



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

Estudio del papel de las permeasas de la familia AAP de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la partición de aminoácidos para producción de fruto. Relación con el aporte de nitrógeno a la planta.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Carreres Creus, Paula

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a: Molina Romero, Rosa Victoria

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# Estudio del papel de las permeasas de la familia AAP de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la partición de aminoácidos para producción de fruto. Relación con el aporte de nitrógeno a la planta.

**Palabras clave:** tomate; aminoácidos; partición; cosecha; nitrógeno; fertilización sostenible

**Resumen:** La familia de permeasas AAP se ha descrito como clave en la partición de aminoácidos en *Arabidopsis* y cultivos como el guisante o el arroz. Sin embargo, hay muy poca información sobre el papel de las AAPs en especies de fruto carnoso como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), principal cultivo de hortalizas a nivel mundial. En este trabajo, se ha realizado una caracterización inicial de las distintas permeasas descritas en tomate, estudiando su expresión génica en distintos órganos, que estaría relacionada con su posible papel en la carga de aminoácidos al floema en hoja, así como en la descarga al fruto. Asimismo, se ha estudiado la variabilidad existente de su expresión en hoja entre cultivares con conocidas diferencias en la eficiencia en el uso del N (NUE), así como el efecto de una reducción de la fertilización nitrogenada.

Con respecto a la carga de aminoácidos en hoja, se ha observado la existencia de variabilidad en la expresión de estas permeasas entre distintas accesiones de tomate. Hay que señalar que, aunque existe variabilidad entre genotipos, las permeasas AAP2 y AAP4 son las que se expresan mayoritariamente en todos ellos, siendo posiblemente las principales responsables de la carga del floema en hoja. En condiciones limitantes de N, cobra especial interés la permeasa AAP6 que presenta un aumento de expresión en todas las accesiones estudiadas. Además, en estas condiciones de cultivo, existe una correlación con la producción y el tamaño de fruto.

El estudio de las permeasas implicadas en la descarga de aminoácidos a las distintas partes del fruto, en la variedad MoneyMaker, revela que también en este órgano son las permeasas AAP2 y AAP4 las que se expresan mayoritariamente y, por tanto, aquellas responsables de la descarga del floema al fruto.

En su conjunto, estos estudios preliminares han permitido identificar diversos genes AAPs con funciones relevantes en procesos tanto de carga como descarga de aminoácidos, así como en la respuesta a la deficiencia del nitrógeno. En el contexto actual de necesaria reducción de la aplicación de fertilizantes nitrogenados en agricultura, todos ellos podrían ser dianas de futuros programas de mejora de la NUE.

Los objetivos de este trabajo se relacionan con los siguientes ODS de la Agenda 2030: ODS 6. Agua limpia y saneamiento, ODS 12. Producción y consumo responsables, ODS 14. Vida submarina y ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.

**Alumna:** Dña. Paula Carreres Creus

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

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

**Valencia, mes de Julio 2023**

*Study of the role of the permeases of the AAP family of tomato (Solanum lycopersicum L.) on the partition of nitrogen for yield. Relation with the supply of nitrogen.*

**Key Words:** *tomato; amino acids; partition; harvest; nitrogen; sustainable fertilization*

**Abstract:** *The AAP family of permeases has been described as key in the partitioning of amino acids in Arabidopsis and crops such as pea or rice. However, little is known about the role of AAPs in fleshy fruit species such as tomato (Solanum lycopersicum L.), the main vegetable crop worldwide. In this work, an initial characterization of the different permeases described in tomato has been carried out, studying their gene expression in different organs, which would be related to their possible role in the load of amino acids to the phloem in leaves, as well as in the discharge to the fruit. Likewise, the existing variability of its expression in leaves among cultivars with known differences in N use efficiency (NUE), as well as the effect of a reduction in nitrogen fertilization, has been studied.*

*Regarding the load of amino acids in leaves, the existence of variability in the expression of these permeases among different tomato accessions has been observed. It should be noted that, although there is variability between genotypes, the AAP2 and AAP4 permeases are the ones that are most expressed in all of them, possibly being the main responsible for the phloem load in leaves. Under limiting conditions of N, the AAP6 permease is of special interest, which presents an increase in expression in all the accessions studied. Also, under these growing conditions, there is a correlation with production and fruit size.*

*The study of the permeases involved in the release of amino acids to the different parts of the fruit, in the Moneymaker variety, reveals that the AAP2 and AAP4 permeases are also the most expressed in this organ and, therefore, those responsible for the release from phloem to fruit.*

*Taken together, these preliminary studies have allowed the identification of various AAPs genes with relevant functions in processes of both loading and unloading of amino acids, as well as in the response to nitrogen deficiency. In the current context of necessary reduction in the application of nitrogenous fertilizers in agriculture, all of them could be targets of future improvement programs of the NUE.*

*The objectives of this work are related to the following SDGs of the 2030 Agenda: SDG 6. Clean water and sanitation, SDG 12. Responsible consumption and production, SDG 14. Life below water and SDG 15. Life on land.*

**Student:** Paula Carreres Creus

**Tutor:** Sergio González Nebauer

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

**Valencia, month of July 2023**

## AGRADECIMIENTOS

*'A mi familia por su apoyo incondicional.*

*A Sergio y a Savi, por abrirme las puertas de su laboratorio  
y ayudarme en la realización de este trabajo.'*

# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Importancia del cultivo de tomate y objetivos de mejora.....	1
1.2. Crecimiento del fruto y partición de fotoasimilados en la planta .....	1
1.2.1. Partición de azúcares .....	2
1.2.2. Transporte de agua .....	3
1.2.3. Partición del nitrógeno.....	3
1.3. Control del transporte de aminoácidos por permeasas .....	5
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>8</b>
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	8
3.2. Extracción de ARN. ....	8
3.3. Síntesis de cADN .....	9
3.4. Medidas de expresión por RT-qPCR.....	9
3.5. Análisis estadístico.....	10
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>10</b>
4.1. Identificación de permeasas de la familia AAP implicadas en la carga de aminoácidos en el floema de tomate. Variabilidad entre cultivares.....	10
4.2. Efecto de la disminución del aporte de nitrógeno sobre la expresión de las AAPs en hoja madura. Variabilidad entre cultivares.....	12
4.3. Relación entre la carga de aminoácidos en el floema por las distintas permeasas y la producción de fruto.....	17
4.4. Actividad de las permeasas AAPs en distintas zonas de descarga en el fruto de tomate.....	19
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>22</b>
<b>6. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>23</b>
<b>7. Anexos. ....</b>	<b>28</b>
7.1. ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.....	28
7.2. ANEXO II: ANOVA múltiple de los niveles de expresión de las AAP1-8 en hoja joven de las distintas variedades de tomate. ....	30
7.3. ANEXO II: Expresión de cada AAP (AAP1-8) en las distintas partes del tomate comercial <i>Moneymaker</i> .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CARGA DEL NITRÓGENO ASIMILADO AL FLOEMA EN HOJAS FUENTES. ....	4
FIGURA 2. DESCARGA DE ESPECIES DE N DEL FLOEMA Y CARGA A LA SEMILLA Y EMBRIÓN. ....	4
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PERMEASA DE AMINOÁCIDOS AAP1 DE <i>ARABIDOPSIS</i> .....	6
FIGURA 4. MODELO PROPUESTO DE FUNCIONES DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS (AA) EN <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	6
FIGURA 5. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>AAP1-8</i> EN HOJA JOVEN MADURA DE LAS DISTINTAS VARIEDADES DE TOMATE Y LA ACCESIÓN To-937 DE <i>S. PIMPINELLIFOLIUM</i> , CULTIVADO CON NIVEL DE APORTE DE NITRÓGENO SUFICIENTE (8 MM).....	11
FIGURA 6. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PERMEASAS <i>AAP1-8</i> EN HOJA JOVEN DE LAS DISTINTAS ACCESIONES ESTUDIADAS DE TOMATE, EN LAS DIFERENTES CONDICIONES DE APORTE DE N ENSAYADA. ....	14
FIGURA 7. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES A PARTIR DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS <i>AAP1-8</i> EN HOJA JOVEN DE LOS DISTINTOS CULTIVARES DE TOMATE EN DOS CONDICIONES DE CULTIVO DISTINTAS (100, 8MM N; 50, 4MM N). ....	15
FIGURA 8. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES A PARTIR DEL PORCENTAJE DE CAMBIO DE EXPRESIÓN (APORTE DE NITRÓGENO 4MM RESPECTO A 8MM) DE LAS <i>AAP1-8</i> , EN HOJA DE TODOS LOS CULTIVARES DE TOMATE ESTUDIADOS. ....	16
FIGURA 9. NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>LIN5</i> EN FRUTO DE DISTINTAS VARIEDADES DE TOMATE, CULTIVADO CON NIVEL DE APORTE DE NITRÓGENO SUFICIENTE (8 MM). ....	19
FIGURA 10. CORTE LONGITUDINAL DE TOMATE MOSTRANDO LAS DISTINTAS PARTES DEL FRUTO.....	20
FIGURA 11. NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>AAP1-8</i> DE LA ZONA DE INSERCIÓN DEL PEDICEL (PDC) DEL TOMATE COMERCIAL MONEYSMAKER PARA UN NIVEL DE APORTE DE N SUFICIENTE (8MM). ....	20
FIGURA 12. NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>AAP1-8</i> DEL PERICARPIO (PER) DEL TOMATE COMERCIAL MONEYSMAKER PARA UN NIVEL DE APORTE DE N SUFICIENTE (8MM). ....	21
FIGURA 13. NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>AAP1-8</i> DE LA PLACENTA (PLA) DEL TOMATE COMERCIAL MONEYSMAKER PARA UN NIVEL DE APORTE DE N SUFICIENTE (8MM). ....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CONCENTRACIONES PARA CADA REACCIÓN DE QRT-PCR.....	9
TABLA 2. PROGRAMA DE QRT-PCR EN TERMOCICLADOR ESTANDARIZADO EN EL LABORATORIO.....	9
TABLA 3. PAREJAS SINTÉNICAS DE LOS GENES <i>AAPs</i> ENTRE <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> Y <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . ....	12
TABLA 4. CORRELACIONES ENTRE LOS PORCENTAJES DE VARIACIÓN DE EXPRESIÓN DE <i>AAP1-8</i> EN TODAS LAS VARIEDADES ESTUDIADAS.....	17
TABLA 5. VALORES DE CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS INDICADOS Y LAS PERMEASAS <i>AAP1-8</i> EN LOS CULTIVARES DE TOMATE MM, CV32, CV70 Y CV82.....	18

## NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

CV32: BVG 3132

CV70: BVG 12570

CV82: BVG 5482

DDA: Días después anthesis

MM: *Moneymaker*

NUE: Eficiencia en el Uso de Nitrógeno

PDC: Zona de inserción del pedicelo

PER: Pericarpio

PI: Accesoión To-937 de *S. pimpinellifolium*

PLA: Placenta/columela

# 1. Introducción

## 1.1. Importancia del cultivo de tomate y objetivos de mejora.

Tras los cereales y los cultivos productores de azúcar, las hortalizas son el cultivo con mayor producción mundial. De hecho, el crecimiento de este grupo desde el 2000 hasta el 2019 ha sido del 65 %, superando los mil millones de toneladas (FAO, 2021). El tomate, *Solanum lycopersicum* L., es el principal cultivo dentro de las hortalizas y destaca por su contenido en azúcares, ácidos, aminoácidos y otros compuestos, como flavonoides, vitamina C o licopeno, siendo este último de interés por su actividad antioxidante (Gerszberg et al., 2015; Olaiya et al., 2015). Durante muchos años se centró su mejora en la uniformidad de los frutos, la tolerancia a estrés biótico, facilitar su recolección o transporte, aumentar el tiempo de almacenaje (*shelf-life*), etc. (Bai y Lindhout, 2007; Klee y Tieman, 2013). Actualmente los objetivos de mejora del tomate, y de otras especies de consumo humano, se basan principalmente en aumentar su calidad mejorando las cualidades organolépticas, nutricionales, así como optimizar la producción en condiciones de cultivo sostenible. Por este motivo, es fundamental identificar y caracterizar aquellos genes implicados en procesos relacionados con estas características deseadas. Además, se trata de una especie de gran interés biotecnológico, como modelo en el estudio del desarrollo de frutos de tipo carnoso (Tomato Genome Consortium, 2012; Gerszberg et al., 2015) por lo que los conocimientos en este cultivo podrían servir como base en la mejora de cultivos similares.

## 1.2. Crecimiento del fruto y partición de fotoasimilados en la planta

Tras la fecundación o el estímulo partenocárpico del ovario, se inicia el desarrollo de la flor hasta convertirse en fruto maduro (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Este proceso tiene lugar en fases sucesivas, que comienzan con una primera fase de divisiones celulares, seguida de un periodo de crecimiento celular, caracterizado por la acumulación de agua y biomasa, y una fase final de maduración tanto fisiológica como organoléptica. Hay que tener en cuenta que, cuantitativamente, los principales componentes del fruto de tomate son agua, carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, por lo que, el crecimiento del fruto dependerá también de la capacidad de acumular estos compuestos (Dali et al., 1992).

En términos generales, estos componentes son captados del suelo o bien producidos durante la fotosíntesis y procesos de asimilación de nutrientes en las hojas. Por una parte, el agua se capta del suelo y se transporta por el tallo hasta las hojas a través de los vasos y traqueidas (angiospermas), o exclusivamente a través de las traqueidas (gimnospermas) del xilema. La mayor parte se pierde a la atmósfera por transpiración, pero la porción retenida contribuye al crecimiento de la planta. Por otra parte, también se captan del suelo los elementos minerales (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Entre ellos, el nitrógeno (N), ya sea en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), urea o en algunos casos como aminoácidos; y otros elementos esenciales como el fósforo, potasio, azufre, etc. Elementos como el nitrógeno o el azufre han de ser asimilados, de forma que son incorporados como aminoácidos fundamentalmente, al unirse a esqueletos carbonados provenientes de la fotosíntesis (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En el caso del nitrógeno, el nitrato se reduce a nitrito y finalmente a amonio, el cual se asimilará en aminoácidos mediante la acción de enzimas como la glutamina sintetasa (Tegeger, 2014; Tegeger y Masclaux-



Daubresse; 2018). Estos aminoácidos junto con los azúcares son cuantitativamente los mayores contribuyentes a la biomasa seca en las plantas.

Todos estos asimilados se transportan desde las hojas a los sumideros a través de los tubos cribosos del floema. El nitrógeno viaja principalmente en forma de aminoácido, concretamente, los más abundantes son el glutamato y el aspartato (también en forma de amidas, asparagina y glutamina). En cuanto a los sumideros, son órganos importadores de carbohidratos y otros asimilados que variarán según las etapas de desarrollo de la planta. En las primeras etapas del desarrollo, los órganos vegetativos (ápices radicales y del vástago) actúan como sumideros consuntivos, pues se encuentran en estado de crecimiento. Tras este proceso, la planta mantendrá como órganos sumidero aquellos que estén en crecimiento u órganos de almacenamiento de reservas, pero otros órganos como las hojas pasarán a ser fuentes de asimilados. Durante la etapa reproductiva en aquellas especies con frutos, el crecimiento de estos es fundamental por lo que el fruto se convierte en el sumidero principal. De hecho, se los conoce como sumideros irreversibles, pues nunca se convierten en fuente de asimilados, como por ejemplo ocurre en las hojas (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En cambio, en otras especies como *Solanum tuberosum* (patata) o *Zingiber officinale* (jengibre), el principal sumidero es el tubérculo.

En este trabajo nos centraremos en la etapa reproductiva del tomate, concretamente en la descarga de asimilados en el principal sumidero, el fruto, así como en la carga de estos al floema a partir de hojas maduras. En este proceso de partición de los asimilados son fundamentales, por lo tanto, transportadores de azúcares y aminoácidos como reguladores de la distribución en la planta.

### 1.2.1. Partición de azúcares

En cuanto a los azúcares, se asume que la carga del floema en las hojas de tomate sigue la vía apoplástica mediante cotransporte con protones. En Solanáceas, se destaca el papel de los transportadores SUT (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Por lo que respecta a la descarga en el fruto, esta parece cambiar de vía simplástica a apoplástica conforme se desarrolla el fruto (Dali et al., 1992). En esta última, se destaca el papel de las invertasas de pared celular, las cuales catalizan la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa, que posteriormente son incorporados por transportadores de hexosas a las células del fruto (Azcón-Bieto y Talón, 2008). La invertasa LIN5, muy expresada en el ovario y frutos de tomate en desarrollo, se ha relacionado con el tamaño del fruto (Godt y Roitsch, 1997; Fridman y Zamir, 2003).

En la partición de los azúcares también cobran gran importancia los transportadores de la familia SWEET, que se encargan de extraer del floema al apoplasto la sacarosa que será hidrolizada por las invertasas. También participan en la carga al floema, extrayendo la sacarosa al apoplasto en el mesófilo de la hoja para incorporarse posteriormente a los tubos cribosos mediante los transportadores SUT. En tomate se han identificado 31 genes de estos genes *SWEET* (Feng et al., 2015; Ho et al., 2019) y en el estudio de Ko et al., 2021, por ejemplo, se afirma que *SISWEET15* presenta elevados niveles de expresión en células vasculares de frutos en desarrollo.

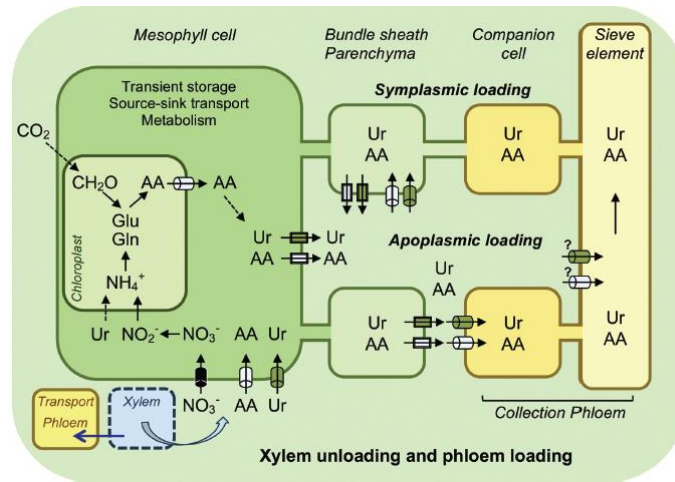
### 1.2.2. Transporte de agua

El movimiento de agua a través de membranas, por otra parte, se regula mediante las acuaporinas, las cuales se pueden dividir en distintos grupos entre los que destacan las TIPs (proteínas intrínsecas del tonoplasto) y PIPs (proteínas intrínsecas de la membrana plasmática), que, a su vez, se dividen en dos grupos PIP1 y PIP2 (Kaldenhoff y Fischer, 2006). En el estudio de Shiota et al., (2006), se analizaron los patrones de expresión de estas acuaporinas tanto en semillas como en el fruto del tomate. En cuanto a las semillas, se concluyó que, en las fases más tardías del desarrollo, los niveles de expresión de las *PIPs* se reducen manteniéndose un bajo contenido de agua en la semilla en proceso de maduración. En cuanto a los frutos completos, de las 8 PIPs estudiadas, se detectó una mayor expresión de 3 de ellas en las primeras fases de desarrollo y de otras 3 distintas en estadios más tardíos.

### 1.2.3. Partición del nitrógeno

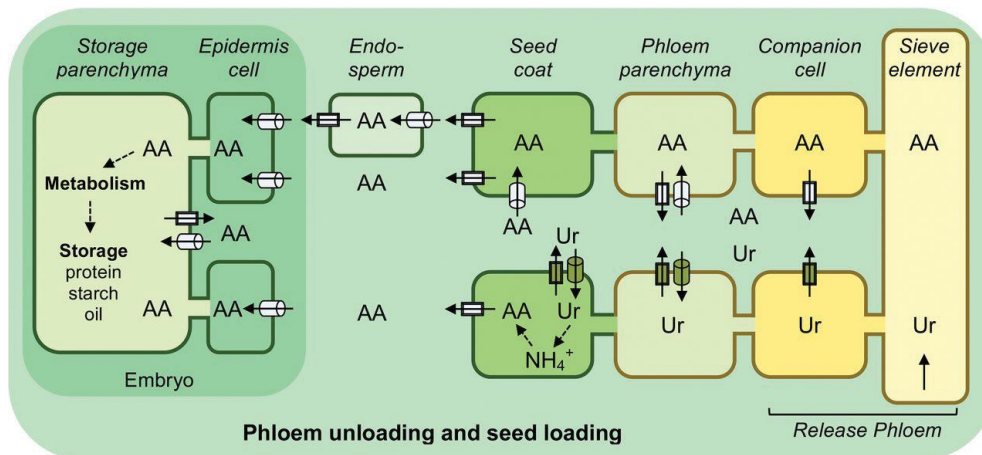
Además del carbono (C), el nitrógeno (N) es, cuantitativamente, el otro componente principal para la biomasa en la planta. Desde la revolución verde, el incremento de la producción de los cultivos se ha basado en la aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados (Khush,1999; Liu et al.,2022). Sin embargo, este uso excesivo puede ocasionar serios problemas de contaminación del suelo y las aguas (Ruiz et al., 2020), una problemática que se contempla dentro del marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible ([www.un.org](http://www.un.org)), tal y como se describe en el ANEXO I. Por este motivo, el mejor entendimiento de los mecanismos de partición del N en la planta, así como el estudio de la reducción en el aporte de este nutriente, es fundamental para alcanzar una fertilización más sostenible que permita una máxima producción y calidad de fruto minimizando el aporte de compuestos nitrogenados.

Como se ha indicado previamente, el N se transporta por la planta principalmente en forma de aminoácidos. Estos aminoácidos asimilados en las hojas (aunque en algunos casos también ocurre en raíz) se cargan en el floema, y se descargan en los sumideros (Tegeeder, 2014; Tegeeder y Masclaux-Daubresse; 2018). Como se observa en la Figura 1, la carga puede ser simplástica o apoplástica. Sin embargo, en tomate se ha propuesto que en hojas es fundamentalmente apoplástica. En cuanto a la descarga a los sumideros, aunque puede seguir estas dos vías (Figura 2), en el fruto se sugiere una descarga simplástica inicial en las primeras fases del cuajado, que se sustituye por la apoplástica durante la mayor parte del desarrollo del fruto (Dali et al.,1992). Por este motivo, los transportadores que permiten que los aminoácidos atraviesen las membranas, tanto en la carga como la descarga, son de gran importancia en el control de la partición de estos compuestos entre fuentes y sumidero.



**Figura 1. Carga del nitrógeno asimilado al floema en hojas fuentes.**

Los compuestos nitrogenados son transportados por el xilema ( $\text{NO}_3^-$ , nitrato; AA, aminoácidos; Ur, ureidos) hasta las células del mesófilo de las hojas. Mientras que AA, Ur y proteínas pueden cargarse directamente al floema, el  $\text{NO}_3^-$  debe asimilarse. La carga del floema seguirá dos vías distintas, la simplástica mediante plasmodesmos o la apoplástica, siendo esencial la presencia de transportadores (representados como cilindros con flechas).  $\text{NO}_2^-$ , nitrito;  $\text{NH}_4^+$ , amonio;  $\text{CO}_2$ , dióxido de carbono;  $\text{CH}_2\text{O}$ , compuestos carbonados generales; Gln, glutamina; Glu, glutamato. (De Tegeder, 2014)



**Figura 2. Descarga de especies de N del floema y carga a la semilla y embrión.**

Tanto la descarga de aminoácidos (AA) y ureidos (Ur) del floema como su carga en la cubierta seminal, se pueden producir por vía simplástica y apoplástica (mediante transportadores de membrana representados como rectángulos y cilindros con flechas). En la cubierta seminal, se catabolizan los ureidos a amonio que se reasimila en AA, los cuales salen a apoplasto mediante transportadores. Si el embrión está rodeado por endospermo, el transporte en este será de tipo apoplástico. La captación de los aminoácidos por parte del embrión está mediada por transportadores en las células epidérmicas e incluso en el parénquima de almacenamiento. (De Tegeder, 2014).

A su vez, cabe destacar, que en ocasiones se producen transferencias directas entre el xilema y floema, y se suele asociar al desarrollo de órganos de rápido crecimiento. Por otra parte, la

removilización de recursos en la senescencia de las hojas, puede considerarse otra vía de obtención de N para la planta (Tegeeder y Masclaux-Daubresse, 2018)

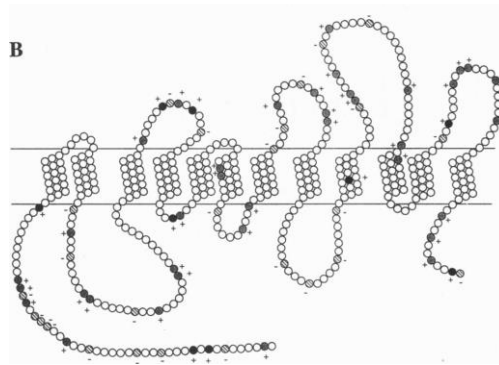
### 1.3. Control del transporte de aminoácidos por permeasas

Los transportadores de aminoácidos se clasifican en dos grandes grupos en base a su secuencia: los transportadores AAAP (Amino Acid / Auxin Permease) y los APC (amino acid -polyamine and choline) (Okumoto y Pilot, 2011). El primer grupo se divide a su vez, en función de la especificidad de los aminoácidos que transportan, en: permeasas de aminoácidos (AAPs), transportadores de lisina e histidina (LHTs), transportadores de ácido gamma-aminobutírico (GATs), transportadores de prolina (ProTs), transportadores de ácido indol-3-acético (AUXs), transportadores de aminoácidos neutros y aromáticos (ANT) y los llamados 'amino acid transporter-like proteins'. (Ortiz-Lopez et al., 2000; Okumoto y Pilot, 2011; Alzharani, 2021). Por su parte los APC se clasifican en transportadores de aminoácidos catiónicos (CATs), 'amino acid/choline transporters' (ACTs), y 'polyamine H<sup>+</sup>-symporters' (PHSs) (Okumoto y Pilot, 2011).

Muchos de estos tipos de transportadores ya han sido extensamente estudiados en *Arabidopsis*. Algunos LHT, por ejemplo, parecen participar en la captación de N del suelo, expresándose fundamentalmente en raíz (Chen y Bush, 1997). Los ProT realizan funciones distintas en la planta, viéndose una mayor expresión de *AtProT1* en parénquima floemático, de *AtProT2* en raíces y de *AtProT3* en partes aéreas y epidermis de las hojas (Grallath et al., 2005). Con respecto a los CAT, algunos de ellos, como *CAT2*, se han relacionado con almacenamiento en vacuola al detectarse mediante proteínas de fusión con GFP en el tonoplasto (Hammes et al., 2006). Otros transportadores como *CAT6* se localizan en la membrana plasmática, cuya expresión se ha detectado en sumideros como raíces laterales, flores y semilla (Su et al., 2004)

Recientemente se ha identificado una nueva subfamilia de transportadores, los UMAMIT ('usually multiple acids move in and out transporter'), que se han relacionado tanto con el desarrollo de la semilla como con la carga y descarga de aminoácidos del floema (Zhao et al., 2021). Muchos estudios se han centrado en las semillas, como el de Besnard et al., 2018. En dicho estudio, se localizó la mayor expresión de *AtUMAMIT24* en la cubierta seminal, mientras que *AtUMAMIT25* parece expresarse más en el endospermo, mediando la exportación de aminoácidos de estos hacia el embrión. Otros investigadores han estudiado el efecto de diversas condiciones ambientales en estos transportadores, por ejemplo, *AtUMAMIT19* es uno de los más susceptibles a la regulación ambiental, siendo reprimida su expresión en raíces por el N (Zhao et al., 2021).

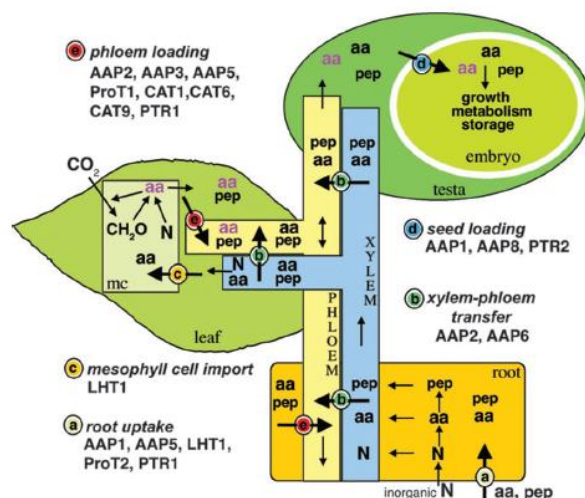
Este trabajo se centra en las permeasas de aminoácidos (AAPs), incluidas en los transportadores AAAP. En la literatura, se describen como los principales transportadores en la partición de aminoácidos en la planta (Okumoto et al., 2002; Tegeeder y Rentsch, 2010), con un papel principal en la carga y descarga del floema (Tegeeder y Rentsch, 2010; Tegeeder, 2014). Ya en 1993, Frommer et al. describió *AtAAP1* como un polipéptido de 53KDa con 12 regiones transmembrana (Figura 3) que funcionaba en simporte con protones. Posteriormente se estableció que esta familia de transportadores (*APP1-8* en *Arabidopsis*) mostraba afinidad por aminoácidos neutros y ácidos, aunque los transportadores 3 y 5 también eran capaces de transportar aminoácidos básicos (Fischer et al., 1995; Okumoto et al., 2002).



**Figura 3. Representación esquemática de la permeasa de aminoácidos AAP1 de *Arabidopsis***

Orientación propuesta en la membrana plasmática. Los residuos cargados se muestran remarcados y las histidinas se representan por círculos opacos. (Modificado de Frommer et al., 1993).

En *Arabidopsis*, también se han relacionado *AtAAP1* (Lee et al., 2007) y *AtAAP5* (Svennerstam et al., 2008) con la captación de aminoácidos del suelo (Figura 4). Por otro lado, destaca el papel de *AtAAP2* (Zhang et al., 2010) y *AtAAP6* (Okumoto et al., 2002) en el transporte directo de aminoácidos del xilema al floema (Figura 4), constatado este último por el estudio de mutantes deficientes de este gen (Hunt et al., 2010). *AtAAP2* parece participar también en la carga del floema (Zhang et al., 2010), aunque en este proceso parece ser fundamental el papel de *AtAAP8*. El estudio de mutantes knock-out para *AtAAP8* mostró un menor contenido de aminoácidos (reducción de hasta el 63%) en el exudado de las hojas fuente durante la fase reproductiva (Santiago y Tegeder, 2016). En este mismo estudio (Santiago y Tegeder, 2016) también se describió una reducción de semillas del 40%, por lo que también se plantea su papel en la descarga de aminoácidos en semilla. Esto ya se había abordado anteriormente en el estudio de Schmidt et al., (2007), en el cual *AtAAP8* se ha relacionado con la descarga en semilla, concretamente en el endospermo, al igual que *AtAAP1* con la descarga en el embrión (Sanders et al., 2009) (Figura 4). Otras familias de transportadores, como previamente se ha descrito, también participan en muchos de estos procesos (Figura 4).



**Figura 4. Modelo propuesto de funciones de transportadores de aminoácidos (aa) en *Arabidopsis*.**

A, Absorción en raíces; B, transferencia xilema-floema; C, importación a las células del mesófilo (mc); D, carga en semilla; E, candidatos potenciales para carga al floema; aa, aminoácidos; pep, péptidos; CH<sub>2</sub>O, carbohidratos. (De Tegeder y Rentsch, 2010).

Los AAPs también se han identificado en cultivos, como por ejemplo *Brassica napus*, *Solanum tuberosum*, *Vicia faba* y *Oryza sativa* (Pratelli i Pilot, 2014). En algunos casos, se ha descrito una relación de las AAPs con la producción de cosecha. Por ejemplo, en el estudio de Grant et al. (2021) en guisante, la sobreexpresión de *AAP1* junto al transportador de sacarosa SUT1 incrementaba la producción, tanto de peso medio de semilla como número de ellas. Se ha sugerido que esta sobreexpresión de *AAP1* produce un aumento en la descarga de aminoácidos en la semilla. Por otra parte, en estos sobreexpresores también se produjo una mayor expresión de esta permeasa en hojas, por lo que se estaría favoreciendo la carga de aminoácidos en el floema, es decir, promoviendo la actividad como 'fuente' de las hojas. Esto también se había observado previamente en el estudio de Perchlik y Tegeder (2017), en el cual los sobreexpresores de *PsAAP1* cultivados en distintas condiciones de aporte de N seguía manteniendo la mayor carga de aminoácidos al floema y el aumento del número de semillas.

Por otra parte, plantas de soja que sobreexpresan el gen *GmAAP6a*, ven mejorada la transferencia de aminoácidos desde las fuentes a los sumideros en condiciones limitantes de N. A su vez, las semillas de estas plantas transgénicas presentan un mayor contenido de aminoácidos libres (Liu et al., 2020).

No obstante, a pesar de la gran importancia de estas permeasas, la información referente a plantas de fruto carnoso es muy limitada. Únicamente destaca el estudio en sandía (*Citrullus lanatus*), en el cual se relaciona la expresión de *CIAAP3* y *CIAAP6* con la descarga de aminoácidos en frutos maduros y jóvenes, respectivamente (Shi et al. 2019). En tomate, se identificaron recientemente 88 transportadores pertenecientes a 12 subfamilias (Alzahrani, 2021). Entre estos, destacan los 8 AAPs que se evaluarán en el presente trabajo, y que no han sido caracterizados funcionalmente hasta la fecha. Únicamente se ha relacionado los genes *SIAAP5A* y *B* con el aumento en la resistencia de tomate al oomiceto *Phytophthora infestans* (Berg et al., 2021).

En este contexto, el presente trabajo pretende ampliar el conocimiento respecto a los mecanismos moleculares responsables de la partición del nitrógeno asimilado en *S. lycopersicum*, incidiendo en su relación con la producción y el tamaño del fruto, así como la respuesta de los genes implicados a la deficiencia de aporte nitrogenado. Para ello se proponen los siguientes objetivos:

## 2. Objetivos

- Identificar los AAPs responsables de la carga de aminoácidos al floema en hojas maduras en distintos genotipos de tomate y en la especie silvestre relacionada *S. pimpinellifolium*.
- Relacionar la producción de fruto en tomate con la carga de aminoácidos en la hoja.
- Determinar el efecto del nivel de aporte de nitrógeno sobre la expresión de las AAPs en hojas y su relación con la producción de fruto.
- Relacionar la descarga de azúcares y aminoácidos en el fruto en desarrollo.

- Determinar las AAPs implicadas en la descarga de aminoácidos en los distintos sumideros del fruto

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.

En este trabajo, se han empleado accesiones cedidas por el banco de germoplasma del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) que, en estudios previos del grupo de investigación de Fisiología vegetal, mostraron diferencias en la producción de fruto y la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE). La accesión BVG 12570, de tipo cuarenteno (CV70), presenta una alta producción de fruto de tamaño grande, y elevada eficiencia del uso de N para cosecha ( $E_{N,Y}$ ). El tomate pequeño de colgar BVG 5482 (CV82) presenta una baja producción de tomate pequeño, y baja  $E_{N,Y}$ . El tomate tipo cagón, BVG 3132 (CV32) tiene baja producción, y una menor capacidad de captación de N del suelo. El tomate comercial Moneymaker (MM) se empleó como genotipo de referencia. Este cultivar presenta una producción alta, así como  $E_{N,Y}$  elevada, con frutos de tamaño intermedio. Finalmente, se ha utilizado una accesión (To-937) del ancestro silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) más cercano del tomate comercial, que presenta una baja producción, aunque en estudios previos, se ha observado que presenta una elevada tolerancia a la deficiencia en el aporte de nitrógeno, manteniendo la concentración de N en el fruto en estas condiciones.

Las semillas de estos genotipos se esterizaron con lejía comercial al 50%, seguido de 3 lavados con agua destilada. Se depositaron hasta su germinación en placas Petri con papel de filtro humedecido. Una vez germinadas se transfirieron a macetas de 15 L con bolas de arcilla expandida (Arlita). Las plantas se regaron con solución fertilizante con aporte de nitrógeno óptimo (8 mM N) y limitante (4 mM N) (Hoagland y Arnon, 1950) en condiciones de invernadero. Estas condiciones han sido establecidas previamente en el laboratorio (Renau-Morata et al., 2021). Las plantas se mantuvieron, siguiendo prácticas de manejo estándar, hasta la fase reproductiva (desarrollo del 4º racimo) en fertilización diferencial durante 140 días.

Se muestrearon hojas jóvenes maduras (6ª-7ª hoja desde el ápice) y frutos verdes en desarrollo (10-15 DDA) durante el periodo reproductivo de la planta (día 110 del cultivo). Se muestrearon 3 réplicas de material de los distintos órganos a partir de plantas distintas. El material se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, se trituró, y se almacenó en arcones de -80 °C hasta su uso.

#### 3.2. Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó mediante el kit Total Plant RNA Mini KIT (IBI SCIENTIFIC, España) siguiendo el protocolo descrito por la marca con ciertas modificaciones. Se emplearon 100 mg de tejido para las muestras de hoja joven y 300 mg para fruto verde. Se determinó la concentración de ARN mediante un espectrofotómetro Epoch (Biotek). Además, se comprobó su calidad midiendo las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, que hacen referencia a la posible contaminación por proteína, fenoles, guanidina o carbohidratos. Los valores obtenidos cumplieron con los rangos de calidad requeridos: sobre 2 para el ratio 260/280 y entre 2 y 2,2 para el 260/230 (datos no mostrados).

### 3.3. Síntesis de cADN

La retrotranscripción de ARN a cADN se realiza siguiendo el protocolo Prime Script RT Kit (Takara). La síntesis se realiza en un termociclador (Bio-Rad), manteniendo la temperatura para la reacción en 37°C durante 15 minutos, seguido de 5 segundos a 85°C para finalizar la reacción.

### 3.4. Medidas de expresión por RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se realizan en un termociclador CFX Connect 96 (Bio-Rad). Se emplearon 40 ng de cADN por reacción y el mix TB Green Premix Ex Taq (Takara) en un volumen de reacción de 10 µL. Los cebadores utilizados fueron previamente diseñados, y probado su eficiencia, para la amplificación específica de cada uno de los genes de interés. Las concentraciones optimizadas del par de cebadores de cada gen se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Concentraciones para cada reacción de qRT-PCR.**

GEN	Fw (nM)	Rv (nM)
<b>UBIQUITINA3</b>	375	125
<b>AAP1</b>	300	300
<b>AAP2</b>	300	300
<b>AAP3</b>	200	200
<b>AAP4</b>	200	200
<b>AAP5</b>	300	300
<b>AAP6</b>	300	300
<b>AAP7</b>	300	300
<b>AAP8</b>	300	300
<b>LIN5</b>	300	300

El gen de la UBIQUITINA3 (Hoffman et al., 1991) se usó como gen de referencia interno (*housekeeping*). Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 2. Para cada gen, se analizaron las tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada una para todas los órganos, accesiones y tratamientos estudiados. El análisis de expresión relativa, o más bien del contenido relativo de ARNm, se realizó siguiendo el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001). En cada figura de resultados se indica la muestra de referencia para el cálculo de las expresiones relativas.

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

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



### 3.5. Análisis estadístico

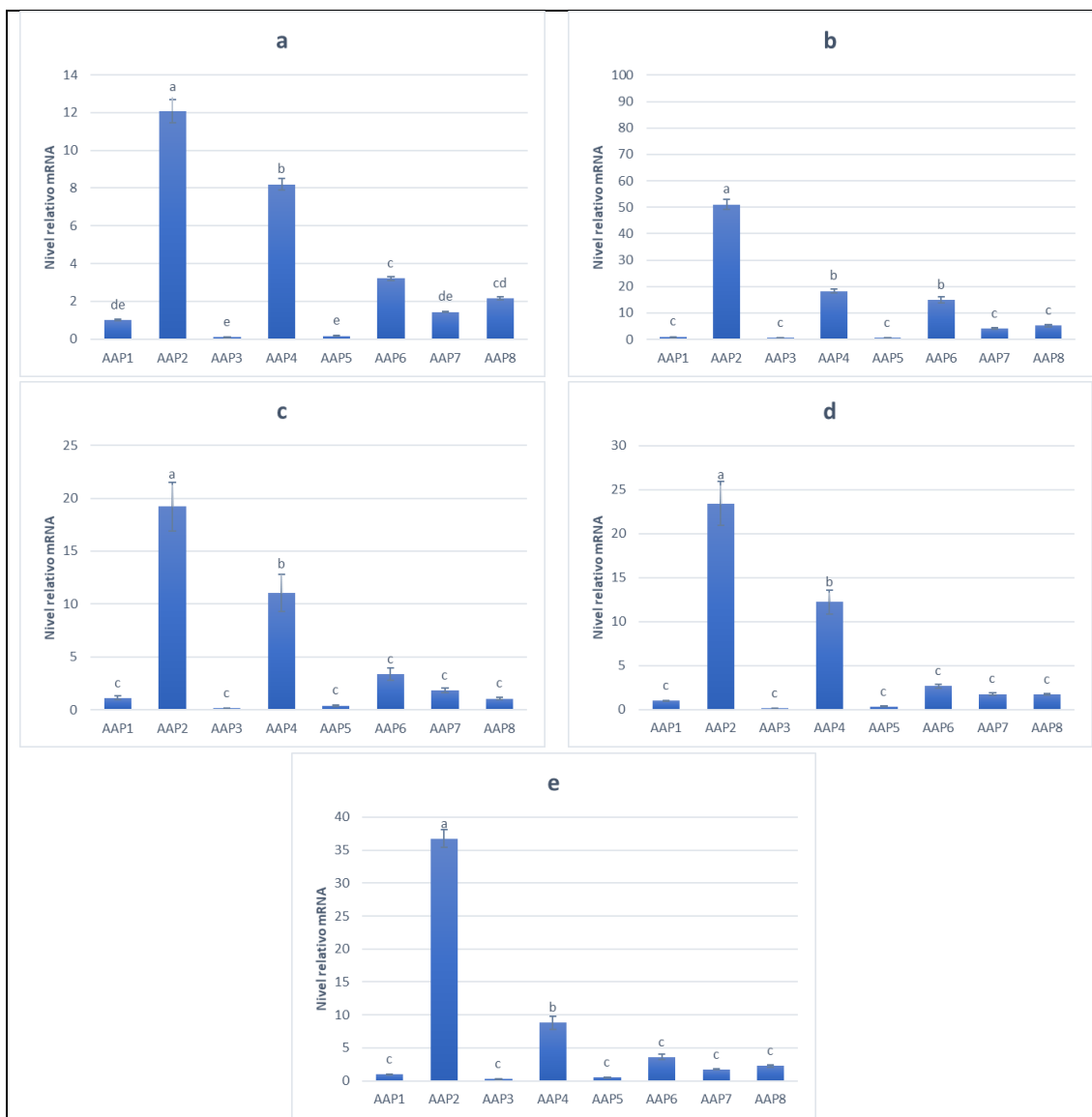
Para identificar diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados entre accesiones y niveles de aporte de nitrógeno, se analizaron los datos mediante análisis por ANOVA simple y múltiple (si procede) con el programa Statgraphics Centurion 18 Version 18.1.13 (64-bit). La separación de medias se realizó mediante el LSD (*least significant difference*) ( $P < 0.05$ ). También se realizó un análisis de componentes principales (PCA) mediante el mismo programa Statgraphics.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Identificación de permeasas de la familia AAP implicadas en la carga de aminoácidos en el floema de tomate. Variabilidad entre cultivares

Estudios previos en otras especies han indicado que las permeasas de la familia AAP tienen una función principal en la regulación de la partición de aminoácidos en plantas (Okumoto et al., 2002; Tegeder y Rentsch, 2010). Para identificar aquellas AAPs de tomate implicadas en la carga de aminoácidos desde las hojas fuente al floema se ha realizado un análisis por RT-qPCR en diferentes accesiones de tomate de producción y NUE contrastante, muestreadas durante el periodo reproductivo. Los resultados obtenidos (Figura 5) muestran que, en todas ellas, las permeasas más expresadas en las hojas son la AAP2 y la AAP4, y en menor medida la AAP6. Este hecho permite sugerir que AAP2 y AAP4 podrían tener un papel relevante en la carga de aminoácidos desde las hojas para suministrar nitrógeno asimilado a los diferentes sumideros. Destacar que este comportamiento se produce también en la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (To-937; Figura 5b).

En otras especies, también se ha relacionado esta familia de permeasas con la carga de aminoácidos al floema desde la hoja. En *Arabidopsis*, por ejemplo, se han detectado elevados niveles de expresión en hoja de AAP5, AAP2, AAP6, AAP3 y AAP7 (Chen et al. 2021). De hecho, en mutantes para *AtAAP2*, se ha visto una reducción de entre el 20 y el 25% de aminoácidos (con respecto a las *wild type*) en el floema exudado por las hojas (Zhang et al., 2010). Esta reducción de aminoácidos puede llegar a ser de hasta del 63% durante la fase reproductiva, en mutantes para *AtAAP8* (Santiago y Tegeder, 2016). En otras especies, como *Nicotiana tabacum* distintos genes AAP6 y AAP3 se vieron expresado en hojas, relacionándolos con la carga del floema, pero también se detectaron en otros tejidos como la raíz y el tallo. La expresión *NtAAP3-6* y *NtAAP3-7*, por ejemplo, fue mayor en flores durante el desarrollo floral, por lo que los autores plantean que, además de su papel en la carga al floema, *NtAAP3* participe también en la descarga en sumideros (Zhao et al. 2017).



**Figura 5. Niveles de expresión de los genes AAP1-8 en hoja joven madura de las distintas variedades de tomate y la accesión To-937 de *S. pimpinellifolium*, cultivado con nivel de aporte de nitrógeno suficiente (8 mM).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de MM a 8 mM. Las barras representan el error medio  $\pm$ ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). a, tomate comercial Moneymaker (MM); b, accesión To-937 de *S. pimpinellifolium* (PI); c, tomate tipo cagón BVG 3132 (CV32); d, tomate tipo cuarenteno BVG 12570 (CV70); e, tomate pequeño de colgar BVG 5482 (CV82).

Para profundizar en la caracterización de la función de la familia AAP de tomate, se han comparado las homologías de secuencias con los 8 AAPs descritos en Arabidopsis. El análisis de sintenia agrupa los genes AAP como se muestra en la Tabla 3.

Este análisis muestra la alta similitud de la secuencia aminoacídica entre el gen *SIAAP4* con *AtAAP8*, cuyo análisis funcional ha mostrado un papel fundamental en la carga de aminoácidos en esta especie (Tegeder, 2016). Lo mismo ocurre con *SIAAP2*, relacionado con *AtAAP3* y *AtAAP5* que presentan también niveles de expresión elevados en hoja (Chen et al. 2021).

**Tabla 3. Parejas sinténicas de los genes AAPs entre *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*.**

Modificado de Alzharani, (2021).

<b>Asignación numérica <i>Solanum lycopersicum</i></b>	<b>Asignación numérica <i>Arabidopsis thaliana</i></b>
<i>SIAAP4</i>	<i>AtAAP8</i>
<i>SIAAP4</i>	<i>AtAAP1</i>
<i>SIAAP2</i>	<i>AtAAP3</i>
<i>SIAAP2</i>	<i>AtAAP5</i>
<i>SIAAP8</i>	<i>AtAAP8</i>
<i>SIAAP8</i>	<i>AtAAP6</i>

Para confirmar el papel de las permeasas de tomate en la carga del floema desde las hojas, especialmente *AAP2* y *AAP4*, en el laboratorio se están generando mutantes para cada uno de los genes por CRISPR-Cas. La caracterización funcional de estos mutantes permitirá establecer la relevancia de estas permeasas independientemente, infiriéndose el papel de cada una de ellas en la carga de aminoácidos. No obstante, hay que tener en cuenta que, en determinadas circunstancias de disfuncionalidad de una de ellas, su papel pueda ser substituido por otra, como se ha descrito en Grant et al. (2021).

#### 4.2. Efecto de la disminución del aporte de nitrógeno sobre la expresión de las AAPs en hoja madura. Variabilidad entre cultivares.

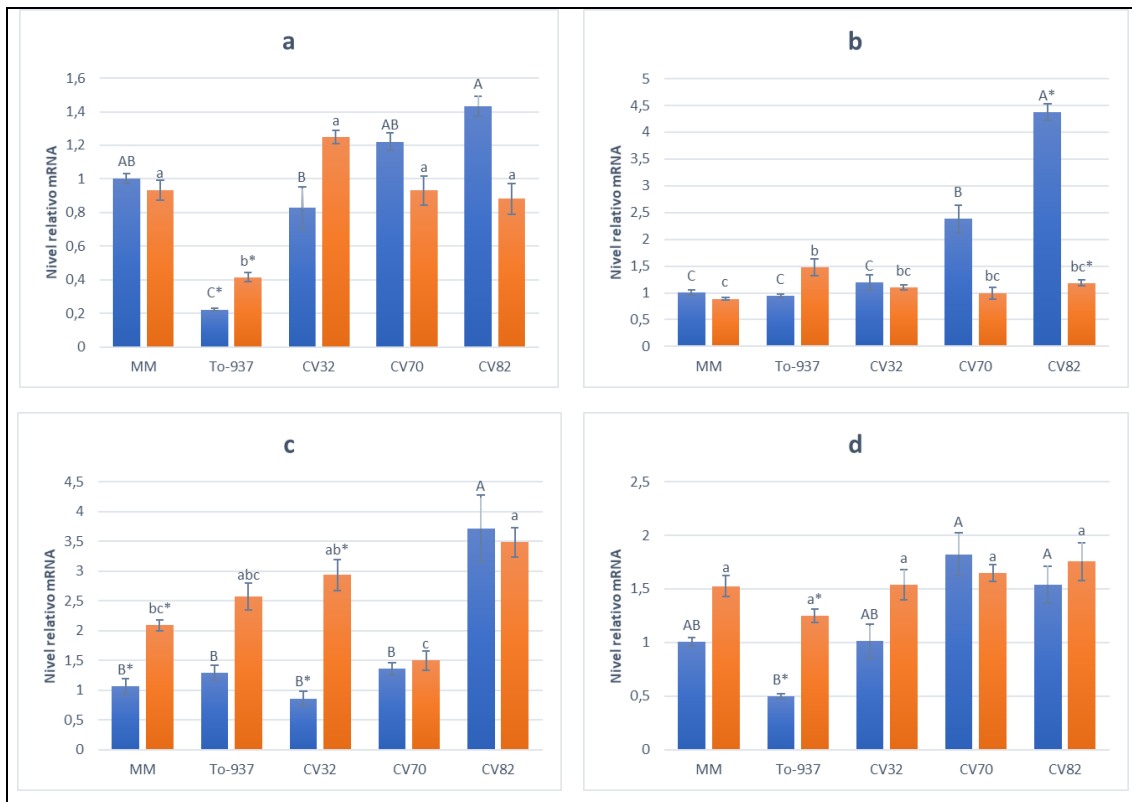
Desde la revolución verde del siglo pasado, la producción agrícola se ha basado en la aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados (Khush,1999). Aunque se ha incrementado significativamente la producción, este sobreuso también ha provocado problemas graves de contaminación medioambiental (Khush,1999; Liu et al.,2022). Las directrices actuales de sostenibilidad en los cultivos están requiriendo el desarrollo de una agricultura con un menor aporte de fertilizantes, especialmente los nitrogenados (Real Decreto 1051/2022). Sin embargo, en tomate se ha descrito que la limitación en el aporte de nitrógeno produce una disminución de la producción de fruto, así como la reducción de componentes nitrogenados en este (Renau-Morata et al., 2021). Por este motivo, es imprescindible desarrollar variedades con una mejor eficiencia de uso del nitrógeno (Li et al., 2017).

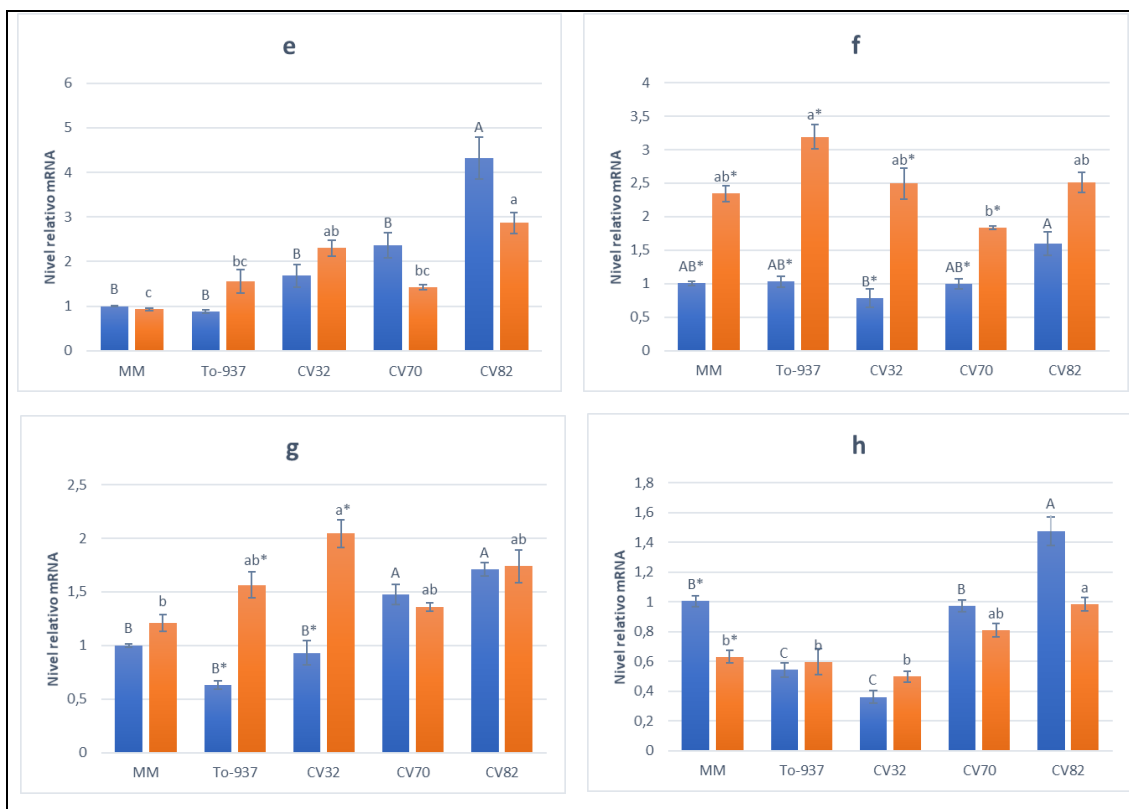
En este trabajo, hemos analizado el efecto de la disminución en los niveles de fertilización nitrogenada sobre la expresión de las permeasas en hojas maduras (Figura 6). Las dosis limitantes en el ensayo corresponden a un 50% del aporte suficiente para las condiciones del cultivo (Renau-Morata et al., 2021). En general, se observa un efecto significativo, tanto de la variedad como del nivel de aporte nitrógeno en la expresión de estas permeasas. Sin embargo, en las permeasas *AAP1* y *AAP5* sólo se observó efecto de la variedad, y en *AAP6*, un efecto únicamente del nivel de nitrógeno (ANEXO II).

Centrándonos en *AAP2* (Figura 6b), una de las permeasas más expresadas en hojas, se detecta claramente una mayor expresión en CV82 seguida de CV70, pero al limitar el N no se aprecian

diferencias entre las variedades, siendo la única disminución de la expresión significativa en CV82. *AAP4* (Figura 6d), por su parte, no presenta esta distinción tan clara entre cultivares, únicamente To-937 (accesión de *S. pimpinellifolium*) presenta una menor expresión en condiciones no limitantes de N, produciéndose un aumento significativo al limitarlo. En cambio, el patrón de expresión de *AAP6* sí es de gran interés (Figura 6f), pues en todas las variedades presenta un comportamiento común, aumentando su expresión en condiciones de aporte de nitrógeno limitadas. Esto sugiere que *AAP6* sea una permeasa de alta afinidad que se active en estas condiciones. De hecho, aunque no se conoce su homología en tomate, *AAP6* en *Arabidopsis* se ha caracterizado como permeasa de alta afinidad al localizarse en el parénquima xilemático como responsable del transporte directo del xilema (menor contenido de aminoácidos) al floema (mayor contenido de aminoácidos). Es decir, que, incluso en condiciones de cultivo no limitantes, su presencia también se asocia a tejidos con baja concentración de aminoácidos (Okumoto et al., 2002). Como particularidad, *AAP6* es, además, la única permeasa que ve aumentada su expresión al limitar el N en CV70 y CV82 (aunque no de forma significativa en este último caso). El resto de permeasa en estas accesiones, mantienen o disminuyen la expresión.

La respuesta de las AAPs ante deficiencias de nitrógeno también se ha estudiado en otras especies como soja y *Arabidopsis*, en las que se produjo un aumento de *GmAAP6* en raíz y hoja (Liu et al., 2020). En *Nicotiana tabacum*, se ha propuesto un papel relevante de *NtAAP2* en condiciones de déficit de N (Zhao et al, 2017). Se observó un amarillamiento temprano de las hojas en mutantes por ARN interferente respecto a las *wild-type*, ante el déficit de nitrógeno, mientras que en sobreexpresoras, en cambio, las hojas se mantuvieron verdes y con un correcto crecimiento incluso tras tres semanas de tratamiento (Zhao et al. 2017).





**Figura 6. Niveles de expresión de las permeasas AAP1-8 en hoja joven de las distintas accesiones estudiadas de tomate, en las diferentes condiciones de aporte de N ensayada.**

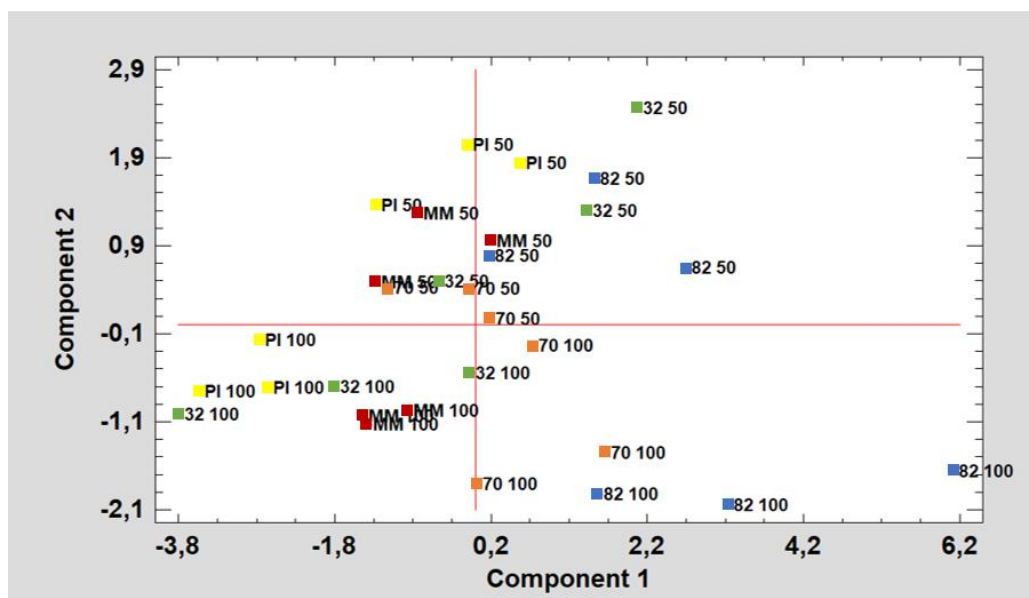
En azul se presentan los resultados de hoja joven para un nivel de aporte de N suficiente (8mM) y en naranja para limitante(4mM). La expresión de cada gen se ha normalizado el valor de expresión de MM a 8 mM N. Las barras representan el error medio  $\pm$ ES. Para cada nivel de aporte de nitrógeno, letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). En cada genotipo y gen, un asterisco indica diferencias por efecto del nivel de N ( $P < 0.05$ ). a, AAP1; b, AAP2; c, AAP3; d, AAP4; e, AAP5; f, AAP6; g, AAP7; h, AAP8. MM, tomate comercial MoneyMaker; To-937, accesión de *S. pimpinellifolium*; CV32, tomate tipo cagón, BVG 3132; CV70, de tipo cuarenteno accesión BVG 12570; CV82, tomate pequeño de colgar accesión BVG 5482.

A la vista de los resultados obtenidos, *AAP6* en *Solanum lycopersicum* también podría ser un buen candidato como permeasa implicada en las respuestas al déficit de nitrógeno. Además, en el laboratorio se están realizando análisis metabolómicos de las hojas y los frutos de los genotipos estudiados para poder determinar si los cambios en la expresión entre genotipos y por efecto del aporte de nitrógeno están relacionados con diferencias en los niveles de aminoácidos.

Con el fin de identificar patrones comunes en los cultivares en función de la expresión de las AAPs y sus respuestas a los niveles de N, se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA). Las dos primeras componentes principales explican un 73,973% de la variación observada, contribuyendo el componente 1 y 2 con 53,839% y 20,133%, respectivamente. La tercera componente explica un 10,118% adicional de la variación, aumentando el total a 84,091% (Figura 7).

En el gráfico que incluye las componentes 1 y 2 (Figura 7) se observan dos grupos claramente separados en función del nivel de aporte de nitrógeno. Cuando se cultiva con un aporte de nitrógeno limitado (4mM N) los cultivares se agrupan en la parte positiva de la componente 2. Dicha componente se relaciona positivamente con una mayor expresión de la AAP6 y negativamente con la expresión de la AAP2. La parte negativa de la componente 2, por su parte, agrupa el cultivo con un aporte completo de nitrógeno (8mM N). La relación con la expresión de las permeasas, por lo tanto, es la inversa a la anteriormente descrita: una mayor expresión en general de AAP2 y menor de AAP6, lo cual es especialmente notable en los cultivares CV70 y CV82.

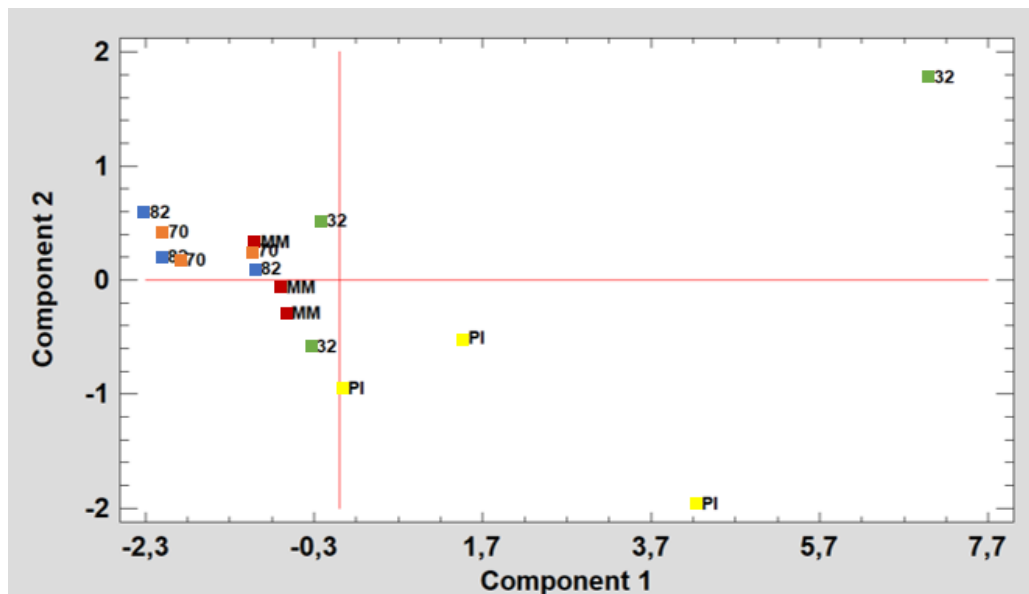
Por otra parte, la componente 1 es la que mejor separa los cultivares, y está relacionada positivamente con todas las permeasas. De esta forma, se aprecia una mayor expresión en general de las permeasas en los cultivares CV70 y CV82, sobre todo en condiciones de aporte completo de nitrógeno. Por el contrario, MM y To-937 (PI), presentan una menor expresión, mientras que CV32 tiene una gran variabilidad entre réplicas, aunque en general la expresión también es más baja.



**Figura 7. Análisis de componentes principales a partir de los niveles de expresión de las AAP1-8 en hoja joven de los distintos cultivares de tomate en dos condiciones de cultivo distintas (100, 8mM N; 50, 4mM N).**

MM, tomate comercial Moneymaker; PI, accesión de *S. pimpinellifolium* To-937; 32, tomate tipo cagón, BVG 3132; 70, de tipo cuarenteno accesión BVG 12570; 82, tomate pequeño de colgar accesión BVG 5482.

Además del nivel de expresión de las permeasas, es importante destacar el cambio en los niveles de expresión entre las dos condiciones de cultivo. Para ello se han calculado las diferencias como el porcentaje de expresión de las permeasas en aporte limitado de nitrógeno respecto a la expresión en aporte completo. En el PCA obtenido a partir de estos resultados, las dos componentes principales explican un 89,634% de la variación observada, contribuyendo el componente 1 y 2 con 81,003% y 8,631%, respectivamente (Figura 8).



**Figura 8. Análisis de componentes principales a partir del porcentaje de cambio de expresión (aporte de nitrógeno 4mM respecto a 8mM) de las AAP1-8, en hoja de todos los cultivares de tomate estudiados.**

MM, tomate comercial MoneyMaker; PI, accesión de *S. pimpinellifolium* To-937; 32, tomate tipo cagón, BVG3132; 70, de tipo cuarenteno accesión BVG 12570; 82, tomate pequeño de colgar accesión BVG 5482.

El genotipo silvestre es el que presenta un mayor valor positivo de la componente 1, que está correlacionada positivamente con un elevado porcentaje de expresión, respecto al control, de las permeasas al bajar el aporte de N, indicando un incremento en la expresión de éstas. Los cultivares CV70 y CV82 son aquellos que muestran un menor porcentaje de expresión respecto al control, indicando una disminución de la expresión de las permeasas cuando hay déficit de N. Por su parte, CV32 muestra una gran variabilidad entre réplicas.

Utilizando también el porcentaje de expresión de las permeasas en aporte limitado de nitrógeno respecto a la expresión en aporte completo, se ha realizado un análisis de correlaciones entre todas las permeasas. Se observa que las correlaciones son muy elevadas entre la gran mayoría de las permeasas, con la excepción de AAP3 y AAP8, que no se correlaciona con ninguna otra permeasa, ni entre ellas. Hay que tener en cuenta que se trata de dos permeasas que no destacan por su nivel de expresión en ninguno de los tejidos estudiados. Entre las restantes permeasas (AAP1-2, AAP4-7) existe una correlación positiva muy elevada a nivel varietal, por lo que aquellas variedades que presentan una mayor variación de una de estas permeasas frente al cambio en el aporte de N, presentan también gran variación en las otras permeasas. Es decir, se está dando un patrón uniforme de variación de permeasa.

Esta respuesta uniforme para la cuantía de la expresión de estos genes al variar el N puede ser muy interesante a nivel de mejora, detectando variedades con una respuesta relevante al N en la mayoría de permeasas. Además, se podría hipotetizar que todas ellas (AAP1-2, AAP4-7), puedan estar reguladas en la respuesta al N por un mismo factor. Para elucidar si esto es realmente cierto, serán necesarios estudios funcionales y moleculares adicionales.

Por lo tanto, en cuanto a la reducción del aporte del N, destaca la mayor expresión de AAP6 en todos los cultivares ante estas condiciones, así como la agrupación de los cultivares en dos grupos: CV70 y CV82 por una parte y MM, To-937 y CV32 por otra. Por último, se ha detectado que en todas las variedades existe una respuesta conjunta de la mayoría de las permeasas a la disminución de N.

**Tabla 4. Correlaciones entre los porcentajes de variación de expresión de AAP1-8 en todas las variedades estudiadas.**

Significación estadística entre paréntesis.

	AAP1	AAP2	AAP3	AAP4	AAP5	AAP6	AAP7	AAP8
<b>AAP1</b>		0,9322 (0,0210)	0,6864 (0,2006)	0,8832 (0,0471)	0,9866 (0,0019)	0,9486 (0,0139)	0,984 (0,0024)	0,786 (0,1150)
<b>AAP2</b>	0,9322 (0,0210)		0,5416 (0,3458)	0,9571 (0,0106)	0,9477 (0,0142)	0,8685 (0,0561)	0,8777 (0,0504)	0,5222 (0,3667)
<b>AAP3</b>	0,6864 (0,2006)	0,5416 (0,3458)		0,3938 (0,5119)	0,6513 (0,2338)	0,8731 (0,0532)	0,7243 (0,1664)	0,8111 (0,0957)
<b>AAP4</b>	0,8832 (0,0471)	0,9571 (0,0106)	0,3938 (0,5119)		0,9351 (0,0197)	0,7616 (0,1346)	0,8565 (0,0638)	0,4216 (0,4796)
<b>AAP5</b>	0,9866 (0,0019)	0,9477 (0,0142)	0,6513 (0,2338)	0,9351 (0,0197)		0,9252 (0,0243)	0,9819 (0,0029)	0,711 (0,1782)
<b>AAP6</b>	0,9486 (0,0139)	0,8685 (0,0561)	0,8731 (0,0532)	0,7616 (0,1346)	0,9252 (0,0243)		0,9422 (0,0165)	0,8278 (0,0835)
<b>AAP7</b>	0,984 (0,0024)	0,8777 (0,0504)	0,7243 (0,1664)	0,8565 (0,0638)	0,9819 (0,0029)	0,9422 (0,0165)		0,8244 (0,0860)
<b>AAP8</b>	0,786 (0,1150)	0,5222 (0,3667)	0,8111 (0,0957)	0,4216 (0,4796)	0,711 (0,1782)	0,8278 (0,0835)	0,8244 (0,0860)	

#### 4.3. Relación entre la carga de aminoácidos en el floema por las distintas permeasas y la producción de fruto.

Para determinar si la expresión de las AAPs en hojas está relacionada con la capacidad de la planta de producción de cosecha, se han obtenido las correlaciones lineales entre parámetros de producción, como son la cosecha total, el número de frutos y el tamaño medio de fruto, con la expresión de las diferentes AAPs (Tabla 5), tanto en condiciones de aporte completo de N (8 mM) como limitante (4 mM).

En cuanto al número de frutos, no se ha detectado ninguna relación entre la expresión de las AAPs en hojas, aunque sí existe correlación negativa con la producción (AAP3 y AAP6) y el tamaño de fruto (AAP6), sólo en condiciones de nitrógeno limitante. Son de especial interés las correlaciones significativas de AAP6, pues son coherentes con los resultados descritos en el punto 4.2 en los que se describe que AAP6 es la única permeasa que aumenta su expresión en todas las variedades estudiadas en condiciones de baja fertilización nitrogenada. Estas correlaciones apoyarían la hipótesis de que AAP6 en *Solanum lycopersicum* fuera una permeasa de alta afinidad cuya expresión se activase para asegurar la carga de aminoácidos al floema cuando la concentración de nitrógeno (y por ende aminoácidos) es baja.



**Tabla 5. Valores de correlación entre los parámetros indicados y las permeasas AAP1-8 en los cultivares de tomate MM, CV32, CV70 y CV82.**

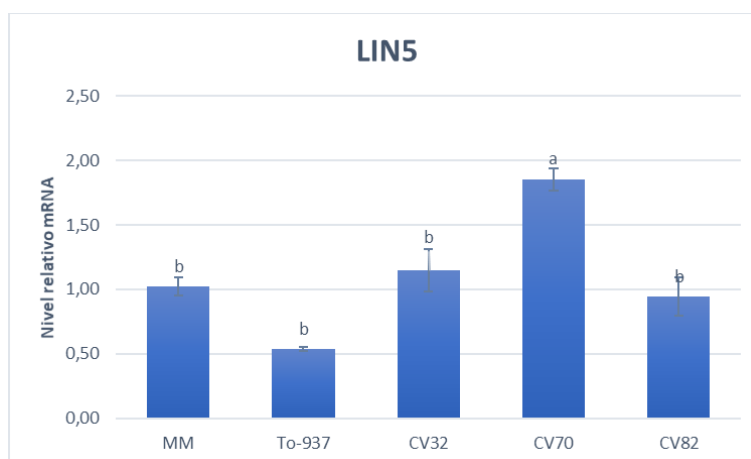
Significación estadística entre paréntesis. N, condición de cultivo respecto al nitrógeno; 100, 8 mM; 50, 4 mM.

N	Parámetro	AAP1	AAP2	AAP3	AAP4	AAP5	AAP6	AAP7	AAP8
100	<b>Producción</b>	-0,0111 (0,9889)	-0,2689 (0,7311)	-0,4844 (0,5156)	0,537 (0,463)	-0,3332 (0,6668)	-0,4322 (0,5678)	0,0376 (0,9624)	-0,1358 (0,8642)
	<b>Número frutos</b>	-0,6161 (0,3839)	-0,3163 (0,6837)	-0,157 (0,843)	-0,8199 (0,1801)	-0,2001 (0,7999)	-0,2539 (0,7461)	-0,5934 (0,4066)	-0,5506 (0,4494)
	<b>Tamaño medio de fruto</b>	0,2491 (0,7509)	0,0115 (0,9885)	-0,2281 (0,7719)	0,7526 (0,2474)	-0,0547 (0,9453)	-0,1909 (0,8091)	0,3126 (0,6874)	0,0698 (0,9302)
50	<b>Producción</b>	-0,4197 (0,5803)	-0,6652 (0,3348)	-0,9542 <b>(0,0458)</b>	-0,0813 (0,9187)	-0,7435 (0,2565)	-0,962 <b>(0,038)</b>	-0,7668 (0,2332)	0,0945 (0,9055)
	<b>Número frutos</b>	0,6262 (0,3738)	0,4622 (0,5378)	0,8102 (0,1898)	-0,2362 (0,7638)	0,5442 (0,4558)	0,9425 (0,0575)	0,7459 (0,2541)	-0,404 (0,596)
	<b>Tamaño medio de fruto</b>	-0,3762 (0,6238)	-0,4064 (0,5936)	-0,85 (0,15)	0,126 (0,874)	-0,5079 (0,4921)	-0,9972 <b>(0,0028)</b>	-0,5729 (0,4271)	0,2308 (0,7692)

En condiciones no limitantes de nitrógeno, no se observa correlación de la producción con ninguna permeasa, lo que indicaría que no hay relación directa entre la disponibilidad de aminoácidos en el floema y la captación de aminoácidos desde el fruto. De hecho, en la actualidad, se plantea que la captación de aminoácidos en el fruto no esté regulada por las fuentes, sino desde los sumideros. Aun así, hay que tener en cuenta que no se ha estudiado si la producción de fotoasimilados es igual entre accesiones. Asimismo, una vez exportados al floema, la partición de aminoácidos a las distintas partes de la planta podría variar mucho entre genotipos, incluso dirigiéndose a sumideros alternativos. También es de interés estudiar los aminoácidos concretos presentes en los frutos de cada una de las accesiones, pues diferencias en la expresión de las AAPs entre las accesiones podrían explicarse por su diferente composición de aminoácidos. A su vez, correlacionar estos dos parámetros, la expresión de las AAPs y la concentración de los distintos aminoácidos en fruto, podría aportar información sobre qué aminoácidos son transportados por cada permeasa.

La falta de correlación entre la expresión de las permeasas encargadas de la carga de aminoácidos con la producción de fruto en accesiones de tomate puede indicar, entre otras opciones, que el flujo de aminoácidos hacia el fruto esté dirigido por el flujo de azúcares. La descarga activa de azúcares en el fruto, mediante distintos transportadores, según el mecanismo descrito por Münch (Azcón-Bieto y Talón, 2008), provocaría el movimiento neto de agua, que generaría un arrastre significativo de aminoácidos al fruto. Para comprobar esta hipótesis, se ha analizado la expresión de la invertasa LIN5 en el fruto. Se trata de una invertasa apoplástica que hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa (Fridman y Zamir, 2003; Azcón-Bieto y Talón, 2008), y que ya ha sido relacionada previamente con la fuerza de sumidero del fruto de tomate (Godt y Roitsch, 1997; Renau-Morata et al., 2020).

Los resultados obtenidos (Figura 6) apoyarían la hipótesis planteada al ser mayor la expresión de *LIN5* en las accesiones de mayor producción como CV70. En las de menor producción, en cambio, los niveles de *LIN5* son menores. En estos casos, como To-937, una mayor expresión y actividad de las AAPs podrían actuar supliendo activamente esta menor entrada de aminoácidos por arrastre. Estos datos preliminares no permiten establecer inequívocamente la relación de estas permeasas con la cosecha total, o el tamaño de fruto. Un análisis funcional de mutantes de estas permeasas, junto con el de genes reguladores de la partición de azúcares permitirán abordar esta cuestión. Estos trabajos se están desarrollando en el laboratorio.

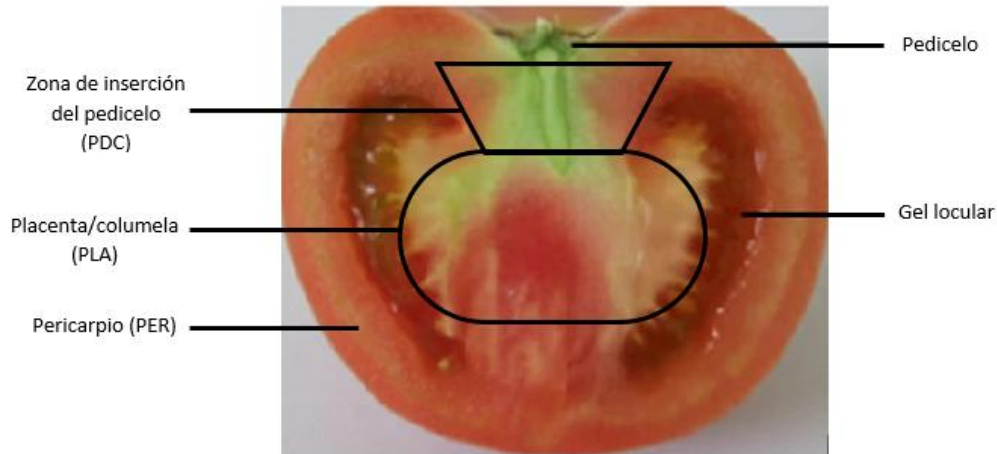


**Figura 9. Niveles de expresión de *LIN5* en fruto de distintas variedades de tomate, cultivado con nivel de aporte de nitrógeno suficiente (8 mM).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de MM. Las barras representan el error medio  $\pm$ ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). MM, tomate comercial MoneyMaker; To-937, accesión de *S. pimpinellifolium*; CV32, tomate tipo cagón, BVG 3132; CV70, de tipo cuarenteno accesión BVG 12570; CV82, tomate pequeño de colgar accesión BVG 5482.

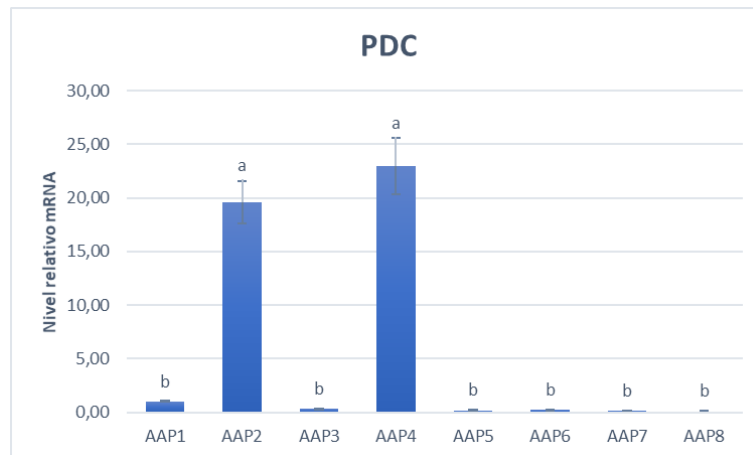
#### 4.4. Actividad de las permeasas AAPs en distintas zonas de descarga en el fruto de tomate.

Estudios previos sobre la descarga de fotoasimilados en fruto de tomate han sido enfocados principalmente al flujo de azúcares durante su crecimiento y desarrollo (Ho, 1996; Koch, 2004; Okello et al, 2015; Smith et al., 2018; Renau-Morata et al., 2020). Se ha sugerido que durante los primeros estadios del desarrollo se produce una descarga simplástica de azúcares al fruto, que cambia a apoplástica cuando el fruto inicia su fase lineal de crecimiento. En esta fase, se ha descrito que la invertasa de la pared de las células del fruto degrade la sacarosa a hexosas y estas atraviesen la membrana plasmática mediante transportadores específicos (Dali et al., 1992). Asumiendo este tipo de descarga apoplástica, la entrada de aminoácidos en las células del fruto debe estar regulada por la acción de las permeasas. Para determinar la participación de transportadores AAPs en la descarga de fruto, hemos analizado por RT-qPCR la expresión de las 8 AAPs en fruto en crecimiento de tomate *MoneyMaker*. Además, para conocer mejor los puntos donde se produce esta descarga en el fruto, se han analizado estas expresiones en distintas partes de fruto (Figura 10), concretamente la zona de inserción del pedicelo (PDC), en la zona del pericarpio (PER) y en la zona de la placenta/columela (PLA) (Figuras 11, 12 y 13).



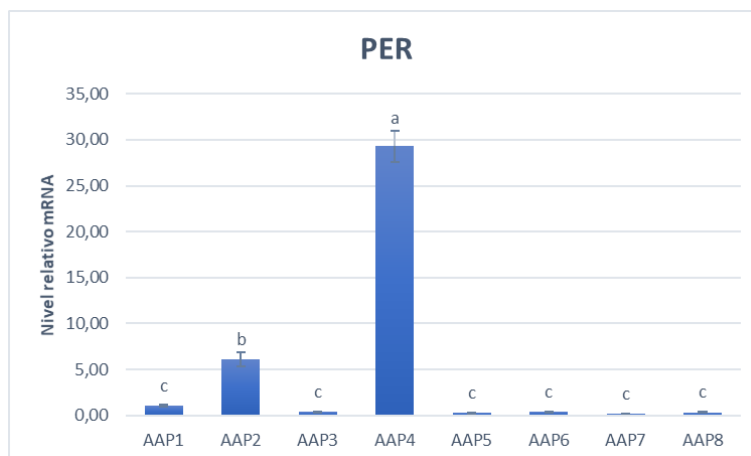
**Figura 10. Corte longitudinal de tomate mostrando las distintas partes del fruto.**  
Modificado de Liu et al., (2021).

Los resultados muestran niveles de expresión similares en las diferentes partes ensayadas del fruto (Figuras 11-13). Estos datos sugieren que se produzca una descarga apoplástica de aminoácidos en todo el fruto desde los haces vasculares que se desarrollan por todo el órgano. En este estado de desarrollo del fruto (10-15 DDA), esta descarga debe estar más asociada a los requerimientos para el crecimiento de todas las estructuras que se están generando, que a los aminoácidos que se acumulan en fruto maduro relacionados con la calidad. Por lo tanto, en el crecimiento estructural del fruto, los principales moduladores de la entrada de aminoácidos parecen ser *AAP2* y *AAP4* cuyo nivel de expresión es muy alto en todas las zonas designadas del fruto (Figura 11, 12, 13).



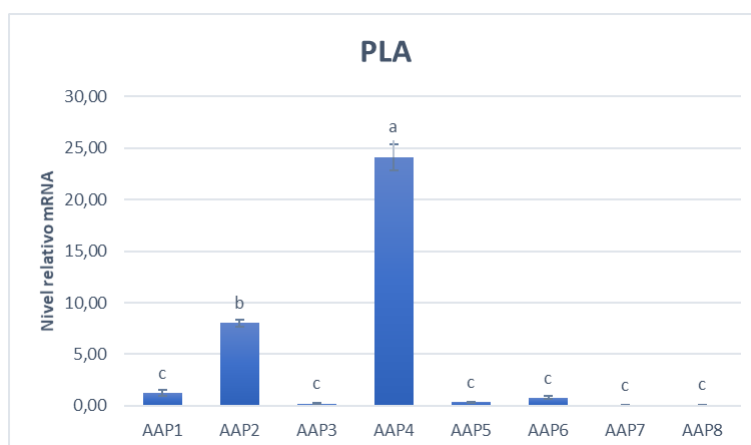
**Figura 11. Niveles de expresión de *AAP1-8* de la zona de inserción del pedicelo (PDC) del tomate comercial Moneymaker para un nivel de aporte de N suficiente (8mM).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de *AAP1* correspondiente siguiendo el método de Livak y Schmittgen, 2001. Las barras representan el error medio  $\pm$ ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 12. Niveles de expresión de AAP1-8 del pericarpio (PER) del tomate comercial Moneymaker para un nivel de aporte de N suficiente (8mM).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de AAP1 correspondiente siguiendo el método de Livak y Schmittgen, 2001. Las barras representan el error medio  $\pm$ ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 13. Niveles de expresión de AAP1-8 de la placenta (PLA) del tomate comercial Moneymaker para un nivel de aporte de N suficiente (8mM).**

La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de AAP1 correspondiente siguiendo el método de Livak y Schmittgen, 2001. Las barras representan el error medio  $\pm$ ES. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Como ya se ha adelantado, existe escasa información de la expresión de AAPs en frutos carnosos. Por este motivo es muy relevante en estudio de Shi et al. (2019), en *Citrullus lanatus* (sandía), como único en frutos de este tipo. Este trabajo relacionó CIAAP3 y CIAAP6 con el desarrollo del fruto en distintos estados de crecimiento. La mayor expresión de CIAAP6 se detectó en los frutos inmaduros (10 DAA), mientras que la de CIAAP3 en frutos maduros (20-30 DAA). En el presente trabajo, en cambio, se ha analizado la expresión en frutos inmaduros, por lo que sería interesante realizar este mismo análisis de expresión en tomates maduros con el objeto de identificar un cambio en el patrón de expresión de las permeasas asociado a la

acumulación de aminoácidos relacionados con la calidad organoléptica del fruto. Futuros ensayos metabólicos en desarrollo permitirán establecer los aminoácidos que más se descargan en ambas fases de desarrollo.

Centrándonos de nuevo en los resultados obtenidos en tomate, cabe destacar que la expresión de *AAP2* es mucho mayor en la zona de inserción del pedicelo que en las demás, lo que parece ser el comportamiento general de las demás permeasas, con una mayor expresión en PDC, en ocasiones similar a la del PER, y una baja expresión en PLA. Dos permeasas se desvían claramente de esta tónica general: *AAP8*, con una expresión significativamente mayor en PER y *AAP6*, en la cual, aunque no existen diferencias significativas, su expresión en PLA parece ser más relevante (ANEXO III). Este patrón de expresión distinto sugiere un posible rol adicional en estas zonas. No obstante, no podemos olvidar que se trata de dos permeasas cuya expresión es muy baja en la visión general del conjunto de cada tejido.

La elevada descarga de aminoácidos en la zona de inserción del pedicelo, relacionada con la expresión de las permeasas, podría asociarse a que el desarrollo de esta zona sea crucial para mantener la estructura del fruto en estos estadios iniciales. Es más, se trata de una zona muy vascularizada, que en este momento del desarrollo requeriría un importante aporte de fotoasimilados. Otra posibilidad sería que esta descarga masiva de aminoácidos serviría para aportar los aminoácidos necesarios al gel locular, adyacente al PDC. En todo caso, futuros estudios son necesarios para determinar con certeza el transporte de aminoácidos en el interior del fruto del tomate.

Finalmente, remarcar el hecho de que las principales permeasas implicadas en la descarga de aminoácidos en fruto (*AAP2* y *AAP4*) son las mismas responsables de la carga del floema en hojas. Esto puede suponer una gran ventaja en la mejora de este cultivo pues, idealmente, se podrían mejorar ambos procesos mediante una estrategia de mejora enfocada a los mismos genes.

## 5. Conclusiones

1. Existe variación en el nivel de expresión en hoja de los genes que codifican las 8 permeasas estudiadas, siendo las permeasas *AAP2* y *AAP4* las que se expresan mayoritariamente en hoja, en todos los genotipos ensayados, lo que sugiere que estas permeasas son las que están mayormente implicadas en la carga floemática de la hoja de tomate.
2. Existe variabilidad genotípica para la expresión en hoja de las distintas permeasas que, en condiciones de cultivo óptimas, no está correlacionada con la producción. El transporte de aminoácidos al fruto depende de la fuerza de sumidero del mismo que parece estar más relacionada con el flujo de azúcares y agua, con el consecuente arrastre de aminoácidos.
3. La respuesta de la expresión génica de las distintas permeasas a la deficiencia de N presenta variabilidad, pudiendo incrementarse o disminuir su expresión en función de la permeasa y del genotipo. Hay que destacar la permeasa *AAP6* cuya expresión incrementa al disminuir el aporte de N en todos los genotipos ensayados.

4. Para la mayoría de permeasas, existe una correlación de los cambios de su expresión al disminuir el aporte de N, a nivel de variedad, de forma que hay genotipos en que la disminución de la fertilización nitrogenada conduce a un incremento general de la expresión de las permeasas (To-937), mientras que en otros se da una disminución de la expresión en estas condiciones (CV 82 y CV 70).

5. La mayor expresión de las permeasas *AAP2* y *AAP4* también en el fruto, señala que podrían ser también las principales implicadas en la descarga de aminoácidos desde el floema en este órgano.

6. En el estadio de desarrollo de fruto inmaduro, la mayor expresión de las permeasas tiene lugar en la zona de inserción del pedicelo, con la excepción de la *AAP6* y *AAP8* que podrían jugar un papel adicional en la placenta y el pericarpo respectivamente.

## 6. Referencias Bibliográficas

AZCÓN-BIETO, J., & TALÓN, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.

BAI, Y. L., & LINDHOUT, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? [Review]. *Annals of Botany*, 100(5), 1085-1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>

CHEN, L. S., & BUSH, D. R. (1997). LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis* [Article]. *Plant Physiology*, 115(3), 1127-1134. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.1127>

CHEN, Z. Y., ZHANG, Y. Y., ZHANG, J. T., FAN, B., ZHOU, Y., & CUI, X. Y. (2021). Expression of AtAAP Gene Family and Endosperm-Specific Expression of AtAAP1 Gene Promotes Amino Acid Absorption in *Arabidopsis thaliana* and Maize [Article]. *Agronomy-Basel*, 11(8), 17, Article 1668. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081668>

CONSORTIUM, T. G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution [Article]. *Nature*, 485(7400), 635-641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>

COUTURIER, J., DE FAY, E., FITZ, M., WIPF, D., BLAUDEZ, D., & CHALOT, M. (2010). PtAAP11, a high affinity amino acid transporter specifically expressed in differentiating xylem cells of poplar [Article]. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1671-1682. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq036>

DALI, N., MICHAUD, D., & YELLE, S. (1992). EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE IN THE PATHWAY OF SUGAR ACCUMULATION IN SUCROSE-ACCUMULATING TOMATO FRUITS [Article]. *Plant Physiology*, 99(2), 434-438. <https://doi.org/10.1104/pp.99.2.434>

FAO. (2021). World Food and Agriculture - Statistical Yearbook. In. Rome: FAO.

FENG, C. Y., HAN, J. X., HAN, X. X., & JIANG, J. (2015). Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato [Article]. *Gene*, 573(2), 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.055>

FISCHER, W. N., KWART, M., HUMMEL, S., & FROMMER, W. B. (1995). SUBSTRATE-SPECIFICITY AND EXPRESSION PROFILE OF AMINO-ACID TRANSPORTERS (AAPS) IN ARABIDOPSIS [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 270(27), 16315-16320. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.16315>

FRIDMAN, E., & ZAMIR, D. (2003). Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and Arabidopsis [Article]. *Plant Physiology*, 131(2), 603-609. <https://doi.org/10.1104/pp.014431>

FROMMER, W. B., HUMMEL, S., & RIESMEIER, J. W. (1993). EXPRESSION CLONING IN YEAST OF A CDNA-ENCODING A BROAD-SPECIFICITY AMINO-ACID PERMEASE FROM ARABIDOPSIS-THALIANA [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), 5944-5948. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.5944>

GERSZBERG, A., HNATUSZKO-KONKA, K., KOWALCZYK, T., & KONONOWICZ, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology [Review]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120(3), 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>

GODT, D. E., & ROITSCH, T. (1997). Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism [Article]. *Plant Physiology*, 115(1), 273-282. <https://doi.org/10.1104/pp.115.1.273>

GRALLATH, S., WEIMAR, T., MEYER, A., GUMY, C., SUTER-GROTEMEYER, M., NEUHAUS, J. M., & RENTSCH, D. (2005). The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns [Article]. *Plant Physiology*, 137(1), 117-126. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055079>

HAMMES, U. Z., NIELSEN, E., HONAAS, L. A., TAYLOR, C. G., & SCHACHTMAN, D. P. (2006). AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in Arabidopsis [Article]. *Plant Journal*, 48(3), 414-426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02880.x>

HO, L. C. (1996). The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato [Article; Proceedings Paper]. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1239-1243. [https://doi.org/10.1093/jxb/47.Special\\_Issue.1239](https://doi.org/10.1093/jxb/47.Special_Issue.1239)

HO, L. H., KLEMENS, P. A. W., NEUHAUS, H. E., KO, H. Y., HSIEH, S. Y., & GUO, W. J. (2019). SISWEET1a is involved in glucose import to young leaves in tomato plants [Article]. *Journal of Experimental Botany*, 70(12), 3241-3254. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz154>

HOAGLAND, D. R., & ARNON, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).

HOFFMAN, N. E., KO, K., MILKOWSKI, D., & PICHERSKY, E. (1991). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TOMATO CDNA AND GENOMIC CLONES ENCODING THE UBIQUITIN GENE UBI3 [Article]. *Plant Molecular Biology*, 17(6), 1189-1201. <https://doi.org/10.1007/bf00028735>

HUNT, E., GATTOLIN, S., NEWBURY, H. J., BALE, J. S., TSENG, H. M., BARRETT, D. A., & PRITCHARD, J. (2010). A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the

- Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected [Article]. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 55-64. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp274>
- KALDENHOFF, R., & FISCHER, M. (2006). Functional aquaporin diversity in plants [Article; Proceedings Paper]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758(8), 1134-1141. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.012>
- KHUSH, G. S. (1999). Green revolution: preparing for the 21st century [Article; Proceedings Paper]. *Genome*, 42(4), 646-655. <https://doi.org/10.1139/gen-42-4-646>
- KLEE, H. J., & TIEMAN, D. M. (2013). Genetic challenges of flavor improvement in tomato [Review]. *Trends in Genetics*, 29(4), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.003>
- KO, H. Y., HO, L. H., NEUHAUS, H. E., & GUO, W. J. (2021). Transporter SISWEET15 unloads sucrose from phloem and seed coat for fruit and seed development in tomato [Article]. *Plant Physiology*, 187(4), 2230-2245. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab290>
- KOCH, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development [Review]. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235-246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- LEE, Y. H., FOSTER, J., CHEN, J., VOLL, L. M., WEBER, A. P. M., & TEGEDER, M. (2007). AAP1 transports uncharged amino acids into roots of Arabidopsis [Article]. *Plant Journal*, 50(2), 305-319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03045.x>
- LI, H., HU, B., & CHU, C. C. (2017). Nitrogen use efficiency in crops: lessons from Arabidopsis and rice [Review]. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2477-2488. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx101>
- LIU, J., LI, Z., & LI, P. (2021). The Physical and Mechanical Properties of Tomato Fruit and Stem. In *Rapid Damage-Free Robotic Harvesting of Tomatoes* (pp. 127-195). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-1284-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-16-1284-8_3)
- LIU, Q., WU, K., SONG, W. Z., ZHONG, N., WU, Y. Z., & FU, X. D. (2022). Improving Crop Nitrogen Use Efficiency Toward Sustainable Green Revolution [Review]. *Annual Review of Plant Biology*, 73, 523-551. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070121-015752>
- LIU, S., WANG, D., MEI, Y. Y., XIA, T. M., XU, W., ZHANG, Y. Q., . . . WANG, N. N. (2020). Overexpression of GmAAP6a enhances tolerance to low nitrogen and improves seed nitrogen status by optimizing amino acid partitioning in soybean [Article]. *Plant Biotechnology Journal*, 18(8), 1749-1762. <https://doi.org/10.1111/pbi.13338>
- LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C)</sup> method [Article]. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LLEBRÉS, M. T., CASTRO-RODRIGUEZ, V., PASCUAL, M. B., AVILA, C., & CANOVAS, F. M. (2022). The amino acid permease PpAAP1 mediates arginine transport in maritime pine [Article]. *Tree Physiology*, 42(1), 175-188. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpab089>



OKELLO, R. C. O., HEUVELINK, E., DE VISSER, P. H. B., STRUIK, P. C., & MARCELIS, L. F. M. (2015). What drives fruit growth? [Article]. *Functional Plant Biology*, 42(9), 817-827. <https://doi.org/10.1071/fp15060>

OKUMOTO, S., & PILOT, G. (2011). Amino Acid Export in Plants: A Missing Link in Nitrogen Cycling. *Molecular Plant*, 4(3), 453-463. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr003>

OKUMOTO, S., SCHMIDT, R., TEGEDER, M., FISCHER, W. N., RENTSCH, D., FROMMER, W. B., & KOCH, W. (2002). High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis* [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45338-45346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207730200>

OLAIYA, C. O., OGUNYEMI, O., & KARIGIDI, K. (2015). BIOTECHNOLOGICAL STRATEGIES FOR ENHANCING THE NUTRITIVE AND NUTRACEUTICAL VALUES OF TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICON*) [Review]. *Annals of the University Dunarea De Jos of Galati, Fascicle Vi-Food Technology*, 39(2), 9-19.

ORTIZ-LOPEZ, A., CHANG, H. C., & BUSH, D. R. (2000). Amino acid transporters in plants [Review]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1465(1-2), 275-280. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00144-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00144-9)

PERCHLIK, M., & TEGEDER, M. (2017). Improving Plant Nitrogen Use Efficiency through Alteration of Amino Acid Transport Processes [Article]. *Plant Physiology*, 175(1), 235-247. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00608>

PRATELLI, R., & PILOT, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants [Review]. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5535-5556. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru320>

Real Decreto 1051/2022, de 27 de diciembre, por el que se establecen normas para la nutrición sostenible en los suelos agrarios. *Boletín Oficial del Estado*, 312, de 29 de diciembre de 2022. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2022/12/27/1051/con>

RENAU-MORATA, B., CARRILLO, L., CEBOLLA-CORNEJO, J., MOLINA, R. V., MARTI, R., DOMINGUEZ-FIGUEROA, J., . . . NEBAUER, S. G. (2020). The targeted overexpression of SICDF4 in the fruit enhances tomato size and yield involving gibberellin signalling [Article]. *Scientific Reports*, 10(1), 14, Article 10645. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67537-x>

RENAU-MORATA, B., MOLINA, R. V., MINGUET, E. G., CEBOLLA-CORNEJO, J., CARRILLO, L., MARTI, R., . . . NEBAUER, S. G. (2021). Integrative Transcriptomic and Metabolomic Analysis at Organ Scale Reveals Gene Modules Involved in the Responses to Suboptimal Nitrogen Supply in Tomato [Article]. *Agronomy-Basel*, 11(7), 26, Article 1320. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071320>

RUIZ, J. M., ALBENTOSA, M., ALDEGUER, B., ÁLVAREZ-ROGEL, J., ANTÓN, J., BELANDO, M. D., . . . YEBRA, L. (2020). Informe de evolución y estado actual del Mar Menor en relación al proceso de eutrofización y sus causas. Informe de asesoramiento técnico del Instituto Español de Oceanografía (IEO). 165pp.

- SANDERS, A., COLLIER, R., TRETHERY, A., GOULD, G., SIEKER, R., & TEGEDER, M. (2009). AAP1 regulates import of amino acids into developing Arabidopsis embryos [Article]. *Plant Journal*, 59(4), 540-552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03890.x>
- SHI, T. R., JOSHI, V., JOSHI, M., VITHA, S., GIBBS, H., WANG, K. H., & OKUMOTO, S. (2019). Broad-Spectrum Amino Acid Transporters CIAAP3 and CIAAP6 Expressed in Watermelon Fruits [Article]. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 13, Article 5855. <https://doi.org/10.3390/ijms20235855>
- SMITH, M. R., RAO, I. M., & MERCHANT, A. (2018). Source-Sink Relationships in Crop Plants and Their Influence on Yield Development and Nutritional Quality [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 9, 10, Article 1889. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01889>
- SU, Y. H., FROMMER, W. B., & LUDEWIG, U. (2004). Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from Arabidopsis [Article]. *Plant Physiology*, 136(2), 3104-3113. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045278>
- SVENNERSTAM, H., GANETEG, U., & NASHOLM, T. (2008). Root uptake of cationic amino acids by Arabidopsis depends on functional expression of amino acid permease [Article]. *New Phytologist*, 180(3), 620-630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02589.x>
- TEGEDER, M. (2014). Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement [Review]. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1865-1878. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru012>
- TEGEDER, M., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use [Review]. *New Phytologist*, 217(1), 35-53. <https://doi.org/10.1111/nph.14876>
- TEGEDER, M., & RENTSCH, D. (2010). Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides [Review]. *Molecular Plant*, 3(6), 997-1011. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq047>
- UNITED NATIONS (s.f.). *Objetivos y Metas de Desarrollo Sostenible - Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- YAO, X. H., NIE, J., BAI, R. X., & SUI, X. L. (2020). Amino Acid Transporters in Plants: Identification and Function [Review]. *Plants-Basel*, 9(8), 17, Article 972. <https://doi.org/10.3390/plants9080972>
- ZHANG, L. Z., TAN, Q. M., LEE, R., TRETHERY, A., LEE, Y. H., & TEGEDER, M. (2010). Altered Xylem-Phloem Transfer of Amino Acids Affects Metabolism and Leads to Increased Seed Yield and Oil Content in Arabidopsis [Article]. *Plant Cell*, 22(11), 3603-3620. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073833>
- ZHAO, C., PRATELLI, R., YU, S., SHELLEY, B., COLLAKOVA, E., & PILOT, G. (2021). Detailed characterization of the UMAMIT proteins provides insight into their evolution, amino acid transport properties, and role in the plant [Article]. *Journal of Experimental Botany*, 72(18), 6400-6417. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab288>
- ZHAO, Y. Y., XU, Y. L., WANG, Z., ZHANG, J. F., CHEN, X., LI, Z. F., . . . WEI, F. (2017). Genome-wide identification and characterization of an amino acid permease gene family in *Nicotiana tabacum* [Article]. *Rsc Advances*, 7(60), 38081-38090. <https://doi.org/10.1039/c7ra05610a>

## 7. Anexos.

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

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

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

En la agricultura es muy habitual el uso de fertilizantes nitrogenados para aumentar la producción, pero su uso excesivo puede contaminar gravemente los suelos y el agua. Un ejemplo muy característico es la contaminación del Mar Menor, donde el excesivo uso de estos fertilizantes ha supuesto un aumento catastrófico de los niveles de nitrógeno en las aguas al aumentar, además, los cultivos de regadío. La sustitución de los cultivos de secano tradicionales por estos de regadío, debido a la agricultura intensiva de la zona, supone un aumento de nitratos y amonios en las aguas, pero también de fosfatos, así como la salinización de acuíferos. Este exceso de nitrógeno produce lo que se conoce como eutrofización, proceso por el cual aumenta la cantidad de fitoplancton, impidiendo el correcto paso de la luz. Su descomposición además produce la proliferación de bacterias que consumen el oxígeno necesario para otras especies aerobias del ecosistema. En definitiva, la consecuencia ambiental directa es la muerte de

muchas especies marinas, pero a nivel económico también se producen grandes pérdidas respecto al sector pesquero u otros dependientes de la zona (Ruiz et al., 2020).

Por todo esto, es necesario aplicar medidas que reduzcan esta contaminación de nitrógeno de las aguas y los suelos. Para ello una buena opción sería reducir las necesidades de este mineral por parte de la planta. De esta forma, se podría reducir e, idealmente, prescindir de estos fertilizantes sin verse afectada la producción. En este sentido, es fundamental entender los mecanismos subyacentes al transporte y partición del nitrógeno en la planta, así como el efecto de la disminución de nitrógeno en la expresión de sus transportadores.

Este trabajo, por lo tanto, tiene un grado de relación elevado con el ODS 14 (Vida submarina), concretamente a la meta 14.1 que hace referencia a ‘prevenir y reducir significativamente la contaminación marina de todo tipo, en particular la producida por actividades realizadas en tierra, incluidos los detritos marinos y la polución por nutrientes’. También se puede relacionar con el ODS 6 (Agua limpia y saneamiento), con la meta 6.6 ‘De aquí a 2020, proteger y restablecer los ecosistemas relacionados con el agua, incluidos los bosques, las montañas, los humedales, los ríos, los acuíferos y los lagos’.

Se relaciona además con el ODS 15 (Vida de ecosistemas terrestres) meta 15.1 ‘Para 2020, velar por la conservación, el restablecimiento y el uso sostenible de los ecosistemas terrestres y los ecosistemas interiores de agua dulce y los servicios que proporcionan, en particular los bosques, los humedales, las montañas y las zonas áridas, en consonancia con las obligaciones contraídas en virtud de acuerdos internacionales’ y con el ODS 12 (Producción y consumo responsable) meta 12.4 ‘De aquí a 2020, lograr la gestión ecológicamente racional de los productos químicos y de todos los desechos a lo largo de su ciclo de vida, de conformidad con los marcos internacionales convenidos, y reducir significativamente su liberación a la atmósfera, el agua y el suelo a fin de minimizar sus efectos adversos en la salud humana y el medio ambiente’.

En la agenda 2030, se plantean metas que cumplir antes de ese año, incluidos los comentados en el presente anexo. De hecho, a excepción de la primera (14.1) que se plantea para el 2025, todas las demás ya han alcanzado su fecha propuesta de 2020. A pesar de esto, la problemática sigue ocurriendo, por lo que es necesario seguir trabajando para su cumplimiento lo más pronto posible.

7.2. ANEXO II: ANOVA múltiple de los niveles de expresión de las AAP1-8 en hoja joven de las distintas variedades de tomate.

**Tabla S2:** Analysis of Variance for AAP1

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: VARIEDAD	2,7567	4	0,689176	12,66	0,0000
B: N	0,0265128	1	0,0265128	0,49	0,4933
INTERACTIONS					
AB	0,886601	4	0,22165	4,07	0,0142
RESIDUAL	1,08861	20	0,0544307		
TOTAL (CORRECTED)	4,75843	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S3:** Analysis of Variance for AAP2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: VARIEDAD	12,9649	4	3,24122	17,22	0,0000
B: N	5,44421	1	5,44421	28,93	0,0000
INTERACTIONS					
AB	13,1676	4	3,2919	17,49	0,0000
RESIDUAL	3,76375	20	0,188188		
TOTAL (CORRECTED)	35,3404	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S4:** Analysis of Variance for AAP3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: VARIEDAD	18,2946	4	4,57366	6,45	0,0017
B: N	5,55835	1	5,55835	7,84	0,0111
INTERACTIONS					
AB	5,07832	4	1,26958	1,79	0,1703
RESIDUAL	14,1767	20	0,708837		
TOTAL (CORRECTED)	43,108	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S5:** Analysis of Variance for AAP4

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: VARIEDAD	2,85298	4	0,713244	3,57	0,0236
B: N	1,01676	1	1,01676	5,09	0,0354
INTERACTIONS					
AB	0,764532	4	0,191133	0,96	0,4525
RESIDUAL	3,99532	20	0,199766		
TOTAL (CORRECTED)	8,62959	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S6:** Analysis of Variance for AAP5

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
<b>A: VARIEDAD</b>	25,2259	4	6,30649	9,9	<b>0,0001</b>
B: N	0,408909	1	0,408909	0,64	0,4324
INTERACTIONS					
AB	5,37244	4	1,34311	2,11	0,1176
RESIDUAL	12,7397	20	0,636983		
TOTAL (CORRECTED)	43,747	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S7:** Analysis of Variance for AAP6

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: VARIEDAD	2,09756	4	0,52439	2,33	0,0910
<b>B: N</b>	14,5806	1	14,5806	64,83	<b>0,0000</b>
INTERACTIONS					
AB	1,85865	4	0,464663	2,07	0,1235
RESIDUAL	4,49794	20	0,224897		
TOTAL (CORRECTED)	23,0347	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S8:** Analysis of Variance for AAP7

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
<b>A: VARIEDAD</b>	1,72143	4	0,430357	3,99	<b>0,0154</b>
<b>B: N</b>	1,41655	1	1,41655	13,14	<b>0,0017</b>
INTERACTIONS					
<b>AB</b>	1,84559	4	0,461398	4,28	<b>0,0116</b>
RESIDUAL	2,15571	20	0,107785		
TOTAL (CORRECTED)	7,13928	29			

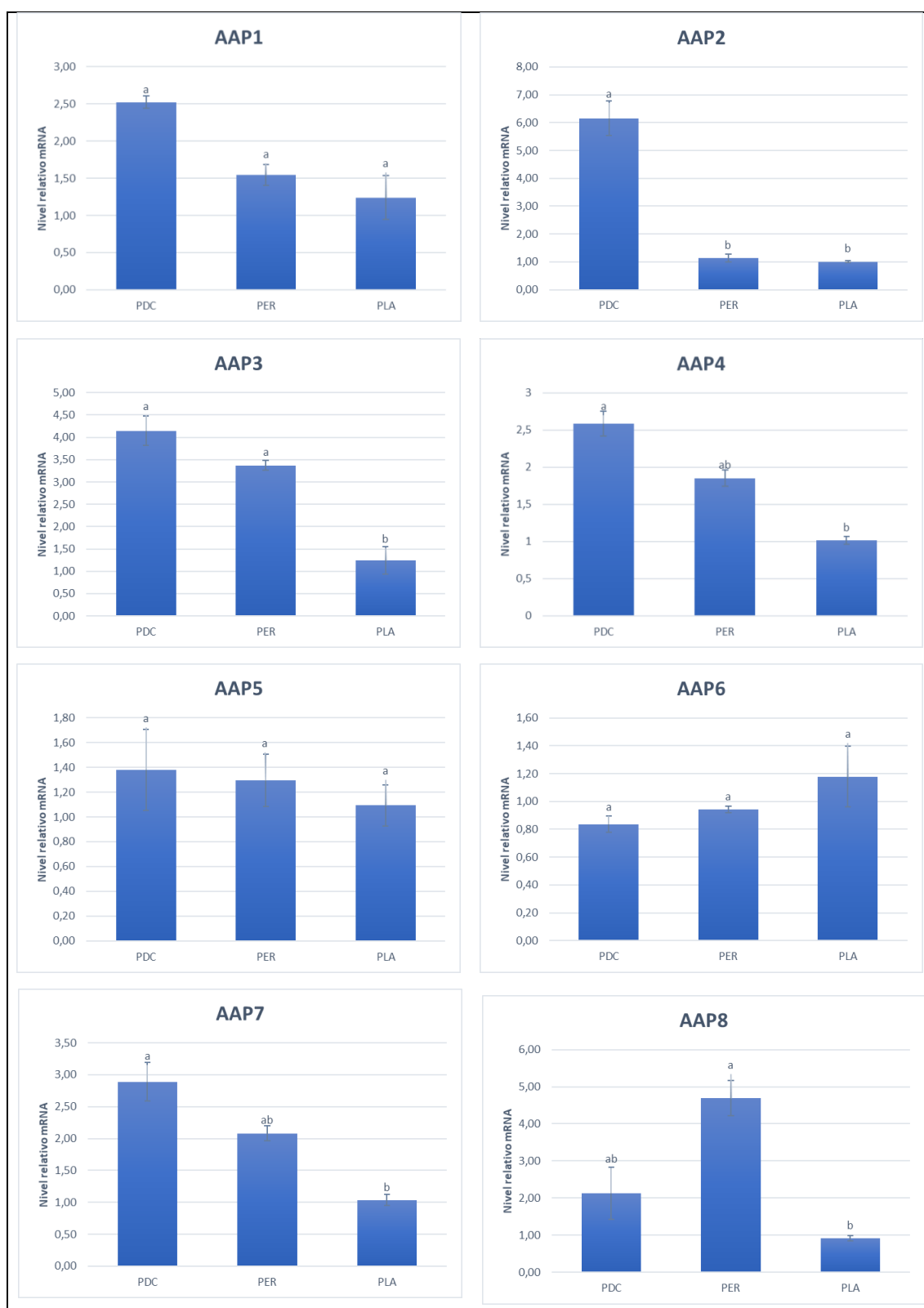
All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Tabla S9:** Analysis of Variance for AAP8

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
<b>A: VARIEDAD</b>	2,29657	4	0,574143	15,74	<b>0,0000</b>
<b>B: N</b>	0,210847	1	0,210847	5,78	<b>0,0260</b>
INTERACTIONS					
<b>AB</b>	0,435924	4	0,108981	2,99	<b>0,0438</b>
RESIDUAL	0,729691	20	0,0364846		
TOTAL (CORRECTED)	3,67303	29			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

### 7.3.ANEXO III: Expresión de cada AAP (AAP1-8) en las distintas partes del tomate comercial *Moneymaker*.



**Figura S1:** Niveles de expresión de cada AAP (AAP1-8) en las distintas partes del tomate comercial *Moneymaker* (PDC, pedicelo; PER, pericarpio; PLA, placenta) para un nivel de aporte de N suficiente (8mM). La expresión de cada gen se ha normalizado con el valor de expresión de PLA correspondiente siguiendo el método de Livak y Schmittgen, 2001.

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