Se realizaron dos réplicas técnicas por réplica biológica y se utilizaron un total de 48 pocillos de la placa. La reacción de amplificación tuvo lugar en un termociclador tal CFX Connect System (Biorad, España).

Una vez conseguido el cDNA, antes de continuar con el segundo paso de la RT-qPCR, se realizó una prueba de concentración para los cebadores específicos de los genes estudiados, *NPF1.17* y *NPF2.11*. Se realizó una prueba de concentración de uso a 300 y a 400 nM en la que se probaron las dos concentraciones de estudio para cada pareja de cebadores con tres réplicas técnicas por

pareja y concentración. La concentración de 300 nM resultó ser la óptima para el análisis de expresión posterior.

La RT-qPCR. se realizó en placa específica para qPCR con 96 pocillos. Solamente se utilizaron 12 pocillos. El volumen final para la amplificación fue de 10 μ L. 4 μ L de cebadores y agua, 5 μ L del mix SYBR Green y 1 μ L de cDNA de las 24 muestras correspondientes. El mix SYBR Green contuvo los dNTPs y la polimerasa (necesarios para la amplificación) y el fluoróforo SYBR (se encarga de la detección). En cada pocillo de la placa se introdujo 1 μ L de cDNA de cada muestra. A continuación, se añadió 9 μ L del mix preparado haciendo un total de 10 μ L por pocillo. La reacción de amplificación se completó en un espectrofotómetro tal CFX Connect Real-Time System (Biorad, España).

Tabla 3.4. Protocolo de la RT-qPCR

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

Los resultados se evaluaron en función del número de ciclos umbral (Ct) obtenidos con cada concentración de uso, siendo este el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar la fase exponencial de la curva de amplificación.

3.6 Análisis estadístico

El análisis de las comparaciones entre tratamientos, genotipos y genes estudiados se realizó utilizando el programa Statgraphics Centurion XIX. Los datos registrados de los parámetros de crecimiento vegetativo y los datos de expresión de los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* se emplearon en un análisis de la varianza (ANOVA) para analizar las diferencias en las respuestas a la disminución en el aporte de nitrógeno de los cultivares de estudio. Se utilizó las funciones de Anova simple y Anova multifactorial para encontrar diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los diferentes cultivares, los tratamientos y los genes.

Además, para visualizar mejor estas diferencias se hizo un análisis de componentes principales (PCA) para determinar aquellos parámetros de los estudiados que explican un mayor porcentaje de la variabilidad observada representándose mediante gráficos de dispersión. Se trabajó con los ratios en tanto por ciento de los parámetros medidos en los dos niveles de fertilización nitrogenada. También se hizo uso del estudio de correlaciones entre parámetros y genes, donde se muestran aquellas las relaciones estadísticamente significativas, la fuerza de dicha relación y su representación en el gráfico de correlaciones.

4. RESULTADOS

En este proyecto, se estudiaron los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* los que pueden estar relacionados con el transporte de nitratos en cultivares de *Solanum lycopersicum L.* diferenciales para su eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE). Para determinar si la expresión de estos genes puede explicar estas diferencias de la NUE para los cultivares, se realizaron una serie de medidas del crecimiento vegetativo y análisis de expresión. Se tomaron medidas de biomasa, altura y parámetros fotosintéticos (SPAD, rendimiento cuántico máximo F_v/F_m y eficiencia efectiva del fotosistema II PhiPSII). Los experimentos se realizaron en cámara con plantas sometidas a dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro limitante (50N). Para concluir el trabajo se realizaron análisis de expresión de los genes estudiados mediante RT-qPCR.

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

La disponibilidad de compuestos de N define de forma significativa la biomasa desarrollada por las plantas. Para determinar el efecto de la limitación en el aporte de N sobre la acumulación de biomasa, se cuantificó la biomasa total de los diferentes cultivares, en ambos tratamientos.

En la **Figura 4.1** se representa una pronunciada reducción ($P < 0.01$) de la biomasa para todos los cultivares, en condiciones de aporte limitante de nitrógeno (50N). Asimismo, existen diferencias genotípicas, tanto en condiciones óptimas como limitantes, y no existe interacción entre genotipo y tratamiento. El cultivar MM presentó la mayor biomasa en el tratamiento 50N junto con el cultivar CV82. En tratamiento 100N es de nuevo el cultivar MM el que presenta una mayor biomasa. Cabe destacar que ninguno de los cultivares ha mantenido su biomasa en condiciones de carencia de nitrógeno. Además, se puede observar que el genotipo 70 es aquel que menor peso en fresco muestra, tanto en el tratamiento de fertilización con nitrógeno completo, como en el de limitado.

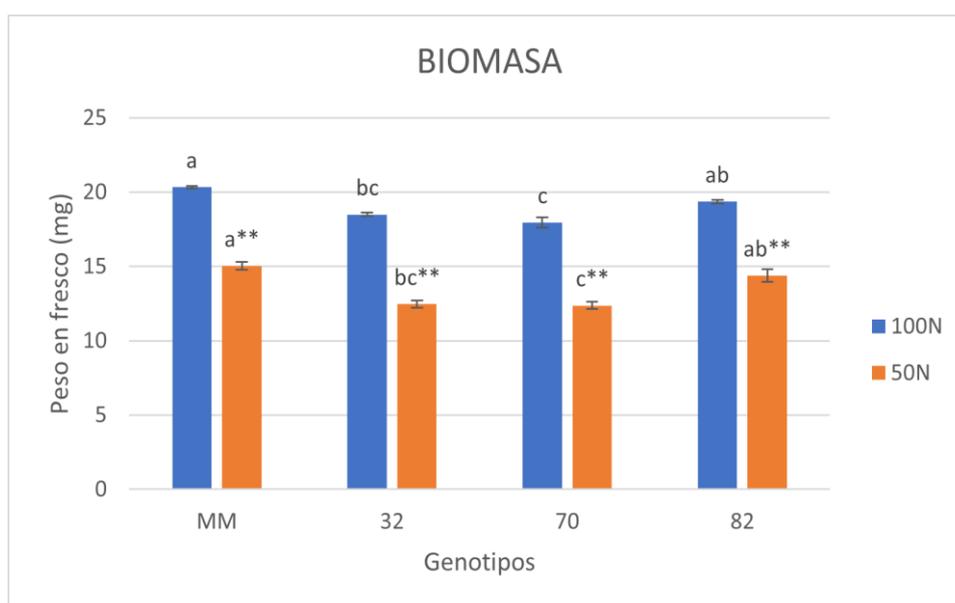


Figura 4.1 Medida de biomasa de cuatro genotipos de *Solanum lycopersicum L* en fase de desarrollo vegetativo para dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N) durante el muestreo realizado con fecha de 16 de marzo. Las letras denotan las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) entre un mismo genotipo en tratamientos distintos.

En la Figura 4.2 se observa que si bien existe variación en la altura de la planta entre cultivares para ambas condiciones de cultivo, se da un efecto de interacción. Es de destacar la diferente respuesta entre los genotipos al tratamiento. Algunos de los genotipos muestran reducciones significativas de su altura al ser tratados con fertilización nitrogenada limitante. Los cultivares CV32 y CV82 presentan un descenso de altura para el tratamiento 50N ($P < 0,05$). El cultivar CV32 presenta la bajada más pronunciada ($P < 0,01$). Sin embargo, es el genotipo de mayor altura en el tratamiento con suficiente concentración de nitrógeno 100N, seguido por el genotipo 82. Los cultivares tanto MM como CV70 mantienen su altura entre tratamientos 100N y 50N. El cultivar MM, utilizado como referencia, es el que tiene una mayor altura en estas condiciones de carencia de nitrógeno.

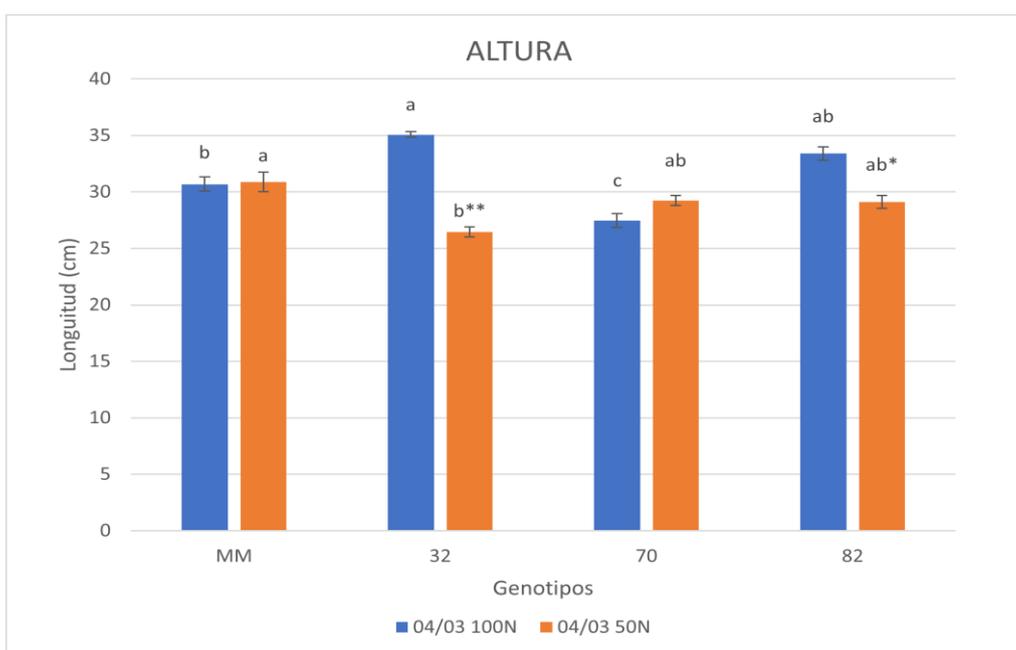


Figura 4.2: Altura medida en cuatro cultivares de *Solanum lycopersicum* L. en desarrollo vegetativo tras 14 días de fertilización nitrogenada diferencial con dos niveles de nitrógeno, aporte suficiente de nitrógeno (100N) y aporte limitante (50N) en fecha 4 de marzo de 2022 dada en cm. Las letras denotan las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) entre un mismo genotipo en tratamientos distintos.

Se observaron diferencias claras en el nivel de clorofila estimada por SPAD entre los genotipos estudiados, y para ambos tratamientos, como se muestra en la **figura 4.3**. Los genotipos MM y 32 presentan un mayor contenido en clorofilas en 100N, y son los únicos que muestran una disminución de su nivel de clorofila ($P < 0.05$) en condiciones de déficit de nitrógeno.

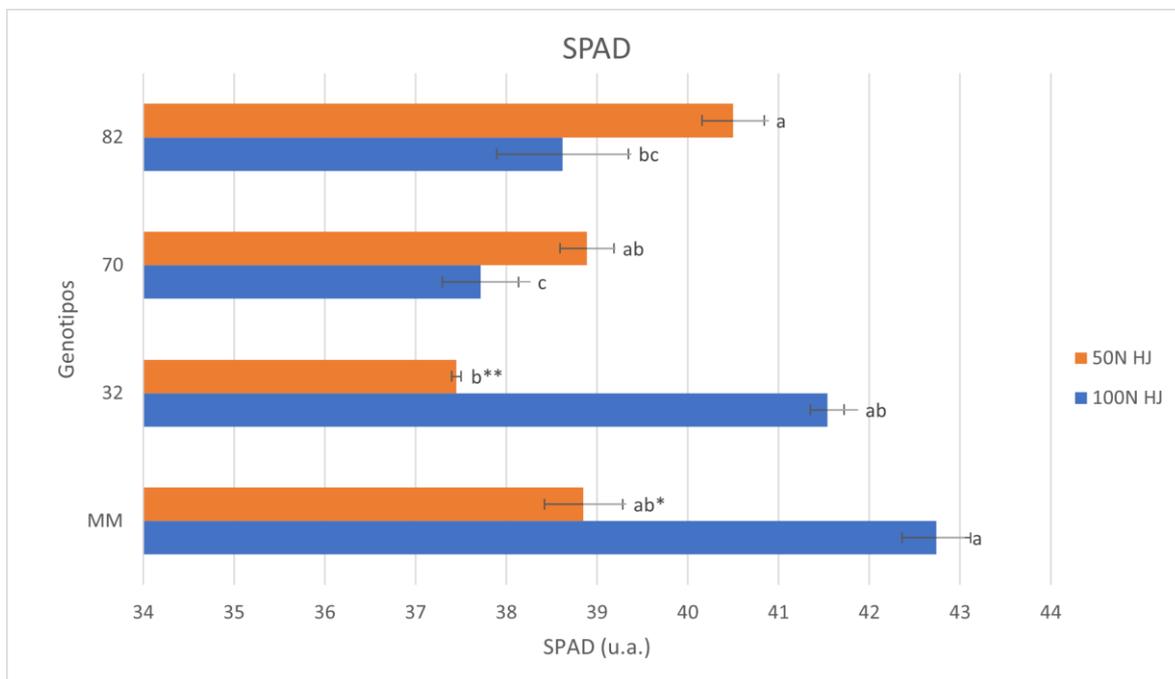


Figura 4.3: Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la fotosíntesis en hojas jóvenes de plantas en fase de desarrollo vegetativo. Medida de SPAD, cantidad de clorofila, en hoja joven de cuatro genotipos de *Solanum lycopersicum* L en dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno de aporte completo de nitrógeno (100N y otro de aporte limitante de nitrógeno (50N) en fecha de 15 de marzo de 2022. Las letras denotan las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) entre un mismo genotipo en tratamientos distintos.

La eficiencia efectiva del PSII (PhiPS2) no difiere entre genotipos en condiciones de suministro suficiente de N (**Figura 4.4**). La disminución del aporte de N sólo tuvo efecto en el cultivar MM, y en estas condiciones, difiere significativamente de los demás. Tampoco se observaron diferencias en el rendimiento cuántico máximo entre cultivares, con valores cercanos a 0.82 (**Figura 4.4**). El déficit de N provocó un descenso de F_v/F_m en los cultivares 70 y 82, sugiriendo eventos de fotoinhibición.

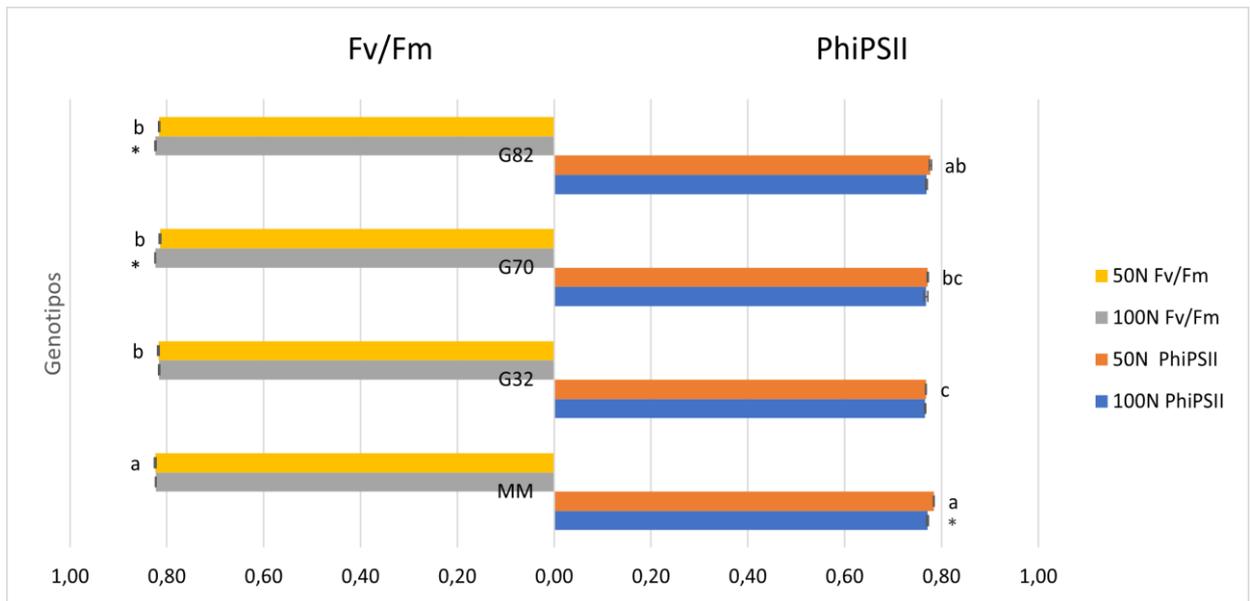


Figura 4.4: Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la fotosíntesis en hojas jóvenes de plantas en fase de desarrollo vegetativo. Medida del rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y eficiencia efectiva del fotosistema II (PSII), medidos en condiciones de oscuridad y en luz respectivamente, para cuatro genotipos de *Solanum lycopersicum* L en dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N) en fecha de 15 de marzo de 2022. Las letras denotan las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) entre un mismo genotipo en tratamientos distintos.

4.2 Variación entre cultivares en la expresión de los genes NPF1.17 y NPF2.11 en respuesta al déficit de nitrógeno.

La expresión del gen *NPF1.17* difiere entre cultivares y tratamientos (**Figura 4.5**). Los dos cultivares MM y 70, seleccionados previamente como de alta NUE, mostraron una mayor expresión en el transportador *NPF1.17* ($P < 0.05$). El déficit de nitrógeno, sin embargo, disminuyó su expresión, desapareciendo las diferencias con los cultivares 32 y 82 (**Figura 4.5**). En estos cultivares no se observó diferencia de expresión debida al nivel de N.

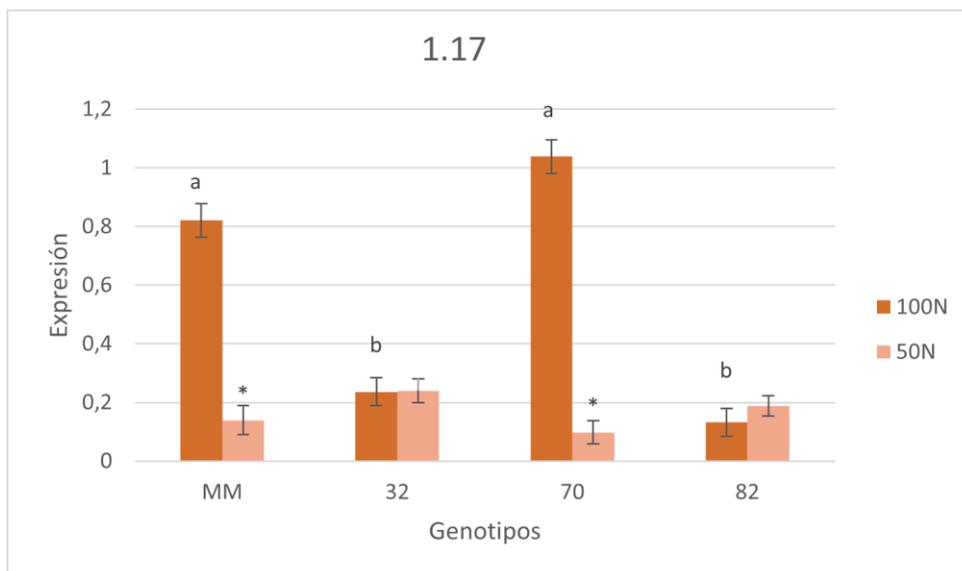


Figura 4.5. Datos de expresión del gen *NPF1.17* en los cultivares estudiados MM, CV32, CV70, CV82 en hojas jóvenes para dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N). Las letras denotan las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) entre un mismo genotipo en tratamientos distintos.

En el caso de la expresión del gen *NPF2.11* (Figura 4.6), el cultivar 82 muestra una expresión muy inferior al resto en condiciones de fertilización óptima. Sin embargo, esta expresión no varía en condiciones de déficit de N. Los demás cultivares (MM, 32 y 70) sí que mostraron una disminución significativa de la expresión de *NPF2.11* con el déficit de N, siendo MM el que presenta una mayor expresión en estas condiciones.

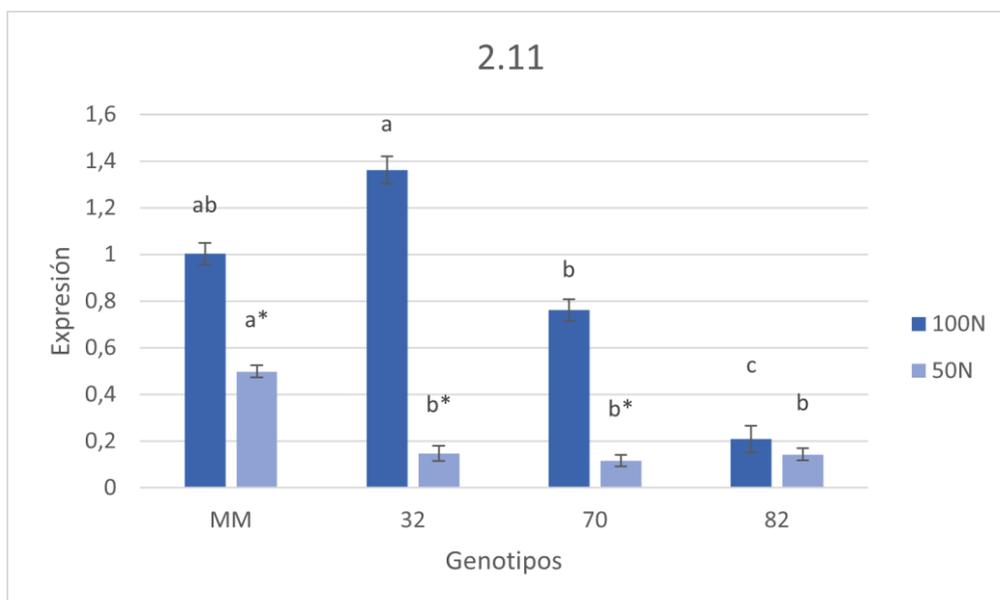


Figura 4.6. Datos de expresión del gen *NPF2.11* en los cultivares estudiados MM, CV32, CV70, CV82 en hojas jóvenes para dos tratamientos de fertilización nitrogenada, uno con aporte completo de nitrógeno (100N) y otro con aporte limitante (50N). Las letras denotan las diferencias significativas entre los distintos genotipos bajo el mismo tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) entre un mismo genotipo en tratamientos distintos.

4.3 Análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó un estudio de componentes principales (PCA) cuyo propósito fue obtener un número reducido de combinaciones lineales de las variables estudiadas que expliquen la mayor variabilidad posible, y observar la dispersión de los distintos datos en función de los valores de esas componentes.

El análisis se realizó a partir de los valores medidos de los diferentes parámetros estudiados relacionados con el crecimiento vegetativo (altura, SPAD, eficiencia efectiva del PSII, rendimiento cuántico máximo y biomasa), así como con la expresión de los genes analizados (*NPF1.17* y *NPF2.11*), para los cuatro cultivares de tomate estudiados. Se analizó la variación en dichos parámetros al disminuir el aporte de nitrógeno, utilizando como variables el ratio entre 50N y 100N en porcentaje ($\frac{50N}{100N}$ %). El análisis permitió agrupar las réplicas de los genotipos en el espacio determinado por las componentes principales.

El análisis obtuvo dos componentes principales con eigenvalores mayores o iguales a 1, que explican un 63,8 % de la variabilidad observada (39,4% la primera componente y 24,4% la segunda).

La composición de las componentes viene determinada por los valores de los pesos de las variables estudiadas, que se muestran en la (tabla 4.1) así como en el gráfico de pesos (Figura 4.7). La distribución de las diferentes plantas de los 4 genotipos distintos, entorno a estas componentes se representa en el diagrama de dispersión. (Figura 4.8)

La componente 1 presenta una correlación positiva alrededor de 0,5 con la variación en biomasa, eficiencia efectiva del PSII, y la expresión del gen *NPF2.11*. Asimismo, muestra una correlación positiva, aunque algo menor, con la variación en el SPAD.

La componente 2 presenta una correlación positiva elevada con la variación en el rendimiento cuántico máximo, y negativa la expresión del gen *NPF1.17*. (Tabla 4.1 y figura 4.7).

Tabla 4.1. Tabla de Pesos de los Componentes. Variables: Altura, SPAD (cantidad de clorofila), Biomasa (peso en fresco), Fv/Fm (rendimiento cuántico máximo), Φ PSII (eficiencia efectiva del PSII), 2.11 (*NPF2.11*), 1.17 (*NPF1.17*).

	Componente 1	Componente 2
Altura	0,29611	0,431299
SPAD	0,396873	-0,304728
Biomasa	0,526097	-0,0958369
FV/Fm	0,00525623	0,672152
PhiPSII	0,488067	0,0870748
Expresión relativa de <i>NPF2.11</i>	0,487402	0,0436804
Expresión relativa de <i>NPF1.17</i>	0,0472881	-0,500658

Gráfica de Pesos del Componente

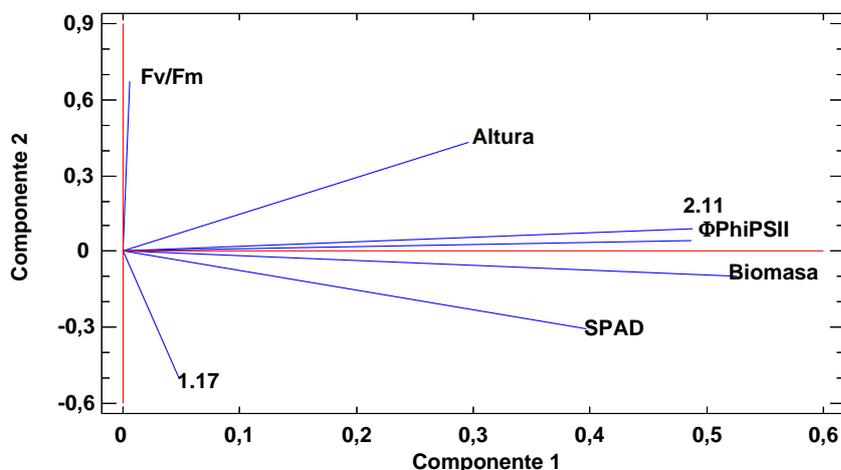


Figura 4.7 Pesos de las componentes. Representación en 2D de la tabla de pesos de las siete variables estudiadas para las dos componentes.

En el gráfico de dispersión se representa la distribución de las réplicas de los diferentes cultivares estudiados (Figura 4.8). Las réplicas de los diferentes genotipos se encuentran agrupadas en el diagrama de dispersión. Teniendo en cuenta esta representación y las correlaciones indicadas de las componentes principales para los diferentes caracteres podemos concluir que el genotipo 82 es aquel que presenta un menor descenso de la biomasa total, PhiPS2, SPAD y expresión de *NPF2.11*. El cultivar MM tienen un comportamiento similar, aunque el descenso es algo mayor. Ambos cultivares se diferencian en su respuesta sobre la altura, F_v/F_m y expresión del gen *NPF1.17*. El cultivar MM se ve menos afectado en altura y F_v/F_m , pero reduce su expresión de *NPF1.17*. El cultivar 82 muestra un comportamiento opuesto para estas últimas variables. El cultivar 32 muestra un mayor descenso de biomasa, SPAD, PhiPS2 y expresión de *NPF2.11*, caracteres relacionados con la componente 1. Sin embargo, presenta mayor variación en los parámetros relacionados con la componente 2 (Figura 4.8). Para el cultivar 70 no se da una agrupación de las distintas réplicas para ninguna de las dos componentes.

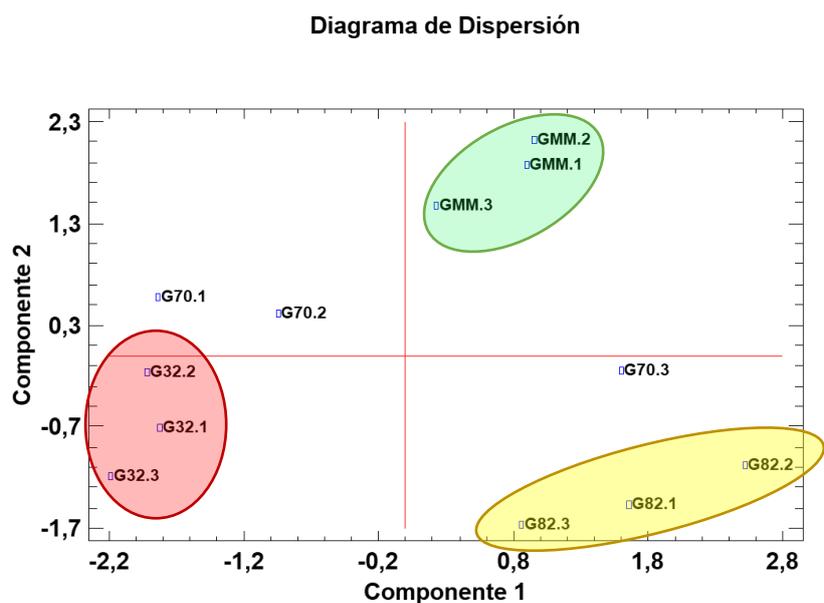


Figura 4.8 Diagrama de Dispersión. Distribución de las tres réplicas de los genotipos estudiados en cada componente.

Se llevó a cabo un análisis para determinar las correlaciones que se establecen entre las siete variables estudiadas (**Figura 4.9**). Tienen especial interés aquellas correlaciones entre caracteres vegetativos y la expresión relativa de los genes estudiados. Cabe destacar la correlación existente entre la biomasa y la expresión de los genes *NPF2.11* y *NPF1.17*, cuya relación lineal se muestra en las **Figuras 4.10** y **4.11**.

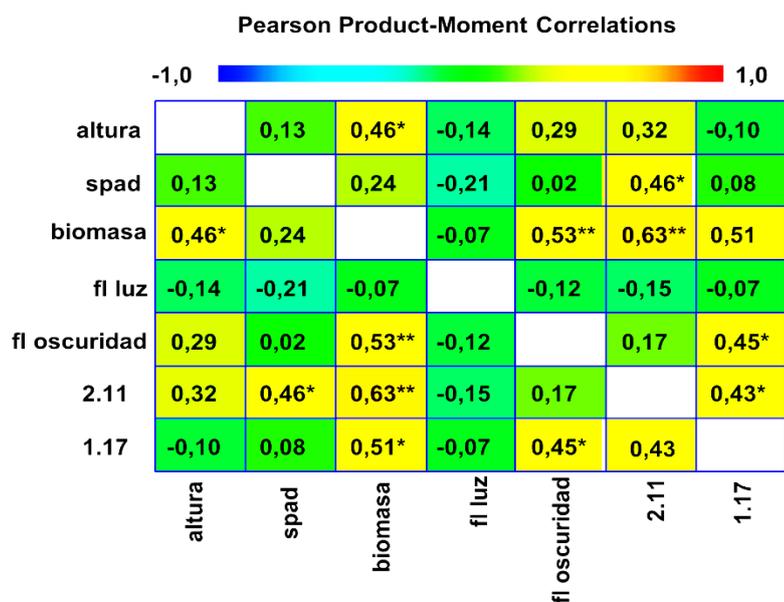


Figura 4.9 Relaciones lineales entre las variables en un rango de colores. El rango va de -1 a 1, mostrándose los valores elevados en colores cálidos y los valores bajos en colores fríos. Los asteriscos indican las diferencias significativas con un asterisco ($P < 0.05$) y muy significativas con dos asteriscos ($P < 0.01$).

En la **Figura 4.10** se puede observar los valores de los cuatro genotipos estudiados (MM, CV32, CV70 y CV82) en los dos tratamientos de fertilización nitrogenada (100N y 50N) en función de su biomasa y expresión del transportador *NPF2.11*. En la figura se observa como la correlación existente es de naturaleza ambiental y debida fundamentalmente a las diferencias entre tratamientos en el aporte de N. Hay que señalar, sin embargo, la falta de variación en la expresión génica con el aporte de N en el genotipo 82.

De manera similar, la correlación entre biomasa y la expresión del gen *NPF1.17* es también debida a las diferencias existentes entre tratamientos (**Figura 4.11**). Esta correlación es más baja dada la escasa variación en la expresión en respuesta al aporte de N en los genotipos 82 y 32.

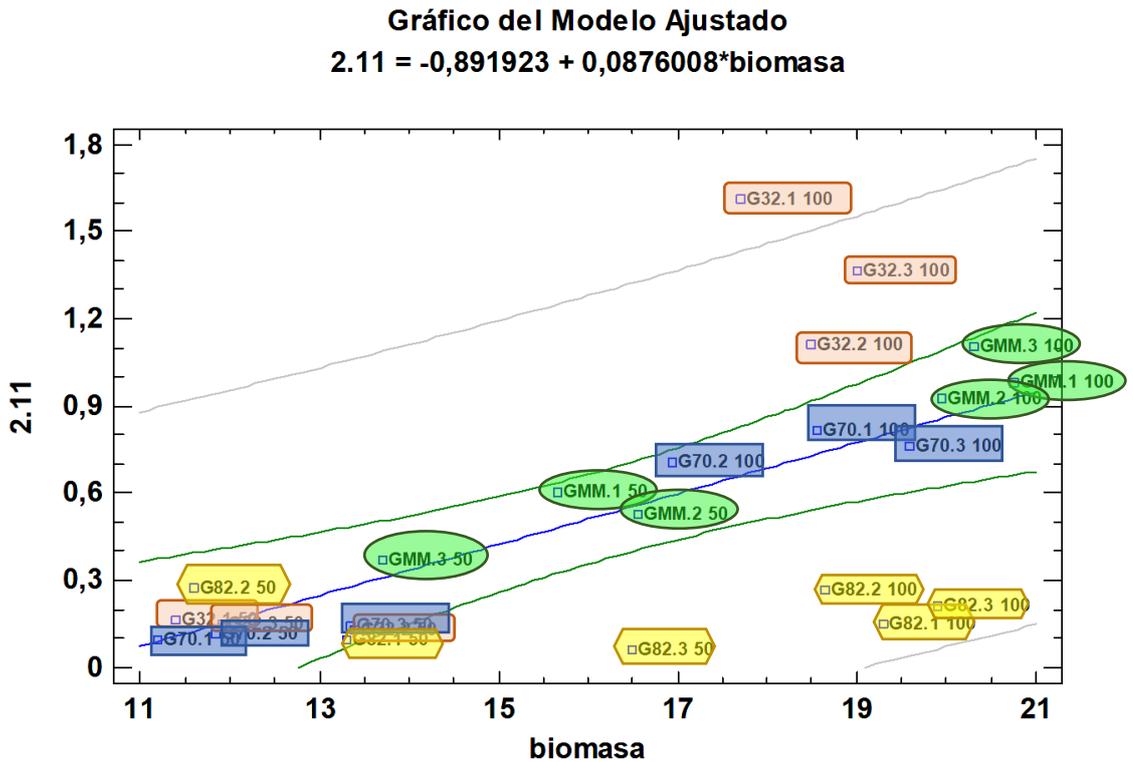


Figura 4.10. Modelo ajustado de la regresión simple para la correlación entre biomasa y la expresión del gen *NPF2.11*. $r = 0,632^{**}$

Gráfico del Modelo Ajustado
 $1.17 = -0,542898 + 0,0557312 \cdot \text{biomasa}$

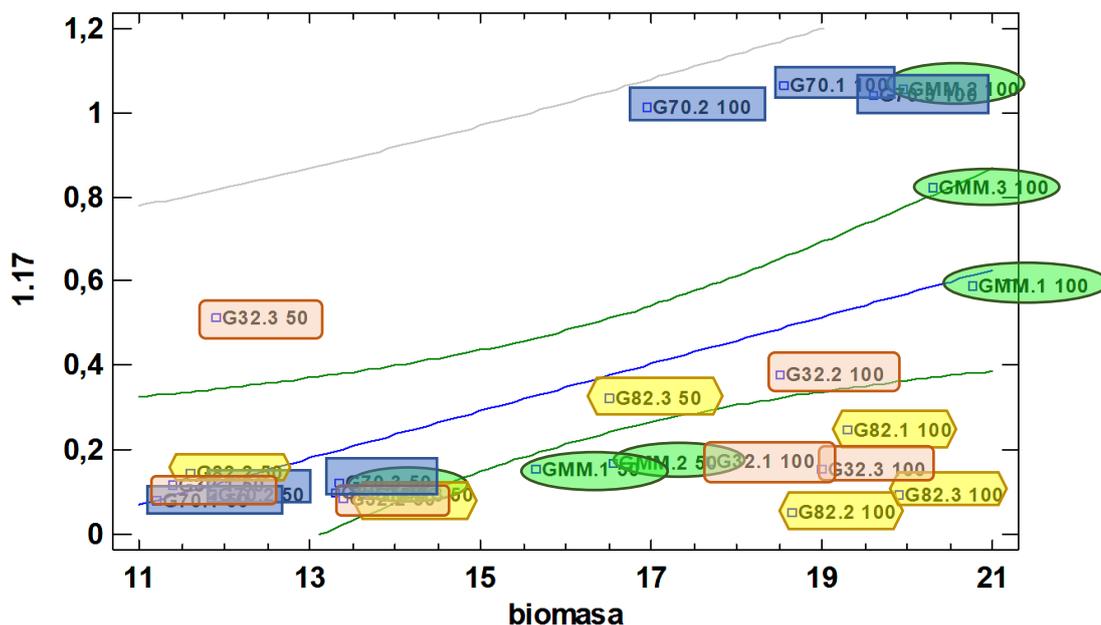


Figura 4.11. Muestra la representación del modelo ajustado de la regresión simple para la correlación entre biomasa y la expresión del gen NPF1.17 $r = 0,51^*$

5. DISCUSIÓN

5.1 Diferencias en el desarrollo vegetativo de los cultivares en suministro subóptimo de nitrógeno y su relación con la NUE.

Las plantas de cultivo, incluidas las hortalizas como el tomate, se han obtenido mediante selección y están adaptadas a entornos no estresantes, donde se puede explotar mejor el potencial de rendimiento. Sin embargo, bajo un suministro menor de fertilizantes, el mantenimiento de tales condiciones favorables puede volverse económicamente inviable y se producen pérdidas severas de rendimiento (Roselló et al., 2012).

No obstante, en los últimos años, ha crecido el interés por las prácticas agrícolas sostenibles con el objetivo de reducir los costes de producción, así como los daños ambientales generados por el excesivo uso de fertilizantes minerales. Entre los nutrientes suministrados a los cultivos, el nitrógeno (N) se considera uno de los factores más limitantes, por su efecto sobre la producción (Möller et al., 2008).

En los sistemas de cultivo intensivo de tomate, se emplean enormes cantidades de fertilizantes nitrogenados (por encima de 200-300 kg/ha) (Zotarelli et al., 2009). Debido a la baja eficiencia en el uso del nitrógeno de las variedades cultivadas, se ha estimado que sólo un 50% del N aportado es absorbido por las plantas, generando una pérdida de N al medio ambiente que provoca contaminación. Este nitrógeno puede contaminar aguas subterráneas, provocar eutrofización de

acuíferos y generar gases de efecto invernadero (Morales et al., 2019). El aporte óptimo de nitrógeno para el tomate ha sido establecido entre los 100 y 200 Kg N/ha (Tei et al., 2002).

En este contexto, el desarrollo de cultivares que presentan una elevada eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) podría ser de gran interés. Sin embargo, existe poca información acerca de la capacidad de respuesta que presentan las distintas variedades de tomate para afrontar una posible reducción del nitrógeno en el medio. En estudios anteriores, se ha relacionado las diferencias en NUE entre varios cultivares de tomate con diferencias en su morfología radicular y con diferencias en expresión de transportadores relacionados con la captación y distribución del nitrógeno en la planta (Abenavoli et al., 2016). El trabajo de Abenavoli et al. (2016) señala que las plantas con distintas NUE pueden particionar de forma distinta el N absorbido a sus órganos vegetativos, según la disponibilidad de nitrógeno.

En este trabajo, se estudió la respuesta a baja concentración de nitrógeno de cuatro cultivares, que habían mostrado diferencias en cuanto a la producción de fruto y en la NUE y sus diferentes componentes, en condiciones de cultivo en cámara con tratamiento diferencial de nitrógeno (100N y 50N). Se realizaron determinaciones de parámetros fisiológicos como la altura de la planta, parámetros fotosintéticos como SPAD y derivados de la fluorescencia de las clorofilas, así como la biomasa total. Los resultados de los parámetros de crecimiento vegetativo obtenidos para los cuatro cultivares confirmaron una reducción de estos parámetros por efecto de la deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, los efectos variaron entre cultivares.

Se pudo observar que la deficiencia de N afecta en menor medida a los parámetros de crecimiento en los genotipos MM y 82. El cultivar con mayor NUE, la variedad comercial MM, presentó una biomasa más elevada que el resto de cultivares en los dos tratamientos de fertilización. Sin embargo, el cultivar 82, seleccionado como de baja NUE, presentó valores de biomasa, SPAD y eficiencia efectiva del PSII en aporte limitante de nitrógeno, superiores al cultivar 70, seleccionado como de alta NUE. También es importante destacar que el cultivar 32, de baja NUE en producción, muestra valores elevados en muchos de los parámetros con tratamiento 100N, que se podría relacionar con la elevada capacidad de absorción de nitrógeno que presenta este cultivar. Estos resultados apuntan a que la producción de biomasa durante el desarrollo vegetativo no está correlaciona con la producción de fruto ni con la NUE de las plantas en el estado reproductivo.

Además, la producción de biomasa en el estado vegetativo también puede relacionarse con los valores de eficiencia efectiva del PSII (Φ PSII) y el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m). Se ha demostrado que en plantas C3, como el tomate, la limitación del aporte de nitrógeno genera una reducción en estos dos parámetros fotosintéticos, principalmente por la pérdida de las clorofilas y de la actividad de la Rubisco, aunque esta correlación es variable y se ve afectada por efectos ambientales tales como la radiación y la temperatura (Correia et al., 2005). En relación con el nivel de clorofila, solamente redujeron su valor de SPAD los cultivares 32 y MM. Sin embargo, los resultados obtenidos para los parámetros fotosintéticos estudiados sugieren la existencia de otros factores que afectan a la actividad del PSII en condiciones de déficit de N. Esto se pudo observar en el cultivar MM, el cual vio aumentada la tasa de transporte electrónico en déficit de N, pero redujo su contenido en clorofila. Además, los cultivares 70 y 82, los cuales redujeron sus valores de F_v/F_m , sugiriendo eventos de fotoinhibición, no mostraron un descenso en su contenido en clorofila. Cabe destacar, la elevada correlación de F_v/F_m con la biomasa de las plantas, por lo que se ha mostrado como un marcador del efecto de la limitación en el aporte de N en tomate.

Para conseguir saber más acerca de la relación entre la variabilidad en la respuesta de estos cuatro cultivares a condiciones limitantes de N y su eficiencia en el uso de N (NUE) sería recomendable realizar estudios de producción de fruto para estos cultivares. La producción de cada cultivar podría estar implicado en el desarrollo de las diferencias mostradas en NUE.

5.2 Relaciones entre la expresión de los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* y los parámetros estudiados.

Cabe destacar que la producción de biomasa se ha correlacionado con la expresión de los transportadores *NPF1.17* y *NPF2.11*. La expresión del gen *NPF2.11* presenta una correlación positiva con la biomasa en tres de los genotipos de tomate estudiados. Sin embargo, no se tiene información sobre la función de este gen en tomate. En *Arabidopsis*, el gen *NPF2.11*, así como *NPF2.10*, funcionan como transportadores de alta afinidad de glucosinatos. Participan en la carga de glucosinatos en el floema y en el transporte bidireccional a larga distancia de estos (Wang Y. et al., 2018). En algunos estudios realizados en otras especies, como es el caso de *Brassica napus*, genes de la familia *NPF2* funcionan también como transportadores de GLS. (Wen et al., 2020). No obstante, en otros trabajos se ha mostrado que genes de la misma familia en *Arabidopsis*, como *NPF2.12* pueden funcionar como transportadores de nitrato de baja afinidad. Concretamente, este gen participa en el suministro de nitrato para el desarrollo de semillas (Almagro et al., 2008). Además, el gen *NPF2.13* también es un transportador de nitratos dependiente de protones, con una débil actividad de transporte de glucosinatos. Participa en la carga del floema y la removilización de nitratos de las hojas más viejas a otros tejidos. (Wang Y. et al., 2018). También el gen *NPF2.9* es conocido como un transportador de nitrato dependiente de protones de baja afinidad (Wang Y. et al., 2018). Se requieren más trabajos para poder determinar la función de *NPF2.11* en tomate, así como su homología con los genes de *Arabidopsis*.

Además, también se hace necesario destacar la relación entre la expresión del gen *NPF1.17* y la biomasa al variar el aporte de N. Esta correlación solo fue significativa para dos de los genotipos, 70 y MM. Dada la elevada NUE de estos cultivares, estos resultados resultan de interés como base de futuros trabajos. De la misma forma que ocurre con el gen *NPF2.11*, no se tiene información sobre la función del gen *NPF1.17* en tomate. En esta especie sólo se han estudiado los genes *NRT1.1*, *NRT1.2*, *NRT2.1*, *NRT2.2* y *NRT2.3* con mayor profundidad (Fu et al., 2018) En el caso del gen *NPF1.17* tampoco se han identificados genes homólogos en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, existen genes en *Arabidopsis* pertenecientes a la misma familia relacionados con el transporte de nitratos, como el gen *NPF1.2*, que se conoce como un transportador de nitrato de baja afinidad involucrado en la transferencia del xilema al floema para redistribuir el nitrato en las hojas en desarrollo o el gen *NPF1.1* con la misma función. (Wang Y. et al., 2018).

Existen pocos estudios hasta el momento que hablen sobre la función de la familia de genes *NRT1/NPF* en plantas diferentes a *Arabidopsis*. A pesar de ello, actualmente se ha determinado la presencia de algunos genes de esta familia en otras especies que llevan a cabo funciones de transportadores de nitratos. Un ejemplo de ello es el gen *NRT1.1*, un sensor y transportador de nitrato en arroz, (Zhan, et al., 2019).

Por todo lo comentado anteriormente, los resultados obtenidos con este trabajo no descartan que los genes *NPF1.17* y *NPF2.11* podrían funcionar como transportadores de nitratos de baja afinidad en tomate, representando la misma función que genes de su misma familia cumplen en *Arabidopsis*, induciéndose cuando el aporte de nitrógeno es suficiente, y de esta forma permitiendo a la planta de tomate mantener su crecimiento. Sin embargo, la función de estos dos genes en tomate es aún desconocida. Una estrategia para aumentar el conocimiento sobre estos genes consistiría en hacer uso de la herramienta CRISPR para generar mutantes para su caracterización fisiológica.

6. CONCLUSIONES

Existe una gran variación en la respuesta a la carencia de nitrógeno entre los cuatro cultivares de NUE contrastante estudiados. Los cultivares MM y CV82 fueron aquellos que menos redujeron su crecimiento vegetativo en aporte limitante de nitrógeno. El cultivar CV32 fue el cultivar que se vio más afectado por la bajada de N.

No existe correlación entre el crecimiento vegetativo y la NUE a nivel de producción.

F_v/F_m se puede usar como marcador del efecto de la limitación de N sobre el crecimiento.

Existe variación en la expresión de los genes *NPF2.11* y *NPF1.17* entre cultivares y en respuesta al N.

Dentro de cada cultivar, la expresión de *NPF2.11* está correlacionada con la biomasa.

El gen *NPF1.17* mostró una mayor expresión en los cultivares MM y 70, que presentan una mayor NUE y producción. Este gen podría estar relacionado con la NUE en tomate, y por lo tanto ser de interés como marcador aplicado a la mejora genética vegetal para futuros trabajos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ABENAVOLI, M. R., LONGO, C., LUPINI, A., MILLER, A. J., ARANITI, F., MERCATI, F., PRINCI, M. P., & SUNSERI, F. (2016). Phenotyping two tomato genotypes with different nitrogen use efficiency. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 107, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.021>
2. ALMAGRO, A., SHAN, H. L., & YI, F. T. (2008). Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell*, 20(12), 3289–3299. <https://doi.org/10.1105/tpc.107>
3. BOHNER, A., KOJIMA, S., HAJIREZAEI, M., MELZER, M., & VON WIRÉN, N. (2015). Urea translocation of senescent Arabidopsis leaves is promoted by DUR3-mediated urea recovery from the leaf apoplast. *The Plant journal: for cellular and molecular biology*, 81(3), 377–387. <https://doi.org/10.1111/tpj.12740>
4. BOUGUYON, E., BRUN, F., MEYNARD, D., KUBEŠ, M., PERVENT, M., LERAN, S., LACOMBE, B., KROUK, G., GUIDERDONI, E., ZAŽÍMALOVÁ, E., HOYEROVÁ, K., NACRY, P., & GOJON, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate detection by the Nitrate Transceiver of Arabidopsis NRT1.1. *Natural plants*, 1, 15015. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.15>
5. CHAO, H., HE, J., CAI, Q., ZHAO, W., FU, H., HUA, Y., ... HUANG, J. (2021). The expression characteristics of NPF genes and their response to vernalization and nitrogen deficiency in rapeseed. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094944>
6. DE BANG, T. C., HUSTED, S., LAURSEN, K. H., PERSSON, D. P., & SCHJOERRING, J. K. (2021, March 1). The molecular–physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.17074>
7. CAMPIGLIA, E., MANCINELLI, R., & RADICETTI, E. (2011). Influence of no-tillage and organic mulching on tomato (*Solanum Lycopersicum L.*) production and nitrogen use in the mediterranean environment of central Italy. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.012>
8. FAO. (2017). World Fertiliser Trends and Outlook to 2020. (Rome: Food and Agricultural Organisation of the United Nations).

9. FRINK, C. R., WAGGONER, P. E., & AUSUBEL, J. H. (1999). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1175–1180. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1175>
10. FU, Y., YI, H., BAO, J., & GONG, J. (2015). LeNRT2.3 functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato. *FEBSletters*, 589(10),1072-1079.<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.016>
11. FUKUSHIMA, A., & KUSANO, M. (2014, October 1). A network perspective on nitrogen metabolism from model to crop plants using integrated “omics” approaches. *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru322>
12. GIEHL, R., LAGINHA, A.M., DUAN, F., RENTSCH, D., YUAN, L., & VON WIRÉN, N. (2017). A critical role of AMT2;1 in ammonium root-to-sprout translocation in Arabidopsis. *Molecular plant*, 10(11), 1449–1460. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.001>
13. GRUBER, B. D., GIEHL, R. F. H., FRIEDEL, S., & VON WIRÉN, N. (2013). Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiology*, 163(1), 161–179. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218453>
14. GUARDIOLA, J. L. (2022). *Plant physiology I: nutrition and transport* (16th ed.).
15. Gutierrez, RA (2012). Systems biology to improve plant nitrogen nutrition. *Science*, 336 (6089), 1673-1675.
16. GU, R., DUAN, F., AN, X., ZHANG, F., VON WIRÉN, N., & YUAN, L. (2013). Characterization of AMT-mediated high-affinity ammonium absorption in maize roots (*Zea mays* L.). *Plant and cellular physiology*, 54(9), 1515–1524. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct099>
17. HAO, D. L., ZHOU, J. Y., YANG, S. Y., QI, W., YANG, K. J. AND SU, Y. H. (2020). Function and Regulation of Ammonium Conveyors in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3557. <https://doi.org/10.3390/ijms21103557>
18. HAVÉ, M., MARMAGNE, A., CHARDON, F., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. (2017). Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from Arabidopsis to crops. *Journal of experimental botany*, 68(10), 2513–2529. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw365>
19. HUDSON, D., GUEVARA, D., YAISH, M. W., HANNAM, C., LONG, N., CLARKE, J. D., BI, Y. M., & ROTHSTEIN, S. J. (2011). GNC and CGA1 modulate chlorophyll biosynthesis and glutamate synthase (GLU1/Fd-GOGAT) expression in Arabidopsis. *PloS one*, 6(11), e26765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026765>
20. IQBAL, A., QIANG, D., ALAMZEB, M., XIANGRU, W., HUIPING, G., HENGHENG, Z., NIANCHANG, P., XILING, Z., & MEIZHEN, S. (2020). Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(3), 904–914. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10085>
21. JACQUOT, A., CHAPUT, V., MAURIES, A., LI, Z., TILLARD, P., FIZAMES, C., BONILLO, P., BELLEGARDE, F., LAUGIER, E., SANTONI, V., HEM, S., MARTIN, A., GOJON, A., SCHULZE, W. AND LEJAY, L. (2020), NRT2.1 C-terminal phosphorylation prevents high root affinity nitrate uptake activity in Arabidopsis thaliana. *New phytologist*, 228: 1038-1054.<https://doi.org/10.1111/nph.16710>
22. JIMÉNEZ-SUANCHA, S. C., ÁLVARADO S., O. H., & BALAGUERA-LÓPEZ, H. E. (2015). Fluorescence as an indicator of stress in *Helianthus annuus* L. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 149–160. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3753>
23. JIN, Z., ZHU, Y., LI, X. et al. N retention in soil and nitrate leaching in three types of dunes in China's Mu Us Desert. *Scientific Report* 5, 14222 (2015).<https://doi.org/10.1038/srep14222>
24. KROUK, G., CRAWFORD, N. M., CORUZZI, G. M., & TSAY, Y. F. (2010). Nitrate signalling: Adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.003>
25. KUMARI, S., SHARMA, N. & RAGHURAM, N. (2021). Meta-analysis of yield-related and N-sensitive genes reveals chromosomal hotspots, key processes, and candidate genes for nitrogen use efficiency in rice. *Frontiers in Plant Science*, 12, 627955. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.627955>
26. LÉLAN, S., VARALA, K., BOYER, J.C., CHIURAZZI, M., CRAWFORD, N., DANIEL-VEDELE, F., DAVID, L., DICKSTEIN, R., FERNANDEZ, E., FORDE, B., GASSMANN, W., GEIGER, D., GOJON, A., GONG, J.M., HALKIER, B. A., HARRIS, J.M., HEDRICH, R., LIMAMI, A.M., RENTSCH, D., SEO, M., LACOMBE, B. (2014). A unified nomenclature of

- the members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family in plants. *Trends in Plant Science*, 19(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.008>
27. 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, 523–551. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070121-015752>
 28. LOTHIER, J., GAUFICHON, L., SORMANI, R., LEMAÎTRE, T., AZZOPARDI, M., MORIN, H., CHARDON, F., REISDORF-CREN, M., AVICE, J. C., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. (2011). The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of experimental botany*, 62(4), 1375–1390. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq299>
 29. LUPINI, A., PRINCI, M. P., ARANITI, F., MILLER, A. J., SUNSERI, F., & ABENAVOLI, M. R. (2017). Physiological and molecular responses in tomato under different forms of N nutrition. *Journal of plant physiology*, 216, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.013>
 30. MARTÍNEZ-CARRASCO, R., PÉREZ, P., & MORCUENDE, R. (2005). Interactive effects of elevated CO₂, temperature, and nitrogen on the photosynthesis of wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and experimental botany*, 54 (1), 49–59.
 31. MAXWELL, K., & JOHNSON, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
 32. MILLER, A. J., FAN, X., ORSEL, M., SMITH, S. J., & WELLS, D.M. (2007). Transport and signaling of nitrates. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2297–2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm066>
 33. MÖLLER, K., STINNER, W. & LEITHOLD, G. Growth, composition, biological N₂ fixation and nutrient absorption from a mixture of legume cover crops and the effect of their removal on nitrogen balances from the field and the risk of nitrate leaching. *Nutr Cycl Agroecosyst* 82, 233 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9182-2>
 34. MORALES-MORALES, EDGAR JAVIER, RUBÍ-ARRIAGA, MARTÍN, LÓPEZ-SANDOVAL, JOSÉ ANTONIO, MARTÍNEZ-CAMPOS, ÁNGEL ROBERTO, & MORALES-ROSALES, EDGAR JESÚS. (2019). Urea (NBPT) an alternative in nitrogen fertilization of annual crops. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(8), 1875-1886. Epub February 05, 2021. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i8.1732>
 35. MU, X., & CHEN, Y. (2021, January 1). The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.019>
 36. PEÑA, E. J., ZINGMARK, R., & NIETCH, C. (1999). Comparative photosynthesis of two species of intertidal epiphytic macroalgae in mangrove roots during immersion and emersion. *Journal of Phycology*, 35(6), 1206-1214.
 37. RENAU-MORATA, B.; MOLINA, R.-V.; MINGUET, EG; CEBOLLA-CORNEJO, J.; CARRILLO, L.; MARTÍ, R.; GARCÍA-CARPINTERO, V.; JIMENEZ-BENAVENTE, E.; YANG, L.; CAÑIZARES, J.; CHANNELS, J.; MEDINA, J.; NEBAUER, SG Integrative transcriptomic and metabolomic analysis at the organ scale reveals genetic modules involved in responses to suboptimal nitrogen supply in tomato. *Agronomy* 2021 ,11, 1320. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071320>
 38. ROSELLÓ, J. (2012). ORGANIC CULTIVATION OF TOMATO AND PEPPER. Spanish Society of Organic Agriculture (SEAE). *Spanish Society of Organic Agriculture (SEAE)*.
 39. SAKURABA, Y., CHAGANZHANA, MABUCHI, A., IBA, K., & YANAGISAWA, S. (2021). Improved expression of NRT1.1/NPF6.3 in shoots enhances growth under nitrogen deficiency stress in Arabidopsis. *Communications Biology*, 4(1), 256. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01775-1>
 40. Thermo Scientific | Thermo Fisher Scientific – NL
 41. TEGEDER, M., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *The New phytologist*, 217(1), 35–53. <https://doi.org/10.1111/nph.14876>
 42. TEI, F., BENINCASA, P., & GUIDUCCI, M. (2002). Critical nitrogen concentration in processing tomato. *European Journal of Agronomy*, 18(1–2), 45–55. [https://doi.org/10.1016/s1161-0301\(02\)00096-5](https://doi.org/10.1016/s1161-0301(02)00096-5)
 43. VAN DELDEN, SH, NAZARIDELJOU, MJ & MARCELIS, L. (2020). Nutrient solutions for Arabidopsis thaliana: A study on the composition of the nutrient solution in hydroponic systems. *Plant Methods* 16, 72. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00606-4>

44. VIDAL, EA, ALVAREZ, JM, ARAUS, V., RIVERAS, E., BROOKS, MD, KROUK, G., RUFFEL, S., LEJAY, L., CRAWFORD, NM, CORUZZI, GM, & GUTIERREZ, RA (2020). Nitrate in 2020: thirty years from transport to signalling networks. *The Plant Cell*, 32 (7), 2094–2119. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00748>
45. WANG, Y. H., GARVIN, D. F., & KOCHIAN, L. V. (2001). Nitrate-induced genes in tomato roots. Matrix analysis reveals new genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant physiology*, 127(1), 345–359. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.345>
46. WANG, R., XING, X., WANG, Y., TRAN, A., & CRAWFORD, N.M. (2009). A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant physiology*, 151(1), 472–478. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140434>
47. WANG, Y. Y., CHENG, Y. H., CHEN, K. E., & TSAY, Y. F. (2018). Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annual review of plant biology*, 69, 85–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040056>
48. WEN, J., LI, P. F., RAN, F., GUO, P. C., ZHU, J. T., YANG, J., ZHANG, L. L., CHEN, P., LI, J. N., & DU, H. (2020). Genome-wide characterization, expression analyses, and functional prediction of the NPF family in Brassica napus. *BMC genomics*, 21(1), 871. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07274-7>
49. WHO global air quality guidelines. (2021). Particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. *Coastal And Estuarine Processes* (pp. 1–360). Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345329>.
50. YA-LING LIN, YI-FANG TSAY, *Journal of Experimental Botany*, Volume 68, Issue 10, May 1, 2017, pages 2603–2609, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx053>
51. YUAN, L., GRAFF, L., LOQUÉ, D., KOJIMA, S., TSUCHIYA, Y. N., TAKAHASHI, H., & VON WIRÉN, N. (2009). AtAMT1;4, a high-affinity ammonium transporter specific to plasma membrane pollen in Arabidopsis. *Plant and cellular physiology*, 50(1), 13–25. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn186>
52. ZHANG, J., LIU, Y. X., ZHANG, N., HU, B., JIN, T., XU, H., QIN, Y., YAN, P., ZHANG, X., GUO, X., HUI, J., CAO, S., WANG, X., WANG, C., WANG, H., QU, B., FAN, G., YUAN, L., GARRIDO-OTER, R., CHU, C., ... BAI, Y. (2019). NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nature biotechnology*, 37(6), 676–684. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0104-4>
53. ZHAO, L., LIU, F., CRAWFORD, N. M., & WANG, Y. (2018). Molecular Regulation of Nitrate Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2039. <https://doi.org/10.3390/ijms19072039>
54. ZOTARELLI, L., SCHOLBERG, J. M., DUKES, M. D., MUÑOZ-CARPENA, R., & ICERMAN, J. (2009). Tomato yield, biomass accumulation, root distribution and irrigation water use efficiency on a sandy soil, as affected by nitrogen rate and irrigation scheduling. *Agricultural Water Management*, 96(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.06.007>