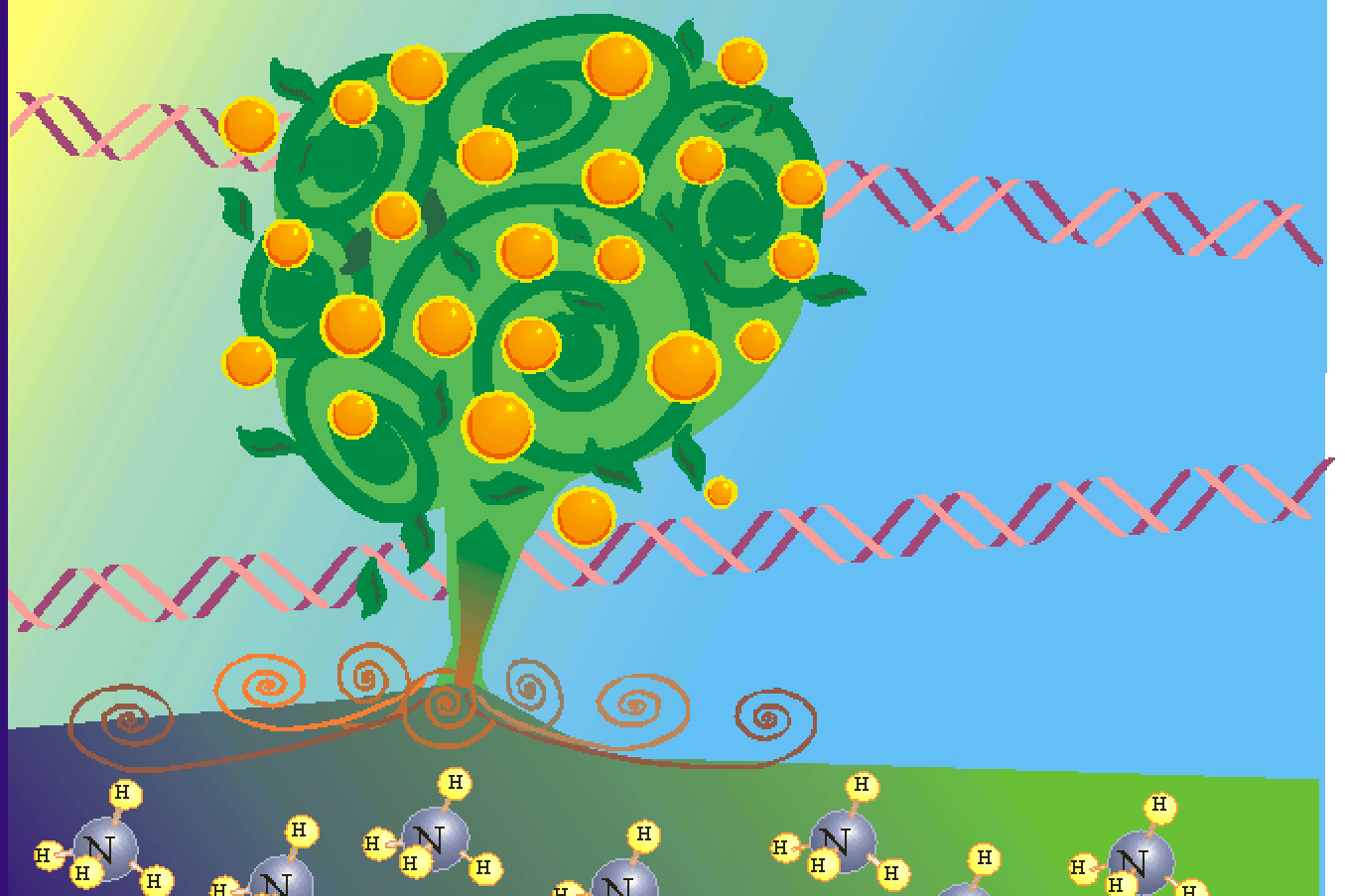




Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals
Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural

Influencia de la modificación del metabolismo del carbono y del nitrógeno sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* en plantas de cítricos



Tesis Doctoral presentada por:

Gemma Camañes Querol

Directores: Pilar García Agustín y Miguel Cerezo García

Castellón, Julio 2007



Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals

Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural

**Influencia de la modificación del metabolismo del
carbono y del nitrógeno sobre la regulación del
influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen
CitAMT1 en plantas de cítricos**

Tesis Doctoral

**Presentada por:
Gemma Camañes Querol**

Dirigida por:

Dra. Pilar García Agustín
Universitat Jaume I de Castellón

Dr. Miguel Cerezo García
Universitat Jaume I de Castellón

LOS DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Pilar García Agustín, Catedrática de Universidad del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón y ***Dr. Miguel Cerezo García***, Profesor Titular del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón.

HACEN CONSTAR QUE:

La presente memoria de Tesis Doctoral, presentada por ***Gemma Camañes Querol***, titulada “***Influencia de la modificación del metabolismo del carbono y del nitrógeno sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* en plantas de cítricos***” realizada en el Área de Fisiología Vegetal de la Universitat Jaume I de Castellón, reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Fdo. Dra. Pilar García Agustín

Fdo. Dr. Miguel Cerezo García

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

Camañes G, Cerezo M, Primo-Millo E, Gojon A, García-Agustín P. **Ammonium transport and *CitAMT1* expression are regulated by light and sucrose in *Citrus* plants.** *Journal of Experimental Botany* (doi: 10.1093/jxb/erm135)

Cerezo M, Camañes G, Flors V, Primo-Millo E, García-Agustín P. **Regulation of nitrate transport in *Citrus* rootstocks depending of Nitrogen availability.** *Plant Signalling Behaviour* (aceptado)

Camañes G, Cerezo, M, Primo-Millo E, Gojon A, García-Agustín P. **Regulation on ammonium transport by nitrogen availability in *Citrus* plants.** *Journal of Experimental Botany* (enviado)

Igualmente, parte de los resultados han sido presentados en los siguientes Congresos Nacionales e Internacionales:

Effects of light and sucrose on ammonium transporter gene expression in *Citrus* roots. **8th International Congress of Plant Molecular Biology** (Australia) 2006.

Regulation of NH_4^+ influx: responses to N- and NH_4^+ -starvation. **XV FESPB Congress.** Lyon (Francia) 2006.

Regulación de la expresión del gen *Amt1* por la fotosíntesis, en plantas de cítricos. **VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas.** Pamplona 2006.

Regulación de la expresión del gen *Amt1*, por el ciclo día/noche, en plantas de cítricos. **IX Congresso Luso Español de Fisiología Vegetal/ XVI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal.** Evora (Portugal) 2005.

Interaction between metabolism of carbon and metabolism of nitrogen in *Citrus*. **FESPB Congress.** Cracovia (Polonia) 2004.

Interacción entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno en plantas leñosas. **VII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno.** Almonte (Huelva) 2004.

AGRAÏMENTS

No seria just presentar aquesta memòria sense donar les gràcies a totes aquelles persones que durant aquests anys han participat d'una manera o altra en la realització d'aquest treball. Espero no deixar-me a ningú, però si de cas, vage per davant el meu més sincer agraïment.

En primer lloc, als meus directors de Tesi, la Dra. Pilar García y el Dr. Miguel Cerezo, per acceptar-me durant tots aquests anys en el seu grup, per la seva dedicació i direcció del que ha estat la meua recerca. A Pilar, perquè ella va ser la persona que em va descobrir i transmetre la seva passió per la Bioquímica i perquè possiblement siga la “culpable” que en aquests moments em trobe dins d'aquest fantàstic món de la investigació. A Michel, el fet d'ajudar-me a donar els primers passos en el laboratori (aquelles extraccions eternes de RNA) però principalment pel seu recolzament durant tot el treball d'investigació realitzat. Per tantes i tantes bones estones compartides i per introduir-me en el món de l'acuariofilia, transformant-me en una “freakie” més.

Als companys de l'àrea de Fisiologia Vegetal: Leonor, pels bons consells rebuts; a Bego i Victor per la seua ajuda amb la part de Biologia Molecular, perquè tots els inicis són difícils i sempre es d'agrair el poder compartir els problemes amb algú. A Victoria, per tenir sempre una frase feta per a cada moment i per a fer-me entendre “Que todo fluye...” Moltes gràcies per compartir la vostra alegria i fer del laboratori un lloc tant agradable on treballar. A Zhanna, per respondre'm qualsevol pregunta en anglès, castellà o fins i tot en valencià. Esta xiqueta es un “crack”. A Pilar i Sergi, per la seua amistat durant aquest temps. Al Jose, la Inma i la Maria, “els nous fixatges” per la seua il·lusió i simpatia. A l'Eugenio i l'Antonio, amb els que he compartit algun que altre experiment...i algun que altre esmorzaret.

A més a més, durant el desenvolupament d'aquesta tesi ha passat molta gent pel laboratori i que ara no està, i es ben cert que si d'alguna cosa he d'estar agraïda es dels bons amics que he fet durant tot aquest temps: Eva i Mercé, ja fa molt de temps que vau marxar, però les bones estones compartides quan començave la meua estada en el laboratori, és ben segur que no les oblidaré mai; a M^a José Orellana, pels grans moments musicals i algun que altre caferet; a la Paulà i la Isa per aportar tant bon humor al laboratori. A Silvia Aucejo i a Maria Foo per ser tan positives (especialment Maria, per tantes i tantes mostres moltes, no podré agrair-te mai l'ajuda aportada en un dels passos mes pesats del treball). A Victor Escoín, per transmetre tanta energia

(sempre positiva). A Elena Bellmunt, per donar-me encara que no ho sabies l'espenteta que em feia falta en l'últim tram. I per descomptat, a Javi García-Andrade i a Gemma del Amo: gràcies per la vostra amistat, perquè qualsevol situació l'heu transformada en un moment molt millor. Javi, espero un dia formar part dels teus agraïments en la teva Tesi. En general a totes les persones que al llarg d'aquests anys han creat un ambient idoni per a treballar i m'han regalat la seua companyia.

Als companys de l'Àrea de Producció Vegetal: Aurelio, Josep, Salva, Maria, Merche, Vicent, Tomasso... i principalment a Mónica Hurtado per tants moments compartits dins i fora de la UJI. Als físics Lluís i Victor, a Jose Mata per fer els dinars tant especials.

A Laura dels Serveis Centrals per compartir les meves penes quan l'equip d'Isòtops decidia deixar de funcionar (que han sigut uns quants cops...).

A les meues companyes de carrera, Marian, Marta i Feli, pels anys i patiments compartits. Espero que cada cop se'ns face més fàcil poder quedar per a dinar o sopar, ja que sou d'eixes amigues que es troben a faltar quan no es veuen.

Als meus amics morellans, Eva, Maria, Neus, Arianna, Nuria, Santi i ara també Marc, Juan Antonio, Ruben, Teudo... per tants i tants bons moments compartits. I especialment, agrair de tot cor a Eva, Maria, Neus i Arianna el ser LES MEUES AMIGUES DE TOTA LA VIDA, perquè sempre heu estat ahí, en els bons i en els mals moments. Espero que esta amistat dure sempre. Gràcies per tot.

Especialment a Ernesto: gràcies per estar al meu costat, per la teua paciència i comprensió, per que amb tu tot val la pena, per tants i tants moments de felicitat... i com no gràcies pel fantàstic dibuix de la portada. I a la teua família, Trini Marin, Ernesto, Lucía, Daniel i Trini Blanch i la resta de cunyats Eva, Josep i David, per ser com sou, per tenir i transmetre tanta força.

Per acabar, vull agrair a la meua família, la seva paciència i suport, especialment als meus pares, gràcies per tots els sacrificis fets perquè aquest dia pogués arribar. I també a Lourdes i Miguel pel seu recolzament incondicional, i com no a la meua neboda, Judit, per ser l'alegria de la casa.

Als meus pares

*Per tu, Ernesto, per estar al meu costat,
per animar-me sempre i fer-me veure
que tot anirà bé. I perquè t'estime.*

No creo realmente posible comprender
los éxitos de la ciencia sin comprender
cuán difícil es, cuán fácil es extraviarse,
cuán arduo es saber en cada momento
qué es lo próximo que debe hacerse

Steven Weinberg

Los tres primeros minutos del universo

ÍNDICE

ÍNDICE	I
<i>Índice de Figuras e Imágenes</i>	VI
<i>Índice de Tablas</i>	IX
<i>Abreviaturas</i>	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Absorción y sistemas de transporte de nitrógeno en plantas superiores	1
1.1.1 Absorción del ión NO₃⁻	5
<i>1.1.1.1. Estudios fisiológicos</i>	5
<i>1.1.1.2. Estudios moleculares</i>	6
1.1.2 Absorción del ión NH₄⁺	9
<i>1.1.2.1. Estudios fisiológicos</i>	10
<i>1.1.2.2. Estudios moleculares</i>	11
1.2 Regulación de la absorción de nitrógeno en plantas superiores	13
1.2.1 Regulación de la absorción del ión NO₃⁻	15
1.2.2 Regulación de la absorción del ión NH₄⁺	19
1.3 Importancia del nitrógeno en plantas de cítricos	25
1.3.1 Absorción del ión NO₃⁻ y su regulación	27
1.3.2 Absorción del ión NH₄⁺ y su regulación	28
1.4 Justificación del trabajo	29
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	39

3.1 Material vegetal	39
3.2 Medida del influjo de ^{15}N	41
3.3 Determinación de los parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$	43
3.4 Identificación y caracterización de los cDNAs de los genes <i>AMT1</i> y <i>NRT2</i> en plantas de cítricos	43
3.4.1 Diseño de cebadores	43
3.4.2 Obtención de un fragmento de ambos genes	44
3.4.3 Determinación de la secuencia completa del cDNA de ambos genes	45
3.4.4 Localización de la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en diferentes órganos de las plantas de cítricos	49
3.4.5 Análisis informático de las secuencias de cDNA y proteínas en los bancos de datos	50
3.5 Efecto de la modificación del metabolismo del C sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i>	51
3.5.1 Efecto del ciclo día/noche	51
3.5.2 Efecto de la luz continua	52
3.5.3 Efecto de la intensidad de luz	52
3.5.4 Efecto de la adición de azúcares y de ácidos carboxílicos	53
3.6 Efecto de la modificación del metabolismo del N sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i>	54
3.6.1 Determinación de la preferencia por la fuente de N	54
3.6.2 Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de NH_4^+ y NO_3^-	55

3.6.3 Efecto de la carencia de NH_4^+ y de la carencia de N	55
3.6.4 Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-represión	56
3.6.5 Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-inducción	57
3.7 Determinaciones analíticas	57
3.7.1 Análisis del ^{15}N	57
3.7.2 Determinación del contenido de azúcares solubles	59
3.7.3 Determinación de la tasa de fotosintética	60
3.8 Determinaciones moleculares	60
3.8.1 Extracción de DNA genómico	60
3.8.2 Extracción de RNA total	61
3.8.3 Síntesis de la primera cadena de cDNA mediante transcripción reversa	62
3.8.4 Análisis de la expresión de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i> mediante PCR en Tiempo Real	63
3.9 Tratamientos estadísticos	66
4. RESULTADOS	69
4.1 Identificación y caracterización de los cDNAs de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i> implicados en el transporte de NH_4^+ y NO_3^- , respectivamente	69
4.1.1 Obtención de un fragmento de ambos genes	69
4.1.2 Determinación de la secuencia completa del cDNA de ambos genes	71
4.1.3 Análisis de las secuencias de aminoácidos	73
4.1.4 Estudio teórico de la topología	79

4.1.5 Perfil de expresión del gen <i>CitAMT1</i> en los diferentes órganos de las plantas de cítricos _____	81
4.2 Efecto de la modificación del metabolismo C sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i> _____	82
4.2.1 Efecto del ciclo día/noche _____	82
4.2.2 Efecto de la luz continua _____	87
4.2.3 Efecto de la intensidad de luz _____	92
4.2.4 Efecto de la adición de sacarosa _____	95
4.2.5 Efecto de la adición de diferentes azúcares y ácidos carboxílicos _____	97
4.3 Efecto de la modificación del metabolismo del N sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i> _____	101
4.3.1 Determinación de la preferencia de las plantas de cítricos por la fuente de N _____	101
4.3.2 Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de NH_4^+ y NO_3^- _____	103
4.3.3 Efecto de la carencia de NH_4^+ y de la carencia de N _____	107
4.3.3.1 Efecto de la carencia de NH_4^+ _____	107
4.3.3.2 Efecto de la carencia de N _____	109
4.3.3.3 Efecto de la carencia de NH_4^+ y de N sobre los parámetros cinéticos _____	111
4.3.4 Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-represión y de-inducción _____	113
4.3.4.1 Condiciones de de-represión _____	114
4.3.4.2 Condiciones de de-inducción _____	117

5. DISCUSIÓN	123
5.1 Identificación y caracterización de los cDNAs de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i>	123
5.2 Efecto de la modificación del metabolismo del C sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i>	125
5.3 Efecto de la modificación del metabolismo del N sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i>	133
6. CONCLUSIONES	145
7. BIBLIOGRAFÍA	149

Índice de Figuras e Imágenes

Figura 1. Esquema de algunas interacciones entre el metabolismo del C y del N	14
Figura 2. Modelo del proceso de retro-inhibición que regula el influjo del ión NO_3^- y la transcripción del gen <i>NRT2</i>	18
Figura 3. Modelo del proceso de retro-inhibición que regula el influjo del ión NH_4^+ y la transcripción del gen <i>AMT1</i>	22
Figura 4. Esquema de los componentes del sistema de análisis elemental acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas cuando se utiliza para análisis de C, N o ^{15}N	59
Figura 5. Electroforesis de la amplificación de un fragmento del gen <i>CitAMT1</i> a partir de DNA genómico	70
Figura 6. Electroforesis de la amplificación de un fragmento del gen <i>CitNRT2</i> a partir de DNA genómico	71
Figura 7. Electroforesis de los extremos 5' y 3' del cDNA del gen <i>CitAMT1</i>	72
Figura 8. Electroforesis de los extremos 5' y 3' del cDNA del gen <i>CitNRT2</i>	73
Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los transportadores de la familia AMT1	75
Figura 10. Análisis filogenético de los transportadores AMT en especies vegetales	76
Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los transportadores de la familia NRT2	78
Figura 12. Análisis filogenético de los transportadores NRT2 en especies vegetales	79
Figura 13. Modelo de la topología del transportador <i>CitAMT1</i>	80
Figura 14. Modelo de la topología del transportador <i>CitNRT2</i>	80
Figura 15. Análisis de la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en diferentes órganos de cítricos	81

Figura 16. Efecto del ciclo día/noche sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y en la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en las raíces de cítricos	83
Figura 17. Efecto del ciclo día/noche sobre la tasa fotosintética	84
Figura 18. Efecto del ciclo día/noche sobre el contenido de azúcares en la raíz	85
Figura 19. Efecto del ciclo día/noche sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en las raíces de cítricos	86
Figura 20. Efecto de la luz continua sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en las raíces de cítricos	88
Figura 21. Efecto de la luz continua sobre el contenido de azúcares en la raíz	89
Figura 22. Efecto del pretratamiento con luz continua sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en las raíces de cítricos	91
Figura 23. Efecto de la intensidad de luz sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, la expresión del gen <i>CitAMT1</i> y la acumulación de azúcares en las raíces de cítricos	92
Figura 24. Cinética del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y el LATS en plantas de cítricos en diferentes condiciones de intensidad de luz (200, 120 y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	94
Figura 25. Efecto de la adición de sacarosa durante el periodo de oscuridad sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i>	96
Figura 26. Efecto de la adición de fructosa, glucosa y sacarosa durante el periodo de oscuridad sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, la expresión del gen <i>CitAMT1</i> y el contenido de azúcares en las raíces de cítricos	98
Figura 27. Efecto de la adición de 2-oxoglutarato y malato durante el periodo de oscuridad sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, la expresión del gen <i>CitAMT1</i> y el contenido de azúcares en las raíces de cítricos	100

Figura 28. Influjo de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$ en función de sus diferentes proporciones en la solución de marcaje	102
Figura 29. Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ sobre el influjo de ^{15}N	104
Figura 30. Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ sobre la expresión de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i>	106
Figura 31. Efecto de la carencia de NH_4^+ sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en las raíces de cítricos	108
Figura 32. Efecto de la carencia de N sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen <i>CitAMT1</i> en las raíces de cítricos	110
Figura 33. Cinética del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y el LATS en plantas de cítricos sometidas a carencia de NH_4^+ o a carencia de N	112
Figura 34. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en condiciones de de-represión	115
Figura 35. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación de la expresión de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i> en condiciones de de-represión	116
Figura 36. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación del influjo de NH_4^+ en condiciones de de-inducción	118
Figura 37. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación de la expresión de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i> en condiciones de de-inducción	119
Imagen 1. Plantas de cítricos crecidas en cámara de cultivo	40
Imagen 2. Plantas de cítricos en hidroponía con solución de crecimiento	40
Imagen 3. Procedimiento experimental de medida del influjo del ^{15}N	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Regulación de los trasportadores de amonio (<i>AMT</i>) de <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum lycopersicon</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Brassica napus</i> y <i>Lotus japonicus</i> _____	23
Tabla 2. Solución nutritiva de Hoagland (1950) modificada por Legaz (1993) _____	41
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar los fragmentos de los genes <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i> y llevar a cabo las técnicas de PCR en Tiempo Real y RACE _____	46
Tabla 4. Composición en aminoácidos de los polipéptidos <i>CitAMT1</i> y <i>CitNRT2</i> _____	74
Tabla 5. Parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ bajo diferentes intensidades luminosas _____	95
Tabla 6. Parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ bajo condiciones de carencia _____	113

ABREVIATURAS

A	Tasa Fotosintética	Leu (L)	Leucina
AAT	Aspartato aminotransferasa	LSD	Test de diferencia significativa mínima
Ala (A)	Alanina	Lys (K)	Lisina
AMT	Transportador de Amonio	MEP	Metilamonio permeasa
Arg (R)	Arginina	Met (M)	Metionina
AS	Asparagina sintasa	N	Nitrógeno
Asn (N)	Asparagina	NiR	Nitrito Reductasa
Asp (D)	Ácido aspartico	NR	Nitrato Reductasa
C	Carbono	NRT	Transportador de Nitrato
cHATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidad constitutivo	O	Oxígeno
C _T	<i>Threshold Cycle</i> o valor umbral	OAA	Oxalacetato
Cys (C)	Cisteína	p/v	Peso/Volumen
DEPC	Dietilpirocarbonato	pb	Par de bases
dNTPs	dinucleótidos	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético	PEP	Fosfoenol piruvato
G	Guanina	PEPc	Fosfoenol piruvato carboxilasa
Gln (Q)	Glutamina	Phe (F)	Fenilalanina
Glu (E)	Ácido glutámico	Pro (P)	Prolina
Gly (G)	Glicina	PS	Peso Seco
GOGAT	Glutamato sintasa	RACE	Amplificación Rápida de Extremos cDNA terminales
GS	Glutamina sintetasa	rpm	Revoluciones por minuto
H	Hidrógeno	SE	Error estándar
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidad	Ser (S)	Serina
His (H)	Histidina	T	Timina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	Thr (T)	Treonina
iHATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidad inducible	Tricina	N-(Tri(hidroximetil)metil)glicina
Ile (I)	Isoleucina	Trp (W)	Triptofano
KDa	Kilodaltos	Tyr (Y)	Tirosina
K _m	Constante de Michaelis-Menten	UPM	Universal Primer Mix
LATS	Sistema de Transporte de Baja Afinidad	Val (V)	Valina
		V _{máx}	Velocidad máxima

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Absorción y sistemas de transporte de nitrógeno en plantas superiores

El nitrógeno (N), tras el oxígeno (O), el hidrógeno (H) y el carbono (C), es el elemento más abundante en las plantas siendo un nutriente mineral esencial y a menudo limitante para su crecimiento. Este elemento forma parte de compuestos esenciales tales como aminoácidos, amidas, proteínas, nucleótidos, coenzimas y numerosos metabolitos secundarios.

El N se encuentra presente en el suelo como una compleja mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos, siendo los iones amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) las principales fuentes de N mineral disponibles para la nutrición vegetal. Dado que ambos iones sirven como fuente de N para el crecimiento de las plantas y que tienen rutas metabólicas comunes no es sorprendente que posean ciertas características similares: 1) ambos iones son absorbidos por las células de las raíces aunque se encuentren a bajas concentraciones en el suelo; 2) se absorben mediante sistemas de transporte

de alta y baja afinidad (HATS¹ y LATS², respectivamente); 3) el influjo de ambos iones es responsable del estado nitrogenado de la planta; 4) el influjo está regulado por cambios diurnos y los genes que codifican las proteínas transportadoras de NH_4^+ y NO_3^- se regulan de una forma similar. A pesar de estas similitudes, también existen diferencias en la absorción de ambos iones, así como en su uso por las plantas (Glass y col., 2002).

La absorción relativa de NH_4^+ o de NO_3^- depende de diversos factores como son la concentración de N, de la proporción de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, del pH y de la temperatura (Hartman y col., 1986; Criddle y col., 1988).

La aplicación exclusiva de NH_4^+ es perjudicial para muchas especies vegetales (Salsac y col., 1987; Cramer y Lewis, 1993; Dejoux y col., 2000; Britto y Kronzucker, 2002), provocando un pobre crecimiento de raíces y tallos (Marschner, 1995). La reducción del crecimiento de la planta está directamente relacionada con la absorción de NH_4^+ , ya que la asimilación de este ión va acompañada por una producción equimolar de H^+ . Estos H^+ son excretados al incrementarse la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, generando la acidificación de la rizosfera y reprimiendo de este modo la absorción de otros cationes. Otra razón que puede provocar la reducción del crecimiento vegetal al suministrar únicamente el ión NH_4^+ , puede ser debido a la ausencia del ión NO_3^- (Stitt, 1999; Crawford y Forde, 2002; Forde, 2002a; Stitt y col., 2002; Foyer y col., 2003). El NO_3^- , además de ser un importante osmolito, es también un ión esencial que señala la translocación de cationes al xilema y está implicado en el metabolismo de ácidos orgánicos y la síntesis de almidón (Stitt, 1999), así como en la inducción de la expresión de una gran cantidad de genes relacionados con la

¹ HATS del inglés High Affinity Transport System

² LATS del inglés Low Affinity Transport System

absorción y la asimilación de N (Wang y col., 2000, 2001, 2003; Scheible y col., 2004).

A pesar de ello, la absorción de NH_4^+ es esencial para las plantas y su concentración en el suelo es de aproximadamente 50 μM , siendo entre 10 y 1000 veces más baja que la de NO_3^- . Este ión es necesario para mantener homeostáticamente el pH celular y el balance anión/catión durante la absorción mineral (Marschner, 1995). Además, algunas plantas prefieren absorber NH_4^+ frente al NO_3^- cuando ambos iones se encuentran presentes como fuente de N en el medio (Macduff y Jackson, 1991; Serna y col., 1992; Gebler y col., 1998; Gazzarrini y col., 1999). De hecho, muchos genes implicados en la asimilación del ión NO_3^- y de otras fuentes alternativas de N están reprimidos en presencia del ión NH_4^+ lo que favorece la absorción de éste frente a la del NO_3^- (Fernández y Cárdenas, 1989; Glass, 2003). Esta preferencia por el NH_4^+ es posiblemente debida a que su absorción y asimilación requieren un menor gasto de energía que el ión NO_3^- . El mayor coste energético para el NO_3^- es debido a que éste debe de reducirse a NO_2^- por la acción de la nitrato reductasa (NR, EC 1.6.6.1) y posteriormente a NH_4^+ asimilable, por la nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.7.1) (Bloom y col., 1992). El NH_4^+ junto a los α -cetoácidos provenientes del ciclo de Calvin y en menor medida del ciclo de Krebs, dan lugar a aminoácidos por la acción de la glutamina sintetasa (GS; EC: 6.3.1.2) y la glutamato sintasa (GOGAT; EC: 1.4.1.14) (Suárez y col., 2002).

No obstante, el crecimiento vegetal óptimo se obtiene habitualmente, cuando se proporcionan ambos, NO_3^- y NH_4^+ , de forma conjunta (Kronzucker y col., 1999b; Kirk y Kronzucker, 2005; Baozhen y col., 2006), aunque la proporción óptima de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ varía y depende de la especie, de la edad de la planta y del pH del medio (Haynes y Goh, 1978).

Por otra parte, debido a los cambios temporales y espaciales de las fuentes de N en el suelo, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación que les permiten incrementar la eficiencia de la absorción de N en situaciones de escasez de dicho elemento (Clarkson y Lüttge, 1986). Estos mecanismos regulan los sistemas de transporte implicados en la absorción de los iones NO_3^- y el NH_4^+ (Crawford y Glass, 1988; Forde, 2000; von Wirén y col., 2000a) o estimulan el crecimiento de las raíces, modificando la arquitectura del sistema radicular. Principalmente, la escasez de NO_3^- favorece el crecimiento de las raíces laterales para explorar un gran volumen de suelo (Robinson, 1994; Zhang y Forde, 2000; Little y col., 2005; Remans y col., 2006). Estudios recientes sugieren que la escasez de NH_4^+ también favorece el crecimiento de las raíces laterales para así facilitar a la planta la búsqueda de N en el suelo (Engineer y Kranz, 2007).

En los últimos años, se ha logrado un avance espectacular en el conocimiento de los mecanismos de absorción de los iones NO_3^- y NH_4^+ , gracias al desarrollo de métodos fisiológicos que han permitido medir *in vivo* la tasa de influjo y eflujo de N, así como el uso de técnicas moleculares y genéticas que han permitido identificar los genes responsables de su transporte. La tasa de absorción neta es el balance de dos flujos opuestos: el influjo desde el apoplasto al citoplasma y el eflujo en dirección opuesta (Morgan y Jackson, 1988).

La absorción de N inorgánico por las raíces de las plantas es debida principalmente a la actividad de los sistemas de transporte de NO_3^- y NH_4^+ , localizados en la membrana plasmática de las células de la raíz. Estos sistemas de transporte están funcionalmente separados como sistemas de transporte de alta y baja afinidad, HATS y LATS, respectivamente. Los sistemas de transporte de alta afinidad se distinguen por sus valores de K_m que indican la afinidad por el sustrato y $V_{m\acute{a}x}$ que indica la máxima capacidad

del sistema. El LATS presenta tasas de influjo mucho más elevadas que el HATS, cuando la concentración de N externa es elevada. Las propiedades cinéticas de estos sistemas de transporte, son muy variables y principalmente dependen del estado nutricional de la planta. Además, cuando la disponibilidad de sustrato (N) es limitada, la demanda de N por la raíz tiene una clara prioridad sobre la demanda de N por el tallo, produciendo una rápida reducción en la translocación del N hacia el mismo (Kronzucker y col., 1998).

Los genes que codifican las proteínas transportadoras de los iones NO_3^- y NH_4^+ generalmente se clasifican en cinco familias diferentes denominadas: *NRT1*, *NRT2* y *NRT3* para los transportadores de NO_3^- (Forde, 2000; Tong y col., 2005) y *AMT1* y *AMT2* para los transportadores de NH_4^+ (Howitt y Udvardi, 2000).

1.1.1 Absorción del ión NO_3^-

En la mayoría de las especies vegetales, una pequeña porción del NO_3^- absorbido es asimilado en la raíz y el resto es transportado a través del xilema para ser asimilado en las hojas. En situaciones de exceso de NO_3^- en el medio y máxima absorción, éste puede almacenarse en la vacuola o ser expulsado de nuevo al medio externo mediante eflujo a través de la membrana plasmática (Forde y Clarckson, 1999).

1.1.1.1 Estudios fisiológicos

El transporte del ión NO_3^- desde la rizosfera hasta el citoplasma de las células corticales de la raíz es termodinámicamente desfavorable en términos de gradientes de potencial eléctrico y químico. Diversos estudios

han demostrado que este proceso es dependiente de energía (Deane-Drummond y Glass, 1983; Morgan y col., 1985) y requiere la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. En base a estos estudios se propone un mecanismo simporte $2H^+/NO_3^-$ para ambos sistemas de transporte, HATS y LATS (Ullrich y Novacki, 1981; McClure y col., 1990; Glass y col., 1992; Santi y col., 1995).

A nivel cinético, los estudios fisiológicos del transporte de NO_3^- han desvelado la existencia de tres sistemas de transporte diferentes: dos de alta afinidad, uno constitutivo (cHATS) y otro inducible (iHATS) que operan a una concentración de NO_3^- externa ($[NO_3^-]_0$) menor de 1 mM siguiendo ambos una cinética de Michaelis-Menten y otro de baja afinidad LATS con una alta capacidad de transporte (Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995). Debido a las diferencias significativas entre los valores de sus K_m , el sistema cHATS, es considerado como un sistema de absorción diferente del iHATS (Agüera y col., 1990; Hole y col., 1990; Siddiqi y col., 1990; Aslam y col., 1992; Botella y col., 1994). El cHATS tiene una mayor afinidad por el NO_3^- que el iHATS [K_m de 6-20 μM comparados a los 13-79 μM del iHATS (Forde y Clarckson, 1999)]. En algunas plantas, ambos sistemas (cHATS e iHATS) operan simultáneamente en el estado inducido (Warner y Huffaker, 1989; Aslam y col., 1992) mientras que en otras no está del todo claro (Siddiqi y col., 1990). El papel propuesto para el cHATS es mantener la concentración de NO_3^- citoplasmática a niveles suficientemente altos para inducir el sistema iHATS (Behl y col., 1988). Por otra parte, el LATS para el NO_3^- muestra una cinética lineal y es activo a $[NO_3^-]_0$ elevadas, entre 1 y 50 mM (Siddiqi y col., 1990; Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995; Mata y col., 2000). El LATS es constitutivo y de primer orden respecto a la concentración externa de NO_3^- y no requiere inducción por NO_3^- , como han

mostrado diversos estudios cinéticos (Siddiqi y col., 1990) y electrofisiológicos (Glass y col., 1992).

1.1.1.2 Estudios moleculares

Las familias génicas que codifican los transportadores del ión NO_3^- son *NRT1* y *NRT2*, y recientemente se ha identificado una nueva familia denominada *NRT3*. La caracterización de estos genes ha permitido resolver algunas de las cuestiones planteadas a nivel fisiológico. Las familias de genes *NRT1* y *NRT2* codifican supuestamente los sistemas LATS y HATS para el NO_3^- , respectivamente (Crawford y Glass, 1998; Daniel-Vedele y col., 1998; Huang y col., 1999; Forde, 2000; Fraiser y col., 2000). En la mayoría de las especies vegetales estudiadas los genes *NRT1* y *NRT2* están organizados en familias multigénicas (Liu y col., 1999), indicativo de que pueden ejercer papeles diferentes en la planta (Huang y col., 1999; Forde y Clarkson, 1999; Forde, 2000; Williams y Miller, 2001; Orsel y col., 2004). Recientemente, en *A. thaliana* se han identificado dos miembros de la familia *NRT3* (Okamoto y col., 2006).

El gen *NRT1.1* de *A. thaliana* (también llamado *CHL1*) fue el primero identificado como responsable de codificar un transportador de NO_3^- en plantas (Tsay y col., 1993) e inicialmente se creyó que era un transportador inducible de baja afinidad (Tsay y col., 1993; Huang y col., 1996; Touraine y Glass, 1997). Posteriormente, se ha identificado en otras especies vegetales como *Nicotiana plumbaginifolia* (Fraiser y col., 2001) y *Glicine max* (Yokohama y col., 2001).

Diversos trabajos indican que el papel del transportador *NRT1.1* es más complejo de lo esperado y su función está lejos de estar sólo limitada a la absorción de NO_3^- mediada por el LATS en las raíces. En primer lugar,

NRT1.1 se considera ahora como un transportador de afinidad dual, perteneciente al HATS y al LATS (Wang y col., 1998; Liu y col., 1999). En segundo lugar, el gen *NRT1.1* está fuertemente expresado en órganos meristemáticos (yema apical de las raíces, raíces laterales emergentes, y hojas en expansión) y juega un papel crucial en las primeras fases del desarrollo de estos órganos jóvenes (Guo y col., 2001), en la arquitectura radicular y está relacionado también con la sensibilidad de las plantas a la sequía (Guo y col., 2003).

En 1999, Huang y col. caracterizaron en *A. thaliana* el gen *NRT1.2* de la misma familia que el *NRT1.1*, responsable de codificar un transportador de NO_3^- de baja afinidad, pero en este caso su expresión era constitutiva e independiente de la presencia de NO_3^- . De este modo, se postuló que ambos genes *NRT1.1* y *NRT1.2*, codificaban sistemas de transporte de baja afinidad para el NO_3^- . Sin embargo, ambos transportadores desempeñan funciones diferentes, puesto que en plantas de *A. thaliana* que carecen del gen *NRT1.1*, parece que la actividad del LATS es menor cuando se adicionan conjuntamente NO_3^- y NH_4^+ que cuando crecen con una única fuente de N (NO_3^- o NH_4^+) (Touraine y Glass, 1997; Crawford y Glass, 1998; Muños y col., 2004).

El primer miembro de la familia de genes *NRT2* se identificó en el hongo *Aspergillus nidulans* (Unkles y col., 1991) y posteriormente en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* se identificó el primer gen implicado en el transporte de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, mediante complementación de un mutante de delección (Quesada y col., 1994). Una vez identificados ambos genes, a partir de las regiones más conservadas en sus secuencias se diseñaron oligonucleóticos degenerados que han permitido clonar la mayoría de genes *NRT2* en plantas como *Hordeum vulgare* (Trueman y col., 1996), *Nicotiana plumbaginifolia* (Quesada y col., 1997), *Glicine max* (Amarasinghe y col.,

1998), *Solanum lycopersicon* (Ono y col., 2000), *Zea mays* (Quaggiotti y col., 2003) y recientemente, en *Prunus persica* (Nakamura y col., 2007). La caracterización funcional en *A. thaliana* del gen *NRT2.1* mostró que era el componente mayoritario del HATS para el NO_3^- , desempeñando un importante papel en el control de la absorción de este ión (Cerezo y col., 2001a; Filleur y col., 2001; Lejay y col., 2003).

Las proteínas NRT1 y NRT2 presentan una topología similar, con 12 dominios transmembrana, distribuidos en dos grupos de 6 hélices conectadas entre sí por un lazo citosólico (Trueman y col., 1996; Pao y col., 1998). Aunque su estructura topológica es común, su secuencia primaria de aminoácidos es diferente. Hasta la fecha, sólo tres proteínas (NRT1.1, NRT1.2 y NRT2.1) han sido caracterizadas funcionalmente en plantas y están implicadas en la absorción de NO_3^- (Muños y col., 2004).

Finalmente, de los dos genes que hasta el momento integran la familia *AtNRT3*, únicamente el *AtNRT3.1* se expresa significativamente y parece desempeñar un cierto papel en la regulación de la inducción producida por el ión NO_3^- . En mutantes *AtNRT3.1*, Okamoto y col. (2006) han mostrado que el HATS para el NO_3^- está funcionalmente dañado, incluso aunque después de la inducción por NO_3^- haya una fuerte transcripción del gen *AtNRT2.1*, por lo que se propone que la proteína NRT3.1 no es propiamente un transportador, pero desempeña una importante función regulando al transportador NRT2.1 a nivel postraduccional.

1.1.2 Absorción del ión NH_4^+

El NH_4^+ se genera en la planta mediante diferentes procesos: por absorción directa, reducción del ión NO_3^- , en la fotorrespiración, por la fijación de N_2 o en la desaminación de compuestos nitrogenados como

aminoácidos (Forde y Clarkson, 1999; Howitt y Udvardi, 2000; von Wirén y col., 2000a).

El ión NH_4^+ es potencialmente tóxico para la planta y por ello, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación cuando las concentraciones de NH_4^+ son elevadas en el medio externo, como son la activación del eflujo y el aumento de la respiración en la raíz (Britto y col., 2001). Por otro lado, el NH_4^+ absorbido puede ser rápidamente metabolizado formando compuestos orgánicos (Chaillou y col., 1994), aunque también puede almacenarse en cierta medida en las vacuolas (Loqué y col., 2005). En este sentido, existe mucha controversia sobre si el NH_4^+ se transloca o no desde la raíz hacia el tallo a través del xilema (Tobin y Yamaya, 2001; Schjøerring y col., 2002).

1.1.2.1 Estudios fisiológicos

En lo que se refiere a los requerimientos energéticos del transporte del ión NH_4^+ , el HATS y el LATS presentan diferencias en cuanto a la energía utilizada para el transporte. Tanto el HATS como el LATS son sensibles a inhibidores y desacopladores metabólicos, pero la inhibición ejercida por estos compuestos es mucho más pronunciada para el HATS, sugiriendo que el LATS es menos dependiente de energía metabólica y/o gradiente transmembrana (Ullrich y col., 1984; Wang y col., 1994). Esto indica que el HATS y el LATS difieren en sus mecanismos de absorción de NH_4^+ y/o que parte de la actividad del LATS está asociada con el transporte de NH_3 mediante un proceso de difusión al menos en algunas especies (Glass y Siddiqi, 1995). Por otro lado, en varios cultivos incluidos arroz, cebada y maíz se ha propuesto un posible transporte NH_4^+/K^+ (Forde y Clarkson, 1999).

Estudios cinéticos muestran en especies de plantas superiores que la absorción neta o influjo de NH_4^+ en las raíces sigue un patrón bifásico en función de la concentración externa de NH_4^+ ($[\text{NH}_4^+]_o$) sugiriendo la existencia general de dos sistemas de absorción diferentes, uno de alta y otro de baja afinidad (Forde y Clarkson, 1999; Glass y col., 2002), pero a diferencia del ión NO_3^- , no se diferencia entre sistemas constitutivos o inducibles. El HATS posee una cinética de Michaelis-Menten que opera a $[\text{NH}_4^+]_o$ inferiores a 1mM, mientras que el LATS opera a $[\text{NH}_4^+]_o$ superiores a 1 mM y generalmente sigue una cinética lineal. Estos sistemas se han encontrado en diferentes especies vegetales como arroz (Wang y col., 1993), cebada (Mäck y Tischner, 1994), tomate (Kosola y Bloom, 1994) y abeto (Kronzucker y col., 1996). Los valores de K_m para el sistema HATS, estudiado en diferentes especies, se ha establecido entre 10 y 170 μM (Glass y Siddiqi, 1995).

1.1.2.2 Estudios moleculares

El primer transportador de NH_4^+ en un organismo eucariota se caracterizó en levadura (genes *MEP*³) por Marini y col. (1994). Posteriormente, se identificó en la planta modelo *A. thaliana*, mediante la complementación funcional de una levadura mutante deficiente en dichos sistemas de transporte, un gen homólogo *AtAMT1;1*, el cual codifica un transportador de NH_4^+ de alta afinidad (Ninnemann y col., 1994). Desde entonces, se han aislado más genes homólogos de la familia *AMT1* en diferentes especies vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana* (Gazzarrini y col., 1999), *Solanum lycopersicon* (Lauter y col., 1996; von Wirén y col., 2000b), *Oryza sativa* (von Wirén y col., 1997; Saiki y col., 2002; Kumar y

³ *MEP* del inglés *Methylammonium permease*

col., 2003) *Brassica napus* (Pearson y col., 2002) y *Lotus japonicus* (Salvemini y col., 2001; D'Apuzzo y col., 2004).

Varias características de la familia de proteínas AMT1 indican que son responsables de la actividad del HATS en plantas. En primer lugar, las características bioquímicas de las proteínas AMT1 expresadas en levaduras, en particular su alta afinidad por el NH_4^+ y su aparente mecanismo uniporte de NH_4^+ , son muy similares a las características del HATS en raíces de las plantas (Ninemann y col., 1994; Gazzarrini y col., 1999). En segundo lugar, los niveles de transcripción del *AtAMT1* se correlacionan con la actividad HATS en raíces intactas (Gazzarrini y col., 1999; Rawat y col., 1999). Finalmente, la existencia y diferente regulación de los miembros de la familia multigénica AMT1 en plantas, implica que los diferentes miembros deben ejercer roles fisiológicos distintos, permitiendo una mayor flexibilidad en su regulación y en su especialización, favoreciendo de este modo captar NH_4^+ en un amplio rango de concentraciones.

Estudios de hidrofobicidad predicen que las proteínas AMT1 son proteínas integradas en la membrana con 11 dominios transmembrana (Schwacke y col., 2003) y experimentos con proteínas de fusión indican que la mayoría de proteínas MEP/AMT contienen 11 hélices transmembrana con el extremo N-terminal extracitosólico y el C-terminal citosólico (Marini y Andre, 2000; Thomas y col., 2000).

Recientemente, se ha identificado y caracterizado en *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus* y *Oryza sativa* una segunda familia de transportadores denominados AMT2 (Sohlenkamp y col., 2000 y 2002; Simon-Rosin y col., 2003; Suenaga y col., 2003) que parece que codifican transportadores de NH_4^+ de alta afinidad y que presentan una mayor homología con los transportadores de NH_4^+ en procariotas que en plantas (Howitt y Udvardi, 2000; Sohlenkamp y col., 2000, 2002). Los genes *AMT2*

se expresan en raíz y en tallo y podría codificar un transportador relacionado con el transporte de NH_4^+ intra- o intercelular aunque su función aún es desconocida.

En plantas leñosas, existen muy pocos estudios moleculares de estas familias génicas, recientemente Couturier y col. (2007) han caracterizado funcionalmente tres miembros de la familia *AMT1* y dos *AMT2* en *Populus trichocarpa* mediante expresión heteróloga de estos genes en levadura.

1.2 Regulación de la absorción de nitrógeno en plantas superiores

Como respuesta a la diferente concentración de N en el suelo, las plantas han desarrollado mecanismos de regulación del influjo de los iones NO_3^- y NH_4^+ . Estudios fisiológicos y moleculares han mostrado que los sistemas de absorción de NO_3^- y NH_4^+ se regulan en función del estado carbonado y del estado nitrogenado de la planta.

La fijación del CO_2 durante la fotosíntesis proporciona los esqueletos carbonados necesarios para generar energía y servir de sustrato para la síntesis de diversos metabolitos, como polisacáridos estructurales o de reserva como el almidón. Por otra parte, el N es el compuesto inorgánico más importante para la nutrición de las plantas. Por ello, la regulación de forma coordinada del metabolismo del C y del N es necesaria para el desarrollo óptimo de la planta. El metabolismo del C y del N están estrechamente interconectados ya que para la síntesis de aminoácidos, las plantas necesitan el NH_4^+ así como los esqueletos carbonados provenientes de la glicólisis como el malato y el piruvato, o del ciclo de Krebs como el oxoglutarato (Figura 1).

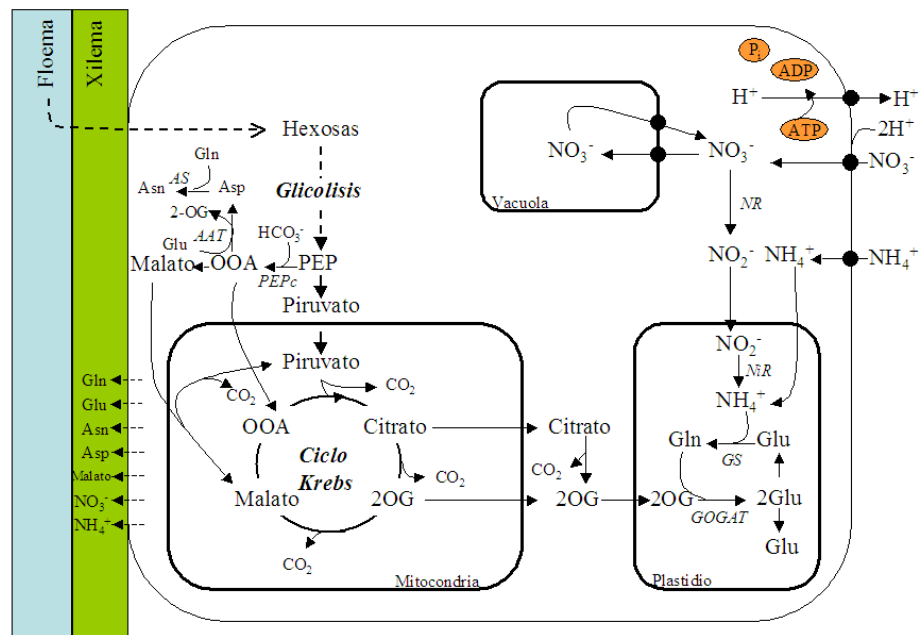


Figura 1. Esquema de algunas interacciones entre el metabolismo del C y del N. El C entra en el Ciclo de Krebs a través del piruvato y del oxalacetato (OAA) o malato, el cual proviene de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP). El OAA puede también transaminarse y formar Aspartato (Asp) y Asparragina (Asn). El ciclo de Krebs proporciona citrato para la síntesis de Glutamato (Gln) y Glutamina (Glu). Enzimas importantes en el metabolismo del N son GS, GOGAT, Aspartato aminotransferasa (AAT), Asparragina sintasa (AS), NR, NiR, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc).

La regulación por metabolitos carbonados es parte de un mecanismo general que ejerce un efecto recíproco entre el metabolismo del N y del C y que asegura su coordinación en la planta (Stitt, 1999; Stitt y Krapp, 1999; Coruzzi y Zhou, 2001). La unión entre el metabolismo del C y del N también se pone de manifiesto en el sentido opuesto, es decir, el metabolismo carbonado está regulado por los compuestos nitrogenados (Scheible y col., 1997; Stitt, 1999; Lancien y col., 1999) y particularmente, el metabolismo de

la sacarosa está íntimamente relacionado con el metabolismo del N orgánico e inorgánico (Koch, 1997).

Se sabe que la información del estado C y N de la planta se utiliza para regular la expresión de genes y la actividad de algunos enzimas, pero la naturaleza de esta señal aún es desconocida (Coruzzi y Bush, 2001). Los aminoácidos presentes en el floema eran los candidatos por excelencia para regular la absorción de NO_3^- mediante un proceso de retro-inhibición desde el tallo (Cooper y Clarkson, 1989; Imsande y Touraine, 1994). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que no existe correlación entre la tasa de absorción y los cambios tanto cualitativos como cuantitativos de los aminoácidos del floema (Tillard y col., 1998). Estudios recientes han demostrado que pueden ser otros metabolitos, como la sacarosa y las hormonas vegetales (Mistrik y col., 2000; Berleth y Sachs, 2001; Guo y col., 2002; Gebler y col., 2004) los que podrían explicar la reducción de la tasa de absorción de NO_3^- observada durante el periodo de oscuridad. De los datos moleculares y fisiológicos se puede concluir que el balance C/N está implicado en la regulación de la absorción de los iones NO_3^- y NH_4^+ (Lejay y col., 1999).

1.2.1 Regulación de la absorción del ión NO_3^-

La regulación de la absorción de NO_3^- debida a los cambios diurnos ha sido descrita en diversas especies vegetales, concretamente se ha encontrado que la oscuridad tiene un efecto negativo en la absorción de NO_3^- (Delhon y col., 1995a; Matt y col., 2001). Para explicar este efecto negativo, unos autores proponen que es debido a la incapacidad de la planta de asimilar y translocar el NO_3^- en oscuridad (Scaife, 1989; Scaife y Schloemer, 1994) y otros que se debe a cambios en el transporte floemático de azúcares

hacia las raíces (Ruffy y col., 1989; Raper y col., 1991; Le Bot y Kirkby, 1992).

A nivel molecular, muchas investigaciones sugieren que las fluctuaciones diurnas observadas en la absorción del ión NO_3^- están correlacionadas con cambios en los niveles de transcripción de los genes *NRT1* y *NRT2* (Lejay y col., 1999; Matt y col., 2001). Además, la absorción de NO_3^- es independiente de las variaciones en la transpiración y no está controlada por el ritmo circadiano (Delhon y col., 1995b). También se conoce que está regulada por la fotosíntesis, particularmente por la concentración de CO_2 atmosférica (Delhon y col., 1996) y por la disponibilidad de metabolitos carbonados en la raíz, tales como azúcares (Delhon y col., 1996; Lejay y col., 1999) y ácidos carboxílicos (Touraine y col., 1992). Sin embargo, aunque existen claras evidencias de la acción positiva de los azúcares en la absorción de NO_3^- , hay pocos estudios a nivel molecular en los que se haya investigado los mecanismos involucrados. En el caso concreto del gen *AtNRT2.1* se observó, utilizando compuestos análogos de los azúcares y mutantes de *A. thaliana* deficientes en varios pasos de la ruta de señalización de azúcares que o bien la actividad catalítica de la enzima hexoquinasa o un producto de la ruta de glicólisis podría regular la transcripción del gen *AtNRT2.1* (Lejay y col., 2003).

La absorción de NO_3^- está también regulada por el metabolismo nitrogenado. La forma de N disponible (N- NO_3^- , N- NH_4^+ y N-orgánico) influye en la absorción del propio NO_3^- e incluso en la de otros iones (Edwards y Horton, 1982; Hartman y col., 1986; Shelp, 1987). Después de exponer las plantas a NO_3^- se produce un rápido aumento del influjo de este ión mediado por el iHATS, que disminuye también de forma rápida transcurridas varias horas (Daniel-Vedele y col., 1998; Crawford y Glass, 1998; Forde y col., 1999; Zhuo y col., 1999). Entre especies vegetales,

existen diferencias significativas en el tiempo de respuesta a la inducción tras la aplicación de NO_3^- y no está claro si la concentración de NO_3^- en la raíz “*per se*” o algún producto de la asimilación del NO_3^- son responsables del efecto de represión de la actividad que se observa después de la inducción (Siddiqi y col., 1989).

Por otra parte y de modo general en la mayoría de las especies vegetales, el NH_4^+ inhibe la absorción del ión NO_3^- (Aslam y col., 1994; Kronzucker y col., 1999a) aunque esto no ocurre en algunos cultivos (Wang y Below, 1992; Smart y Bloom, 1998). El NH_4^+ o algún producto de su asimilación como la glutamina (Gln) u otros aminoácidos, podrían inhibir la actividad de los sistemas de transporte del ión NO_3^- y los genes *NRT2* a nivel transcripcional y/o postranscripcional (Krapp y col., 1998; Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Lejay y col., 1999; Zhuo y col., 1999; Fraissier y col., 2000; Vidmar y col., 2000; Orsel y col., 2002a y b).

Asimismo, la acumulación de transcritos del gen *NRT2* sigue el mismo patrón que el observado para el influjo de NO_3^- mediado por HATS. Ésta se induce por el NO_3^- cuando está presente a una baja concentración y se de-reprime⁴ a corto plazo y de-induce⁵ a largo plazo por la carencia de N. Sin embargo, cuando hay una elevada concentración de N en el medio se reprime por el NO_3^- o por sus productos de asimilación (Amarasinghe y col., 1998; Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Zhuo y col., 1999; Ono y col., 2000; Gansel y col., 2001; Okamoto y col., 2003).

En la figura 2, se presenta un modelo propuesto por Glass y col. (2001) de como la absorción de NO_3^- está regulada por el metabolismo nitrogenado.

⁴ De-reprime: Mecanismo de activación diferente del de inducción

⁵ De-induce: Mecanismo de inhibición diferente del de represión

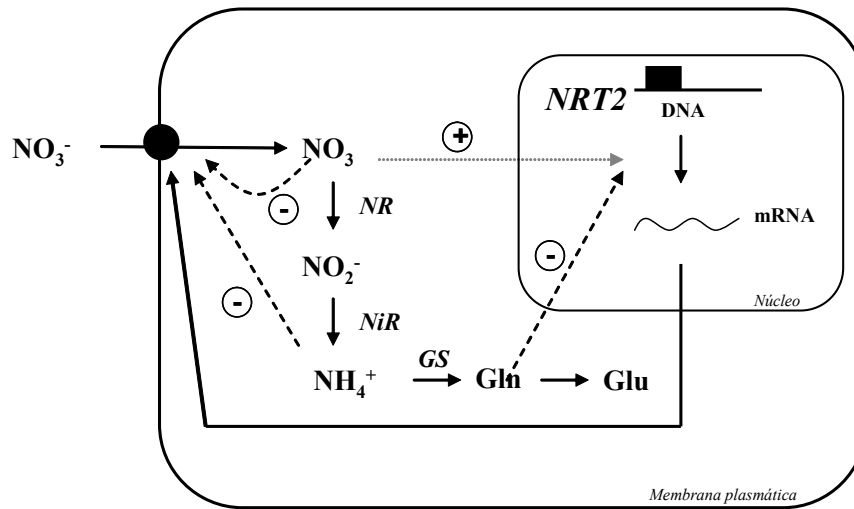


Figura 2. Modelo del proceso de retro-inhibición que regula el influjo del ión NO_3^- y la transcripción del gen $NRT2$.

Regulación negativa (- - -). Inducción (—).....

El sistema HATS implicado en el transporte de NO_3^- se reprime por el propio NO_3^- y por el NH_4^+ . Por otra parte, el gen $NRT2$ se reprime por la glutamina producto de la asimilación de los iones NH_4^+ y NO_3^- . También se aprecia que el gen $NRT2$ está inducido por el NO_3^-

El LATS para el ión NO_3^- se considera un sistema de transporte constitutivo al igual que la familia de genes $NRT1$ que lo codifica, salvo los genes $AtNRT1.1$ y $BnNRT1.2$ que parecen ser inducibles por NO_3^- (Zhou y col., 1998; Wang y col., 1998). En *A. thaliana*, $AtNRT1.1$ codifica un transportador de afinidad dual que contribuye significativamente al sistema iHATS bajo ciertas condiciones nutricionales (Wang y col., 1998). La disponibilidad limitada de NO_3^- desencadenaría la fosforilación del transportador $NRT1.1$, que permitiría el cambio de baja a alta afinidad. De este modo, se adaptarían las propiedades del transportador a los recursos disponibles en el ambiente radicular (Liu y Tsay, 2003). Por otra parte, los genes $NRT1$ son menos susceptibles a la inhibición por retro-inhibición,

mediada posiblemente por compuestos producidos en el proceso de asimilación del NO_3^- (Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Lejay y col., 1999).

Por último, con objeto de desvelar si la regulación de la absorción del ión NO_3^- se produce a nivel local o a larga distancia, se han realizado diversos experimentos de fraccionamiento radicular (split-root) (Lainé y col., 1995; Tillard y col., 1998), observándose que la absorción del ión NO_3^- está gobernada principalmente por una señal a larga distancia, que depende del estado nutricional en el que se encuentre la planta (Imsande y Touraine, 1994; Cerezo y col., 2001a; Gansel y col., 2001; Forde, 2002b).

1.2.2 Regulación de la absorción del ión NH_4^+

Respecto a la regulación de la absorción de NH_4^+ por el estado carbonado, el influjo de NH_4^+ y la expresión los genes *AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3* en *Arabidopsis thaliana*, muestra un patrón diurno con un máximo de absorción al final del periodo de luz y una fuerte reducción de la absorción al inicio del periodo de oscuridad (Gazzarrini y col., 1999). Sin embargo, sólo los niveles de transcripción del gen *AtAMT1.3* se correlacionan mayoritariamente con el influjo del ión NH_4^+ . Estos resultados sugieren que la regulación del gen *AtAMT1.3* puede ser un enlace entre la absorción de NH_4^+ y la provisión de esqueletos carbonados en las raíces (Gazzarrini y col., 1999).

La adición de sacarosa durante el periodo de oscuridad previene la reducción del influjo del ión NH_4^+ , evitando también la disminución de la expresión de los genes *AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3*, por lo que se sugiere que los fotoasimilados podrían regular el transporte del ión NH_4^+ (Lejay y col., 2003). El hecho de que la inducción por la luz y por la

sacarosa estén fuertemente correlacionadas es indicativo de un mecanismo de regulación similar.

Asimismo, el estado nitrogenado regula la absorción del ión NH_4^+ de manera que el transporte del ión NH_4^+ mediado por el HATS se reprime por el estado nutricional de la planta (Kronzucker y col., 1996; von Wirén y col., 1997, 2000b, Gazzarrini y col., 1999; Min y col., 2000; Cerezo y col., 2001b). Esta represión es debida supuestamente a un mecanismo de retro-inhibición ejercido posiblemente, por el propio ión NH_4^+ o por algún producto de su asimilación como es la Gln (Kronzucker y col., 1998; Gazzarrini y col., 1999; Rawat y col., 1999). La represión desaparece si se mantienen las plantas durante unos pocos días en condiciones de carencia de N (de-represión) (Kronzucker y col., 1996; von Wirén y col., 1997, 2000b; Gazzarrini y col., 1999; Pal'ove-Balang y Mistrik, 2002; Loqué y von Wirén, 2004). Por otra parte, en arroz, el HATS parece estar regulado alostéricamente por la disponibilidad de N (Wang y col., 1993; Howitt y Udvardi, 2000).

Existe una correlación paralela entre la expresión del gen *AMT1* y el influjo de NH_4^+ . En *Arabidopsis thaliana* la carencia de N, incrementa el influjo del ión NH_4^+ y los niveles de transcripción de los genes *AtAMT1.1* y *AtAMT1.3*, mientras que la transcripción del gen *AtAMT1.2* permanece prácticamente constante (Gazzarrini y col., 1999; Sohlenkamp y col., 2000). El mayor incremento en la transcripción del gen *AtAMT1.1* respecto al resto de genes, sugiere que éste contribuye en mayor medida a incrementar la capacidad de la absorción de NH_4^+ por las raíces. El transportador *AMT1.1* es el único de los tres transportadores que tiene una afinidad por el sustrato en el rango nM. En el resto de genes de la familia *AMT* en *A. thaliana*, la afinidad se encuentra en el rango de 1 a 100 μM . Estos resultados indican que la deficiencia en N estimula al transportador que tiene mayor afinidad

por el sustrato (Gazzarrini y col., 1999; Ludewig y col., 2002, 2003; Sholenkamp y col., 2002). Rawat y col. (1999) demostraron utilizando también *A. thaliana* que la Gln era la señal que regulaba negativamente la transcripción del gen *AMT1.1*. Esta hipótesis está también apoyada por estudios de la transcripción del gen *LeAMT1.1* en tomate, probable ortólogo del gen *AtAMT1.1* (von Wirén y col., 2000b). Además, el propio ión NH_4^+ podría reprimir a nivel postranscripcional su absorción, puesto que el influjo responde más rápidamente a la represión que los niveles de mRNA del gen *AtAMT1.1* (Rawat y col., 1999). Recientemente, Yuan y col. (2007) sugieren que el estado nutricional de la planta regula a nivel postranscripcional el gen *AtAMT1.1*.

A pesar de que para el gen *LeAMT1.1* en tomate se encuentran resultados similares a *A. thaliana* esto no ocurre con la transcripción del gen *LeAMT1.2*, el cual se induce por la adición de NH_4^+ y aún más por la adición de NO_3^- (Lauter y col., 1996; von Wirén y col., 2000b; Wang y col., 2001). Esta respuesta diferente de los genes *LeAMT1.1* y *LeAMT1.2* podría indicar que se requieren transportadores de NH_4^+ diferentes para detectar la demanda de N por la planta en función de la disponibilidad de este ión en el suelo. Resultados similares han sido encontrados en arroz para los genes *OsAMT1.1* y *OSAMT1.2* (Sonoda y col 2003a; Li y Shi, 2006).

La figura 3 muestra un esquema sencillo en *Arabidopsis thaliana* de la regulación de la expresión del gen *AMT1* por retro-inhibición (Glass y col., 2001).

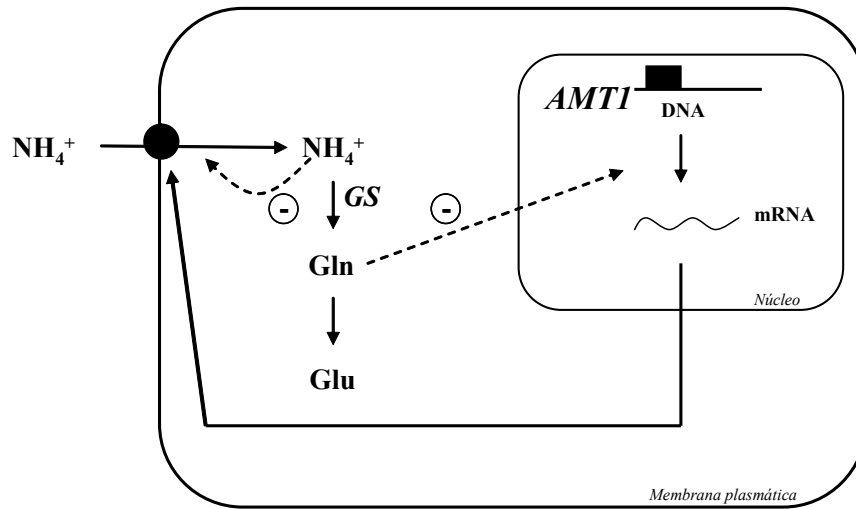


Figura 3. Modelo del proceso de retro-inhibición que regula el influjo del ión NH_4^+ y la transcripción del gen *AMT1*.

Regulación negativa (- - -)

El sistema HATS implicado en el transporte de NH_4^+ se reprime por el propio NH_4^+ . Por otra parte, el gen *AMT1* se reprime por la glutamina producto de la asimilación de los iones NH_4^+ y NO_3^- .

A modo de resumen en la Tabla 1 se muestra como los transportadores de amonio (AMT), estudiados en diferentes especies vegetales, se localizan y se regulan de forma diferente, sugiriendo que las plantas han evolucionado creando nuevos mecanismos de adaptación de transporte de NH_4^+ en función de sus necesidades.

Tabla 1. Regulación de los trasportadores de amonio (*AMT*) de *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicon*, *Oryza sativa*, *Brassica napus* y *Lotus japonicus*

Transportador	Localización mRNA	Regulación mRNA por N	Regulación mRNA por luz o C	Referencia^a
AtAMT1;1	Raíz, hoja, tallo	Represión	Inducción	1, 2, 3, 4, 5
AtAMT1;2	Raíz y hoja	Represión	Inducción	1,4,6
AtAMT1;3	Raíz	Represión	Inducción	1,4
AtAMT2;1	Raíz, hoja y tallo	Represión		6
LeAMT1;1	Raíz y hoja	Represión		7,8
LeAMT1;2	Raíz y hoja	Represión		7,9,10
LeAMT1;3	Hoja	Inducción		7
OsAMT1;1	Raíz y tallo	Inducción/Represión	Constitutivo	11,12,13
OsAMT1;2	Raíz	Inducción/Represión	Constitutivo	11,12,13
OsAMT1;3	Raíz	Represión	Inducción	11,13
OsAMT2;1	Raíz y tallo	Constitutivo		14
OsAMT2;2	Raíz y tallo	Inducción		15
OsAMT3;1	Raíz y tallo			14
BnAMT1;2	Hoja	Constitutivo/Represión		16
LjAMT1;1	Raíz, tallo y nódulos			17
LjAMT2;1	Raíz, tallo y nódulos			18

^a 1, Gazzarrini y col., 1999; 2, Rawat y col., 1999; 3, Gansel y col., 2001; 4, Lejay y col., 2003; 5, Shelden y col., 2001; 6, Sohlenkamp y col., 2002; 7, von Wirén y col., 2000b; 8, Ludewig y col., 2002; 9, Ludewig y col., 2003; 10, Becker y col., 2002; 11, Sonoda y col., 2003a; 12, Sonoda y col., 2003b; 13, Kumar y col., 2003; 14, Suenaga y col., 2003; 15, Li y Shi, 2006; 16, Pearson y col., 2002; 17, Salvemi y col., 2001; 18, Simon-Rosin y col., 2003.

La regulación del LATS ha sido menos estudiada y existe controversia en este sentido, ya que unos autores proponen que está regulado por un mecanismo de retro-inhibición por metabolitos nitrogenados (Kronzucker y col., 1996). Estudios en cebada muestran que no hay cambios en la actividad del LATS en condiciones de carencia (Mäck y Tischner,

1994) y en arroz la actividad del LATS se induce al adicionar NH_4^+ (Wang y col., 1993).

A pesar de todos los estudios realizados, se conoce muy poco sobre los mecanismos específicos de regulación que están implicados en los transportadores de alta y baja afinidad para el ión NH_4^+ (Howitt y Udvardi, 2000; Gansel y col., 2001; Glass y col., 2002). Gansel y col. (2001) sugieren que la absorción del ión NH_4^+ está preferentemente regulada a nivel local por el estado nitrogenado de la raíz ya que su asimilación tiene lugar principalmente en este órgano (Tobin y Yamaya, 2001).

Estudios recientes de Engineer y Kranz, (2007) han mostrado en *A. thaliana* que el gen *AtAMT1.1* podría actuar como sensor para la planta indicándole la carencia de N en el medio. Por otra parte, estos autores también han mostrado que la expresión del gen *AtAMT1.1* es diferente en raíces u hojas en función de la concentración del N presente en el medio.

Por último, algunos trabajos muestran que puede existir un efecto compensatorio entre los genes de la familia *NRT*. Concretamente, en *A. thaliana* se ha encontrado que la expresión del gen *NRT1.1* participa en la expresión del gen *NRT2.1* (Lejay y col., 1999; Zhuo y col., 1999; Cerezo y col., 2001a; Muños y col., 2004). En este sentido, Kaiser y col. (2002) muestran que también existe este efecto por parte de los genes *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3* frente a la ausencia del gen *AtAMT1.1*. Cerezo y col. (2001a) sugieren que puede existir reciprocidad entre los genes de las familias *AMT1* y *NRT2*, ya que han puesto de manifiesto a nivel fisiológico que en plantas mutantes de los genes *AtNRT2.1* y *AtNRT2.2* se produce un incremento de la actividad del HATS y del LATS para el ión NH_4^+ .

1.3 Importancia del nitrógeno en plantas de cítricos

Los iones NO_3^- y NH_4^+ son las dos formas principales de N inorgánico presentes en el suelo que son susceptibles de ser absorbidas por los cítricos. En suelos bien aireados, con un pH próximo a la neutralidad, la nitrificación se produce rápidamente en primavera y verano, cuando la temperatura del suelo es lo suficientemente alta. Por ello, en estas estaciones, la principal forma de nitrógeno absorbible del suelo en las plantaciones de cítricos es el NO_3^- . Sin embargo, se produce también, un suplemento continuo de NH_4^+ por la mineralización de la materia orgánica o por el aporte de fertilizantes amoniacales, de forma que las raíces de los cítricos pueden disponer de ambos tipos de iones.

Los cítricos requieren elevadas cantidades de fertilizantes nitrogenados puesto que el N tiene una influencia mayor que otros nutrientes en su crecimiento (Smith, 1966). La cantidad total de N requerida por los cítricos depende de un gran número de factores, como edad, tamaño, vigor y producción, entre otros. Estudios de Legaz y Primo-Millo (1988a), han revelado que los cítricos necesitan absorber al año alrededor de 10-12 g de N por kilogramo de materia seca, lo que supone para un árbol adulto entre 600 y 800 g de N. Sin embargo, la absorción de estas cantidades por los cítricos no se realiza de modo constante a lo largo del año, sino que es mínima durante el invierno, aumenta en primavera y es máxima durante el periodo de cuajado del fruto, inmediatamente después de la caída de pétalos. Posteriormente, disminuye de forma progresiva durante el verano y otoño. Por otro lado, cuando la absorción de nutrientes se ve disminuida por efecto de una menor disponibilidad en el suelo, o a causa de bajas temperaturas o porque los requerimientos son menores, dentro de la planta se produce translocación de los nutrientes móviles. En las primeras etapas

reproductivas, la mayor parte del N que reciben los órganos reproductivos proviene de hojas viejas y raíces (N de reserva), debido a la baja absorción de N durante el invierno y principios de la primavera, durante la primavera comienza la etapa de mayor absorción de N (Legaz y col., 1995).

En los cítricos, la carencia de nitrógeno, produce una coloración amarillenta de las hojas, poco vigor y brotaciones cortas. Las hojas crecen más pequeñas, de color amarillo acusado en los nervios y con tendencia a caer prematuramente del árbol. La floración se produce de forma intensa, sin embargo, el cuajado se reduce notablemente. Los frutos son de tamaño menor, con piel fina, buen jugo y con tendencia a adelantarse en la maduración. Por otra parte, un exceso de nitrógeno, produce un gran desarrollo del árbol, con hojas grandes y tiernas de color verde oscuro, resultando ser más sensibles al ataque de plagas y enfermedades. Los frutos son de mala calidad con piel gruesa y rugosa, tienen poco contenido en zumo y dan sensación de aspereza, además se retrasa el viraje del color en la maduración (Legaz y Primo-Millo, 1988a).

También en plantas de cítricos, la repuesta a la fertilización nitrogenada está influenciada por el método de riego utilizado, la frecuencia y el tiempo de aplicación del N, así como de los procesos que tienen lugar en el suelo como la nitrificación, desnitrificación, inmovilización, volatilización y lixiviado (Mansell y col., 1986; Feingenbaum y col., 1987; Mooney y Richardson, 1994) y por ello es interesante conocer estos procesos para una mejor aplicación de los fertilizantes. El uso de fertilizantes enriquecidos con ^{15}N ha permitido ampliar el conocimiento sobre sí el destino del fertilizante aplicado es el agua, el suelo o la planta (Legaz y Primo-Millo, 1988b; Martínez y col., 2002; Quiñones y col., 2005).

1.3.1 Absorción del ión NO_3^- y su regulación

En cítricos, los estudios energéticos han revelado que tanto el HATS como el LATS para el ión NO_3^- , al menos a concentraciones moderadas de NO_3^- , requieren que la planta utilice energía para poder llevar a cabo el proceso de captación de los iones desde el suelo. Esta energía es utilizada para acidificar el medio que rodea a la raíz por bombeo activo de H^+ desde el interior de las células radiculares. El gradiente de H^+ generado por la actividad de la H^+ -ATPasa del plasmalema es utilizado para introducir en las células radiculares los iones NO_3^- (Cerezo y col., 2000; Cerezo 2001 y Cerezo y col., 2007)

A nivel cinético las especies de *Citrus* tienen, en común con otras muchas especies vegetales, sistemas diferentes para la absorción de NO_3^- dependiendo de la concentración de este ión en el suelo (Cerezo, 2001; Cerezo y col. 1997, 2000 y 2007). Los cítricos poseen un HATS, que actúa cuando la concentración de NO_3^- en el suelo de cultivo es baja. Este sistema sigue una cinética de Michaelis-Menten y tienen un umbral de saturación de 0.5 a 0.8 mM, siendo éste constitutivo (cHATS). Sin embargo, también se ha encontrado un sistema de transporte de alta afinidad inducible (iHATS) presentando características cinéticas similares al cHATS, excepto en que posee una mayor capacidad de absorción (Cerezo y col., 2007). Asimismo, se ha encontrado un LATS para el ión NO_3^- que por contraposición al HATS necesita cantidades mayores de este ión en el suelo para ser operativo, pero que tiene una mayor capacidad de absorción, lo que permite a las plantas de cítricos cubrir sus necesidades nutricionales. Este sistema posee una cinética lineal y no presenta saturación al menos hasta una concentración externa de NO_3^- de 50 mM (Cerezo y col., 1997).

En cítricos, los estudios sobre la caracterización de la absorción NO_3^- , han mostrado que el HATS, a bajas concentraciones de NO_3^- en el medio, es activado por el ión NO_3^- en la fase inicial e inhibido a más largo plazo, probablemente por el propio ión NO_3^- o por alguno de sus asimilados. En lo concerniente al LATS, éste se reprime cuando las plantas han estado un corto periodo de tiempo sometidas a altas concentraciones de sales nitrogenadas (3 ó 10 mM). Asimismo, los propios metabolitos nitrogenados de la planta como son los aminoácidos, podrían constituir una señal que informará a la parte radicular de las plantas de cítricos, que la parte aérea se encuentra en un buen estado nitrogenado y que no necesita absorber más nitrógeno (Cerezo y col., 2000).

1.3.2 Absorción del ión NH_4^+ y su regulación

En cítricos, el HATS del ión NH_4^+ es dependiente de la energía generada por la H^+ -ATPasa del plasmalema. Sin embargo, para el LATS, parece que la actividad de la H^+ -ATPasa no es estrictamente requerida, sugiriendo que su actividad es llevada a cabo principalmente por un gradiente transmembrana $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (Cerezo y col., 2001b). Estos autores, observaron que el HATS se inhibía a pH alcalino mientras que el influjo mediado por el LATS se estimulaba fuertemente a este pH, lo que indica que el NH_4^+ puede introducirse en la célula a través del sistema HATS, mientras que a través del sistema LATS, entraría el NH_3 a favor de gradiente.

Respecto a la cinética del transporte del ión NH_4^+ , son muy pocos los estudios realizados en especies leñosas. Concretamente, en cítricos, Cerezo y col. (2001b) demostraron que éstos también presentan para la absorción del ión NH_4^+ un modelo bifásico, un HATS, que actúa cuando la concentración de NH_4^+ en el terreno de cultivo es baja, que sigue una cinética

de Michaelis-Menten con un umbral de saturación de 0.5 a 0.8 mM. También se ha encontrado un LATS para el ión NH_4^+ , que por contraposición al HATS necesita cantidades mayores de este ión en el suelo para ser operativo, pero que tiene una mayor capacidad de absorción lo que permite a las plantas de cítricos cubrir sus necesidades nutricionales. Este sistema posee una cinética lineal y no presenta saturación al menos hasta una concentración externa de NH_4^+ de 50 mM. Los parámetros cinéticos para el ión NH_4^+ se ven afectados por el estado nutricional de la planta, concretamente el HATS se induce por carencia de N, mientras que el LATS se reprime. Sin embargo cuando se reestablece el estado nitrogenado, el HATS permanece constante mientras que el LATS se activa, lo que parece indicar que el LATS para el NH_4^+ o al menos uno de sus componentes es inducible por el propio NH_4^+ .

1.4 Justificación del trabajo

Según todo lo expuesto anteriormente, la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento en cítricos se han centrado principalmente en el papel que desempeña el NO_3^- en el crecimiento de las plantas. Sin embargo la importancia del NH_4^+ como una fuente de N para la planta no puede desestimarse por varias razones:

Primero, porque la disponibilidad de NH_4^+ en los suelos suele ser más constante en función del tiempo y del espacio que el NO_3^- , ya que el NO_3^- se lixivia rápidamente por la lluvia y a menudo es indetectable en el suelo (Glass y Siddqi, 1995; Stark y Hart, 1997; Loqué y von Wirén, 2004).

Segundo, la planta utiliza de una forma más eficiente el NH_4^+ . Se suele absorber en una proporción mayor que de NO_3^- cuando ambos iones están presentes a concentraciones similares en el medio externo y su

asimilación requiere un menor aporte de energía por parte de la planta comparada con la que necesita para asimilar NO_3^- (Bloom y col., 1992; Marschner, 1995; Gazzarrini y col., 1999).

Tercero, el NH_4^+ inhibe la absorción de NO_3^- (Lee y Drew, 1989; Aslam y col. 1996, 2001). Debido a esto, en suelos agrícolas cuando ambos iones, NO_3^- y NH_4^+ están presentes, la absorción de NH_4^+ podría estar favorecida debido a la represión de los sistemas de absorción de NO_3^- (Fernández y Cárdenas, 1989; Aslam y col. 1996, 2001; Glass, 2003).

Cuarto, la combinación de ambos iones, NO_3^- y NH_4^+ normalmente, produce un mayor crecimiento de la planta que si únicamente se suministra una de las dos fuentes de N (Edwards y Horton, 1982; Hartman y col., 1986), indicativo de que la contribución del NH_4^+ tiene un efecto positivo en la nutrición de la planta.

Finalmente, está bien documentado que el NH_4^+ es la fuente de N preferida por algunas especies vegetales. En lo que respecta a las especies leñosas, son muy escasos los estudios llevados a cabo sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ a nivel fisiológico, pero principalmente a nivel molecular. Por ello, tiene una particular relevancia investigar como se regulan los mecanismos de absorción del ión NH_4^+ tanto a nivel fisiológico como molecular en plantas de cítricos. Además, el estudio de estos mecanismos en cítricos puede ayudar a reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados con una doble repercusión: económica y medioambiental.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Debido a la importancia del ión NH_4^+ como fuente de N para las plantas y a la falta de información que existe en plantas de cítricos de cómo se regula el influjo del ión NH_4^+ y qué genes están implicados en dicha regulación en función de la modificación del metabolismo del C y del N, el objetivo principal de este trabajo es:

Estudiar como afecta la modificación del metabolismo del C y del N sobre los sistemas de transporte del ión NH_4^+ a nivel fisiológico y molecular en plantas de cítricos.

Para llevar a cabo a este objetivo se realizan los siguientes objetivos específicos y se sigue el siguiente plan de trabajo:

1. Identificar y caracterizar el gen *AMT1* implicado en el transporte del ión NH_4^+ en plantas de cítricos.

Para ello, se comparan las secuencias conocidas del gen *AMT1* en otras especies vegetales y se diseñan cebadores específicos en zonas de elevada homología. Posteriormente, se obtiene la secuencia completa del cDNA y se diseñan nuevos cebadores para determinar, mediante PCR en

Tiempo Real, su nivel de expresión en los diferentes experimentos planteados.

2. Estudiar como afecta la modificación del metabolismo del carbono sobre la regulación de los sistemas de transporte del ión NH_4^+ y la expresión del gen *AMT1*.

Para comprobar si el influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *AMT1* están reguladas por la fotosíntesis o por el ritmo circadiano, se estudia la variación del ciclo día/noche, se elimina el periodo de oscuridad, se reduce la intensidad luminosa y se ve como afectan los azúcares y los ácidos carboxílicos a estos procesos.

3. Estudiar a nivel fisiológico y molecular cuál es la molécula señal que une el metabolismo del C y del N.

Para llevar a cabo este objetivo en las plantas tratadas con azúcares y ácidos carboxílicos, se comprueba cuál de estos compuestos afecta específicamente a los sistemas de transporte del ión NH_4^+ y a la expresión del gen *AMT1*.

4. Estudiar como afecta la modificación del metabolismo del nitrógeno sobre la regulación de los sistemas de transporte del ión NH_4^+ y la expresión del gen *AMT1*.

Para estimar la preferencia por la fuente de N se mide el influjo del ión NH_4^+ en la solución de absorción añadiendo diferentes proporciones de NH_4^+ y NO_3^- . Además, se estudia si el influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *AMT1* están regulados por el N, para ello se aplican diferentes fuentes de N, se modifica su concentración y se someten las plantas a condiciones limitantes de N.

5. Determinar los parámetros cinéticos del influjo del ión NH_4^+ para estudiar si los mecanismos del transporte del ión NH_4^+ están regulados a nivel transcripcional y/o postranscripcional .

Para desarrollar este objetivo, se estudia si se modifican los parámetros cinéticos del influjo del ión NH_4^+ , al variar el metabolismo del C y del N. Para ello, se modifican las condiciones de intensidad de luz y en condiciones limitantes de N.

6. Identificar y caracterizar el gen *NRT2* implicado en el transporte del ión NO_3^- en plantas de cítricos.

Este objetivo se lleva a cabo para ver si existe un efecto recíproco entre la expresión de los genes *NRT2* y *AMT1* en función de la fuente de N. Para ello, se secuencian el cDNA del gen *NRT2* tal y como se ha descrito para el *AMT1* y se estudia su expresión en plantas tratadas con NH_4^+ y NO_3^- a diferentes concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas en los experimentos procedían de semillas de citrange Troyer (híbrido de *Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* Raf) germinadas en vermiculita en cámara de cultivo. La temperatura se mantuvo entre 25 – 27 °C durante el día y 18 – 20 °C durante la noche, con una humedad relativa entre 60-65 %, un fotoperiodo de 16 horas de luz y una intensidad luminosa de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las semillas se regaron dos veces por semana con agua. Transcurridas seis semanas las plantas se regaron con solución de crecimiento, que consiste en la solución nutritiva de Hoagland, modificada por Legaz (1993), carente de nitrógeno, complementada con 1 mM de NH_4NO_3 y adicionada de 1.5 mM de K_2SO_4 y 3 mM CaSO_4 para compensar la ausencia de 3 mM KNO_3 y 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en la solución (Tabla 2). La solución nutritiva se ajustaba a pH 5.8-6.2 con KOH 1 M.

Las plantas de 3 meses de edad, con características similares de altura, peso y estado de brotación se mantenían en cultivo hidropónico durante 7 días en la solución nutritiva de crecimiento para su adaptación a la hidroponía hasta el inicio de los experimentos. Las soluciones hidropónicas

se airearon vigorosamente con el burbujeo proporcionado por bombas de aire y se renovaron cada dos días.



Imagen 1. Plantas de cítricos crecidas en cámara de cultivo.



Imagen 2. Plantas de cítricos en hidroponía con solución de crecimiento.

Tabla 2. Solución nutritiva de Hoagland (1950) modificada por Legaz (1993)

Solución de crecimiento	
Macronutrientes	Concentración (g/L)
KNO ₃	0.4
Ca(NO ₃) ₂	0.82
MgSO ₄	0.4
H ₃ PO ₄	0.07
Micronutrientes	Concentración (mg/L)
MnSO ₄	9.15
H ₃ BO ₃	2.86
ZnSO ₄	2.2
MoO ₃	0.09
CuSO ₄	0.11
Fe-EDTA	67.0

3.2 Medida del influjo de ¹⁵N

Para medir el influjo de los iones ¹⁵NH₄⁺ y ¹⁵NO₃⁻ en los diferentes experimentos, se tomaron 6 plantas procedentes del cultivo hidropónico en el que permanecían. Las plantas se transfirieron a una solución 0.1 mM de CaSO₄ durante 1 min para lavar el exceso de solución nutritiva en las raíces. A continuación se pasaron a la solución de influjo que contenía ¹⁵NH₄⁺ o ¹⁵NO₃⁻ (98 % átomos ¹⁵N en exceso) a diferentes concentraciones, según el ensayo, durante 5 min y finalmente, a una solución 0.1 mM de CaSO₄ durante 1 min para eliminar el exceso de ¹⁵N de las raíces (Gazzarrini y col., 1999). La solución de influjo o de marcaje está compuesta por la solución nutritiva de Hoagland modificada, carente de N, y adicionada de

$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o K^{15}NO_3 a diferentes $[^{15}\text{NH}_4^+]_0$ o $[^{15}\text{NO}_3^-]_0$ (concentración externa del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ o $^{15}\text{NO}_3^-$ en la solución de influjo) según corresponda.



Imagen 3. Procedimiento experimental de medida del influjo del ¹⁵N.

Las plantas de cítricos permanecen 1 min en la solución de CaSO₄, 5 min en la solución de marcaje con ¹⁵N y por último 1 min en la solución de lavado de CaSO₄.

Normalmente, y si no lo requería el ensayo, las medidas de influjo se realizaron 8 horas después del inicio del periodo de luz.

Después del periodo de marcaje, las raíces se separaron del tallo, y se secaron en estufa, a 65 °C durante 48 h, se molieron, se pesaron y el contenido en ¹⁵N en las raíces se determinó mediante espectrometría de masas (Clarkson y col., 1996), utilizando un espectrómetro de masas de flujo continuo, acoplado a un autoanalizador elemental C/N como se indica en el apartado 3.7.1.

Basándonos en estudios previos (Cerezo y col., 2000; 2001b), para determinar el influjo del ión NH_4^+ o del ión NO_3^- mediado por el HATS el influjo se midió a $[^{15}\text{NH}_4^+]_0$ o $[^{15}\text{NO}_3^-]_0$ de 0.2 mM y para determinar el influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS+LATS el influjo se midió a 5 mM de $[^{15}\text{NH}_4^+]_0$ o $[^{15}\text{NO}_3^-]_0$. Los valores del LATS se obtienen restando los valores correspondientes del HATS al HATS+LATS.

Los valores del influjo de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ ó $^{15}\text{NO}_3^-$ se expresaron en $\mu\text{mol de }^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS de raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$ o $\mu\text{mol de }^{15}\text{NO}_3^- (\text{g PS de raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$.

3.3 Determinación de los parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$

Para determinar los parámetros cinéticos de la absorción del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en diferentes condiciones, se determinó el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ como se ha descrito en el apartado 3.2. En este caso, las concentraciones de $[\text{}^{15}\text{NH}_4^+]_0$ en las soluciones de influjo fueron de 0.02 a 30 mM.

Las representaciones gráficas de los dobles inversos de los influjos *versus* las $[\text{}^{15}\text{NH}_4^+]_0$, se sometieron a un análisis de regresión lineal. Las constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) se calcularon a partir de estas ecuaciones de regresión en un intervalo de concentración entre 0.02 mM a 1 mM (Segel 1975). A concentraciones $[\text{}^{15}\text{NH}_4^+]_0$ superiores de 1 mM, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se debe a la participación de dos sistemas de transporte diferentes (HATS y LATS) (Cerezo y col., 2001b). Por ello, para estimar el influjo debido únicamente al sistema LATS se calcula la diferencia entre el influjo medido a una $[\text{}^{15}\text{NH}_4^+]_0 > 1$ mM y la $V_{m\acute{a}x}$ calculada para el sistema HATS.

3.4 Identificación y caracterización de los cDNAs de los genes *AMT1* y *NRT2* en plantas de cítricos

3.4.1 Diseño de cebadores

Para obtener un fragmento de un nuevo miembro de la familia de los genes *AMT* así como otro de la familia de los genes *NRT* en cítricos, se diseñaron los cebadores adecuados, a partir de zonas de nucleótidos conservadas de elevada homología en otras especies vegetales. En primer

lugar, se alinearon las secuencias de los genes *AMT1* y *NRT2* de otras especies vegetales depositadas en la base de datos de secuencias GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) utilizando el programa informático ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson y col., 1994). Concretamente, se alinearon para el gen *AMT* las secuencias de *Oryza sativa* (*OsAMT1*, AF001505), *Solanum lycopersicon* (*LeAMT1*, X92854) y *Arabidopsis thaliana* (*AtAMT1*, X75879) y para el gen *NRT2* se alinearon las secuencias de *Lotus japonicus* (AJ292342), de *Brassica napus* (AJ293028) y de *Solanum lycopersicon* (AF092655). Se seleccionaron las zonas de mayor homología y se diseñaron los cebadores AMT-F¹ y AMT-R¹ y NRT-F¹ y NRT-R¹ (Tabla 3) utilizando el programa informático Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen y col., 2000). Los cebadores utilizados en este trabajo son suministrados por la empresa Biotest Diagnósticos S.L., Valencia. Posteriormente, se comparó su homología con las secuencias de los genes conocidos en otras especies vegetales mediante los programas informáticos FASTA <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> (Pearson y col., 1988) y BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (Altschul y col., 1997).

3.4.2 Obtención de un fragmento de ambos genes

Una vez diseñados los cebadores se realizó una PCR para obtener un fragmento de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2*. Para ello, se extrajo DNA genómico de hoja como se indica en el apartado 3.8.1., siguiendo el protocolo del kit comercial REDEExtract-N-AmpTM Plant PCR (Sigma, XNA-P, Sigma-Aldrich S.A., Madrid). El medio de reacción en un volumen final de 20 µl contiene: 10 µl de la solución REDEExtract, 2.7 µl de cada uno de los cebadores AMT-F¹ y AMT-R¹ o NRT-F¹ y NRT-R¹ a una concentración

de 3 μ M cada uno, 0.6 μ l de agua desionizada y por último 4 μ l de DNA genómico de hoja.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 35 ciclos que constaban de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 55 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 2 min, seguida de una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) a voltaje constante (90 V) utilizando el tampón TAE (1X) (Tris-Acetato 40 mM, pH = 8.5, EDTA 2 mM) (Sambrook y col., 1989). Una vez comprobado que se obtiene una única banda específica para cada producto de PCR se procede a su purificación utilizando el kit comercial NucleoTrap® Gel Extract (Clontech, Palo Alto, CA, USA) y posteriormente, ambos fragmentos se secuenciaron por la empresa Sistemas Genómicos S.A (Valencia, España).

3.4.3 Determinación de la secuencia completa del cDNA de ambos genes

Para obtener las secuencia completas de los cDNAs, una vez obtenido el fragmento del gen *CitAMT1* de 576 pb y del *CitNRT2* de 314 pb, se amplificaron los extremos 3' y 5' mediante la técnica RACE,⁶ utilizando el kit comercial SMART™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

La técnica consiste en obtener una librería de cDNAs, en los que se ha introducido unos adaptadores de secuencia conocida en sus dos extremos. Estos adaptadores nos permiten amplificar desde el fragmento de cDNA

⁶ RACE del inglés Rapid Amplification of cDNA Ends

conocido por nosotros hasta ambos extremos del gen mediante PCR, utilizando un cebador de la secuencia conocida y un cebador del adaptador de la librería. La amplificación se realiza mediante PCR *touchdown*. Este tipo de PCR aumenta la especificidad debido a que empieza con unas condiciones muy restrictivas que van disminuyendo escalonadamente.

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar los fragmentos de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* y llevar a cabo las técnicas de PCR en Tiempo Real y RACE

Nombre	Secuencia 5'-3'
AMT-F ¹	CCATGCAGCTCGGTTTCGCTAT
AMT-R ¹	AATCCATACCATCCAAACCA
NRT-F ¹	CTCGCGACGTTTGTGTCGTG
NRT-R ¹	AGATCCATGTCCTGTAGTTTGTTAC
AMT-F ²	CCCACCTCCAACCTTCGACTA
AMT-R ²	CAGAACCAATGGGAGACGAC
NRT-F ²	ATGTGGTGCAACTCCATTCA
NRT-R ²	ACCACAGCACCTTGGAGAAC
18S-F	GAACAACCTGCGAAAGCATTTCG
18S-R	CCTGGTAAGTTTCCCCGTGTTG
AMT-F ³	GTCCGATTCTTGGACCTTCGATGTAC
AMT-R ³	CCTCAAGTCCTTCCCCACCTCCAACCTT
NRT-F ³	ATGTGGTGCAACTCCATTCACCGCC
NRT-R ³	ACCACAGCACCTTGGAGAACTTATC
SMART II™ 5'- CDS 3'- CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG (T) ₂₅ VN AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN
UPM (Universal Primer Mix)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT CTAATACGACTCACTATAGGGC

(N=A,C,G o T; V=A,G o C)

Los cebadores específicos AMT-R³ y AMT-F³ y NRT-R³ y NRT-F³ necesarios (Tabla 3), se diseñaron siguiendo los consejos indicados en el kit, de manera que tuvieran 25 pb como mínimo, una temperatura de fusión igual o mayor de 65 °C y un % de GC entre 50 y 70 %.

En primer lugar, se extrajo el RNA total como se indica en el apartado 3.8.2 a partir de raíces de cítricos mantenidas durante 3 días bajo condiciones de carencia de N.

Posteriormente, se procedió a la síntesis del cDNA. Para ello, se obtuvieron dos librerías diferentes de cDNAs, una para aislar el extremo 5' y otra para aislar el extremo 3' de cada gen.

Todos los reactivos utilizados son suministrados en el kit comercial, excepto el RNA total y los cebadores específicos utilizados (AMT-R³ y AMT-F³ o NRT-R³ y NRT-F³).

En tubos eppendorf de 0.5 ml se añadieron, para la síntesis de cDNAs 5', los siguientes reactivos en un volumen final de 10 µl: 3 µl RNA (1 µg RNA total), 1 µl 5'-CDS (12 µM) y 1 µl SMART IITM (12 µM) (Tabla 3) y para la síntesis de cDNAs 3': 4 µl RNA (1 µg RNA total) y 1 µl 3'-CDS (12 µM) (Tabla 3).

Ambas reacciones se mezclaron con pipeta y se incubaron a 70 °C durante 2 minutos en un termociclador (Mastercycler eppendorf, Alemania). Posteriormente, los dos tubos se colocaron en hielo durante 2 minutos y se les añadió a cada uno 2 µl de tampón 5X First-Strand, 1 µl de DTT (20 mM), 1 µl de la mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µl de la retrotranscriptasa PowerScriptTM. La mezcla se incubó a 42 °C durante 1.5 horas en el termociclador. Por último, las librerías de cDNAs obtenidas se diluyeron añadiendo 20 µl del tampón Tricina-EDTA [Tricina-KOH 10mM (pH = 8.5) y EDTA 1 mM].

Una vez obtenidas las librerías de cDNA se procedió a la amplificación de ambos extremos 5' y 3' mediante PCR. El medio de reacción en un volumen final de 50 µl contiene: 34.5 µl de H₂O para PCR, 5 µl del tampón 10X Advantage 2 PCR, 1 µl de la mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µl de 50X Advantage 2 Polimerase Mix. La mezcla se homogeneizó mediante vortex, con cuidado de no producir burbujas y posteriormente se le aplicó un pulso de centrifuga en la microcentrifuga (Digiten 20-R, Orto Alresa, España).

Para amplificar el extremo 5', al medio de reacción, se le añadió 2.5 µl del cDNA 5'RACE, 5 µl del cebador UPM (10X) y 1 µl del cebador AMT-R³ (10 µM) o 1 µl del cebador NRT-R³ (10 µM) para el cDNA del *CitAMT1* o del *CitNRT2*, respectivamente.

Para amplificar el extremo 3', al medio de reacción, se añadió le 2.5 µl del cDNA 3'RACE, 5 µl del cebador UPM (10X) y 1 µl del cebador AMT-F³ (10 µM) o 1 µl del cebador NRT-F³ (10 µM) para el cDNA del *CitAMT1* o del *CitNRT2*, respectivamente.

Las condiciones de PCR para obtener el cDNA del *CitAMT1* fueron las siguientes: 5 ciclos de 94 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min; 5 ciclos de 94 °C durante 30 s, 70 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min y por último, 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min.

Las condiciones de PCR para obtener el cDNA del *CitNRT2* fueron: 5 ciclos de 94 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min; 5 ciclos de 94 °C durante 30 s, 70 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min y por último, 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min.

Una vez amplificados los fragmentos, se separaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (1%) en tampón TAE (1X) a un voltaje constante de 90 V. Una vez comprobado para cada gen que se obtenía una única banda específica para cada amplificado (5' y 3') se

procedió a la purificación de ambas bandas a partir del gel de agarosa utilizando el kit comercial NucleoTrap® Gel Extract (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Los fragmentos de cDNA obtenidos se secuenciaron por la empresa Sistemas Genómicos S.A (Valencia, España).

Para ambos genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se obtuvieron dos fragmentos, uno del extremo 5' y otro del extremo 3' y uniendo ambos fragmentos se obtuvo la secuencia completa de su cDNA.

Ambas secuencias se introdujeron en el Genbank y se les asignó los siguientes códigos de acceso DQ887678 y EF579917 para *CitAMT1* y *CitNRT2*, respectivamente.

3.4.4 Localización de la expresión del gen *CitAMT1* en diferentes órganos de las plantas de cítricos

Para determinar en que órganos de las plantas de cítricos se expresa el gen *CitAMT1* y si su expresión varía en condiciones de carencia de N, las plantas crecidas como se indica en el material vegetal se separaron en 2 grupos. Un grupo se mantuvo en solución de Hoagland modificada (control) y el otro grupo se mantuvo durante 3 días en solución nutritiva de Hoagland carente de N.

Después de tres días se separaron en diferentes fracciones: hojas, tallos, raíz primaria y raíz secundaria de cada planta y se congelaron en nitrógeno líquido, conservándose las muestras a -80 °C para los posteriores estudios de expresión génica. En este experimento, se extrajo el RNA total como se indica en el apartado 3.8.2 de hoja, tallo y raíz y se determinó la expresión del gen *CitAMT1* en todos los tejidos como se indica en los apartados 3.8.3 y 3.8.4.

3.4.5 Análisis informático de las secuencias de cDNA y proteínas en los bancos de datos

Existen numerosas bases de datos disponibles en la red informática que permiten realizar estudios comparativos y predicciones acerca de una gran variedad de aspectos importantes para el estudio de secuencias de cDNA y proteínas no caracterizadas.

A continuación se detallan las bases de datos y los servidores automáticos disponibles en la red, que se han utilizado en el análisis de las secuencias de cDNA de *CitAMT1* y *CitNRT2* así como de las secuencias de sus proteínas derivadas.

Bases de datos

Secuencias de cDNA y de proteínas derivadas

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)

EMBL, Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)

Servidores

ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

Características de la proteína como composición de aminoácidos, masa molecular, etc...

PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>)

Alineamiento de secuencias (identificación de proteínas homólogas), localización de las hélices transmembrana, hidrofobicidad, etc...

3.5 Efecto de la modificación del metabolismo del C sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1*

Para llevar a cabo los experimentos que se detallan a continuación, se utilizaron plantas de citrange Troyer crecidas de la forma habitual descrita en el apartado 3.1. Se aplicaron diferentes tratamientos de luz y se adicionaron azúcares o ácidos carboxílicos a la solución de crecimiento al inicio del periodo de oscuridad, del modo que se describe a continuación en los puntos 3.5.1; 3.5.2; 3.5.3 y 3.5.4.

El influjo del ión NH_4^+ se midió como se indica en el apartado 3.2 a una $[\text{NH}_4^+]_0$ de 0.2 mM y 5 mM, y en los casos en los que se determinaron los parámetros cinéticos, el intervalo de $[\text{NH}_4^+]_0$ fue de 0.02 mM a 30 mM.

Una vez finalizados estos experimentos, el material vegetal se procesó y se midió el influjo de $^{15}\text{NH}_4^+$ por espectrometría de masas como se indica en el apartado 3.2. También se almacenaron raíces a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para los posteriores análisis de expresión del gen *CitAMT1*, como se indica en el apartado 3.8.4 y otras se liofilizaron para la posterior determinación de azúcares solubles en la raíz como se indica en el apartado 3.7.2.

3.5.1 Efecto del ciclo día/noche

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ para el HATS y el LATS se determinó cada dos horas durante un día completo con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad como se indica en el apartado 3.2. En las mismas condiciones se midió la tasa fotosintética como se indica en el apartado 3.7.3.

Paralelamente, se realizó un experimento en el que las plantas de cítricos se mantuvieron en las mismas condiciones pero con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad durante su crecimiento. Las medidas de influjo del ión NH_4^+ también se realizaron cada dos horas durante un día completo.

3.5.2 Efecto de la luz continua

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. El día del experimento, al finalizar el periodo de luz (16 h) se siguieron manteniendo las plantas con luz, eliminándose el periodo de oscuridad. Al final del experimento las plantas habían permanecido un total de 24 horas con luz. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ también se midió cada dos horas durante el día completo.

Paralelamente, se realizó un experimento en el que las plantas de cítricos se mantuvieron durante 3 días bajo condiciones de luz continua. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió cada dos horas al tercer día.

3.5.4 Efecto de la intensidad de luz

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1. Cinco días antes del experimento, las plantas se separaron en tres grupos diferentes. Un grupo de plantas se mantuvo bajo las condiciones normales de intensidad luminosa ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y los otros 2 grupos de plantas se cubrieron con mallas, de manera que la intensidad luminosa disminuyó a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió en las condiciones de intensidad luminosa correspondientes.

En este apartado, también se estudió el efecto de la intensidad de luz sobre los parámetros cinéticos del influjo del ión NH_4^+ como se indica en el apartado 3.3. Para ello, las plantas de cítricos se mantuvieron bajo las diferentes condiciones de intensidad de luz (200, 120 o 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante tres días. El influjo del ión NH_4^+ se midió al tercer día en las distintas condiciones de intensidad luminosa.

3.5.3 Efecto de la adición de azúcares y de ácidos carboxílicos

Para ello se siguió el procedimiento previamente descrito por Lejay y col. (1999). Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. Al inicio del periodo de oscuridad se adicionó a la solución nutritiva sacarosa, glucosa o fructosa a una concentración de 1 % (p/v) y los ácidos orgánicos 2-oxoglutarato o malato a una concentración de 10 mM. En todos los experimentos en que se adicionan metabolitos carbonados, se añade a la solución nutritiva 50 mg/l de penicilina y 25 mg/l de cloranfenicol para evitar el crecimiento bacteriano. Además de los correspondientes controles sin metabolito, se utilizaron controles con ambos antibióticos. El influjo del ión NH_4^+ se midió en ausencia de luz a las 3, 5 y 7 horas del inicio del periodo de oscuridad.

3.6 Efecto de la modificación del metabolismo del N sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1*

Para llevar a cabo los experimentos que se detallan a continuación, se utilizaron plantas de citrange Troyer crecidas de la forma habitual descrita en el apartado 3.1. En estos experimentos, se aplicaron diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ tanto en las soluciones de influjo como en las soluciones de crecimiento. También se han hecho experimentos de carencia de N total o carencia de NH_4^+ y de adición de NH_4^+ o NO_3^- en condiciones de de-represión y de-inducción, del modo que se describe a continuación en los puntos 3.6.1; 3.6.2; 3.6.3; 3.6.4 y 3.6.5.

El influjo del ión NH_4^+ o de ión NO_3^- se midieron como se indica en el apartado 3.2 a una $[\text{NH}_4^+]_0$ o de $[\text{NO}_3^-]_0$ de 0.2 mM y 5 mM según corresponda. En los casos en los que se determinaron los parámetros cinéticos, el intervalo de $[\text{NH}_4^+]_0$ fue de 0.02 mM a 30 mM.

Una vez finalizados estos experimentos, el material vegetal se procesó y se midió el $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$ por espectrometría de masas como se indica en el apartado 3.2. También se almacenaron raíces a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para los posteriores análisis de expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* como se indica en el apartado 3.8.4.

3.6.1 Determinación de la preferencia por la fuente de N

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. En este experimento, las soluciones de influjo (soluciones de marcaje isotópico), se prepararon a partir de solución nutritiva de Hoagland carente de N y se adicionó una concentración de N total de 0.2 mM y 5 mM en las siguientes proporciones

(100; 75:25; 50:50; 25:75) bien de $^{15}\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ / KNO_3 o bien de $^{15}\text{KNO}_3$ / $\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$. El influjo de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$ se midió como se indica en el apartado 3.2.

3.6.2 Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de NH_4^+ y NO_3^-

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. En este experimento las plantas se separaron en 5 grupos diferentes, las cuales se someten a los diferentes tratamientos durante 3 días. Las plantas del grupo 1 se mantuvieron en solución nutritiva de Hoagland carente de N y adicionada de $\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ a una concentración final de N de 1 mM. Los grupos 2, 3 y 4 se mantuvieron en la solución nutritiva de Hoagland carente de N y adicionada de $\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ y KNO_3 a una concentración final de N total de 1 mM en las proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$: 75:25, 50:50 y 25:75. Por último, las plantas del grupo 5 se mantuvieron en solución de Hoagland carente de N y adicionada únicamente de KNO_3 a una concentración de 1 mM. Estas soluciones se renovaron cada día y las medidas de influjo de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$ se realizaron al tercer día como se indica en el apartado 3.2.

3.6.3 Efecto de la carencia de NH_4^+ y de la carencia de N

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. En este experimento se separaron las plantas en 3 grupos. Un grupo se mantuvo durante 1 semana en solución de crecimiento (control), el grupo 2 en solución nutritiva de Hoagland carente de N (carencia N) y el tercer grupo en solución de

Hoagland carente de N y adicionada de 1 mM de KNO_3 como única fuente de N (carencia de NH_4^+). Se midió el influjo del ión NH_4^+ diariamente durante siete días.

En este apartado, también se estudió el efecto de la carencia total o de carencia de NH_4^+ sobre los parámetros cinéticos del influjo del ión NH_4^+ , del modo que se indica en el apartado 3.3. Para ello, las plantas de cítricos se separaron en los 3 grupos indicados en el caso anterior y se mantuvieron durante 3 días en ambas condiciones de carencia. El influjo del ión NH_4^+ se midió al tercer día.

3.6.4 Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-represión

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. Posteriormente, las plantas se separaron en 5 grupos y permanecieron durante 3 días en solución de Hoagland carente de N, de manera que los sistemas de transporte de NH_4^+ estuvieran de-reprimidos. Una vez transcurridos los 3 días el grupo 1 permaneció en las mismas condiciones, a los grupos 2 y 3 se les adicionó NH_4^+ a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente y a los grupos 4 y 5 se les adicionó NO_3^- a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente. El influjo del ión NH_4^+ se midió a las 24 horas.

3.6.5 Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-inducción

Las plantas se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 3.1 hasta el inicio del experimento. Posteriormente, las plantas se separaron en 5 grupos y permanecieron durante 7 días en solución de Hoagland carente de N de manera que los sistemas de transporte de NH_4^+ estuvieran de-inducidos. Una vez transcurridos los 7 días, el grupo 1 permaneció en las mismas condiciones, a los grupos 2 y 3 se les adicionó NH_4^+ a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente y a los grupos 4 y 5 se les adicionó NO_3^- a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente. El influjo del ión NH_4^+ se midió a las 24 horas.

3.7 Determinaciones analíticas

3.7.1 Análisis del ^{15}N

Para realizar estos análisis se utiliza un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas acoplado a un analizador elemental de flujo continuo (Euro-EA Analizador Elemental, EuroVector S.P.A., Italia; y Isoprime Espectrómetro de masas; GV Instruments, UK).

Se pesan entre 0.5 y 4 mg de cada muestra sólida de raíz en una pequeña cápsula de estaño y se introducen en el carro del cargador de muestras sólidas. Cuando el carro se pone en funcionamiento, la muestra cae en el reactor de combustión que está sometido a 1020 °C.

La cápsula y la muestra se funden en una atmósfera temporalmente enriquecida con oxígeno, donde el estaño fomenta la combustión

instantánea. Los productos de la combustión son llevados a un catalizador de oxidación de CrO_3 por un flujo constante de helio. Tras esto se pasan por un reactor de reducción a $650\text{ }^\circ\text{C}$ que contiene gránulos de cobre, donde los óxidos de nitrógeno (NO , N_2O y N_2O_2) son reducidos a N_2 y el exceso de oxígeno es eliminado. Las especies gaseosas resultantes (CO_2 , N_2 , H_2O) atraviesan un filtro de perclorato magnésico para eliminar el agua. El CO_2 y el N_2 que quedan pasan por una columna de cromatografía corta donde son separados por tiempo. A continuación pasan por un detector de conductividad térmica, y salen por la válvula que conecta el analizador elemental con el espectrómetro de masas, donde la proporción de isótopos de carbono y nitrógeno se determinarán en función de un pulso del gas de referencia de composición conocida.

El esquema de la figura 4 describe los componentes del sistema, cuando se utiliza para análisis de C, N o ^{15}N .

A continuación, las moléculas gaseosas son ionizadas. Los iones producidos forman un haz que se acelera gracias a un campo eléctrico y finalmente son detectados en el colector.

Para calcular el valor de los influjos, expresados en $\mu\text{mol (g PS de raíz)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, utilizamos la siguiente expresión:

$$\text{Influjo} = A \times B \times 892,857$$

A = % de N elemental. (dato obtenido del autoanalizador)

B = % de ^{15}N . Este valor se obtiene tras restar al % de ^{15}N medido (dato obtenido del autoanalizador) la abundancia natural de ^{15}N . (% ^{15}N - 0.3642166)

$$892,857 = \text{factor de conversión para obtener } \mu\text{mol (g PS raíz)}^{-1} \text{ h}^{-1}.$$

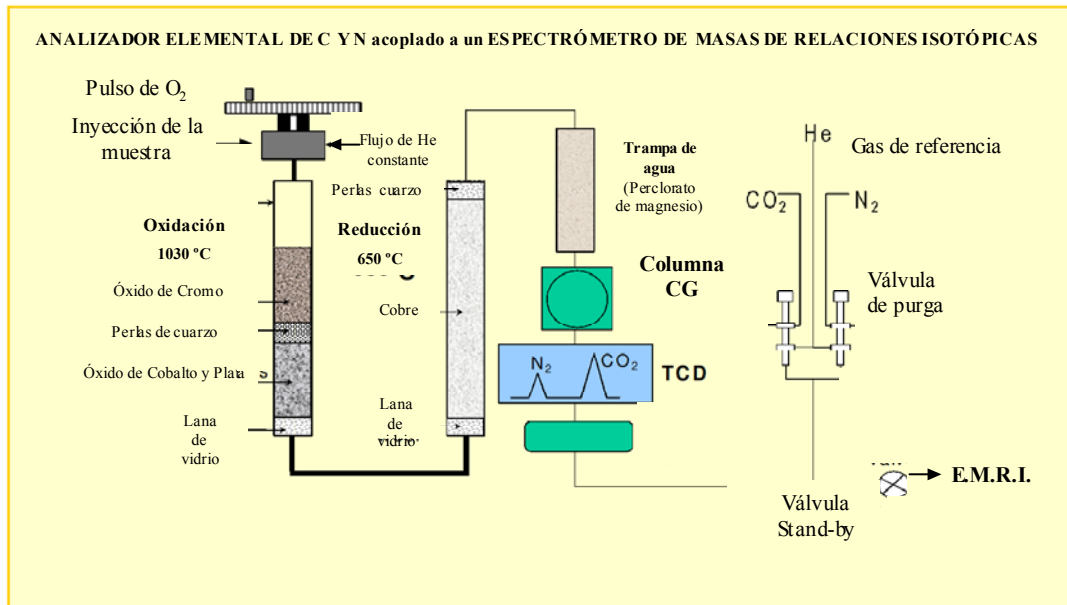


Figura 4. Esquema de los componentes del sistema de análisis elemental acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas cuando se utiliza para análisis de C, N o ¹⁵N.

3.7.2 Determinación del contenido de azúcares solubles

La determinación de azúcares solubles se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Mehouchi y col. (1995). Para ello, se toman 100 mg de peso seco (PS) de las muestras de raíz liofilizada y molida y se extraen con 1.0 ml de etanol al 80 %. Posteriormente, el extracto se purifica secuencialmente mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico (Dowex 50X8-100 y Dowex 1X4-400, Sigma-Aldrich, USA). Una vez purificado se pasa a través de una cartucho C₁₈ Sep-Pak (Waters-Millipore, Barcelona, España) y se analizan mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Waters-Millipore, Mildford, MA) equipado con una columna para análisis de carbohidratos (4.6 x 250 mm,

Waters-Millipore) y un refractómetro como sistema de detección. La sacarosa, glucosa y fructosa se identificaron mediante sus tiempos de retención y la concentración se calculó utilizando curvas de calibración preparadas mediante patrones comerciales. Los valores se expresaron como mg azúcar/ g PS.

3.7.3 Determinación de la tasa de fotosintética

La tasa fotosintética se midió cada dos horas durante un día completo en cámara de cultivo en las condiciones descritas en el material vegetal con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Para ello se tomaron 5 hojas de una tamaño medio de 5 plantas de cítricos diferentes y se realizaron cinco medidas consecutivas en cada hoja a intervalos de 30 segundos después de un periodo de adaptación de 5 min. Para realizar las medidas se utilizó un analizador de gases con detector de infrarrojos (IRGA) portátil (LC-PRO+, ADC bioscientific, Hoddesdon, UK). Las medidas se realizaron utilizando una radiación artificial de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura dentro de la cámara de medida era de $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y el flujo molar de aire se fijó en $150 \mu\text{mol s}^{-1}$. Todas las medidas se realizaron a una concentración de CO_2 y vapor de agua atmosféricas.

3.8 Determinaciones moleculares

3.8.1 Extracción de DNA genómico

En la extracción de DNA genómico se utilizó el kit comercial REExtract-N-AmpTM Plant PCR que proporciona Sigma (XNA-P). Se

cortó un disco de hoja joven de naranjo de aproximadamente 0.5 cm de diámetro y se introdujo en un eppendorf, se añadió 100 µl del Tampón de Extracción que proporciona el kit procurando que el disco de hoja quedara completamente cubierto. Se agitó y se incubó a 95 °C en un baño de agua durante 10 minutos. Después se añadieron 100 µl de Solución de Dilución y se almacenó a 4 °C, hasta su posterior uso.

3.8.2 Extracción de RNA total

En la extracción del RNA total, se utilizó el kit comercial Kit Total Quick RNA (TALENT, Italia). Las raíces congeladas a -80° C, se pulverizaron y homogeneizaron con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. Una vez homogeneizado el tejido, se pasaron a un tubo Eppendorf y se añadieron 450 µl de la solución de lisis dejándose en agitación a temperatura ambiente durante 5 min. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 250 µl de etanol absoluto, que se mezclaron con ayuda de la pipeta. A continuación se añadieron 50 µl de resina TQ-RNA y también se mezclaron con la pipeta. Pasados 30 segundos, la mezcla se transfirió a una columna de purificación y se centrifugó 30 segundos a 10.000 rpm. Se descartó el filtrado y se añadieron 700 µl de solución de lavado A. Luego se centrifugó 30 segundos a 10.000 rpm. Se repitió la operación pero sustituyendo la solución A por la solución de lavado B. En el siguiente paso, la columna se puso en un tubo nuevo y se lavó con 500 µl de etanol al 75 % y se centrifugó 1 minuto a 10.000 rpm. Se colocó de nuevo la columna en un tubo eppendorf nuevo y se añadieron, sobre la resina, 50 µl de agua tratada con DEPC precalentada a 65° C y se mantuvo en agitación durante 5 minutos a 65° C. Finalmente se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 rpm y se

recuperó el RNA total. El RNA se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

3.8.3 Síntesis de la primera cadena de cDNA mediante transcripción reversa

El RNA total extraído se sometió a transcripción reversa utilizándose el kit comercial Omniscript® Reverse Transcription (QIAGEN, USA).

En primer lugar, se cuantificó espectrofotométricamente el RNA total. En cada reacción de transcripción inversa se tomó $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA y para evitar posibles contaminaciones con DNA genómico, se añadió $1\text{ }\mu\text{l}$ de DNasa I ($1\text{u}/\mu\text{g}$ RNA) (RQ1 DNasa libre de RNasas, Promega, USA) y $1\text{ }\mu\text{l}$ del tampón suministrado con la DNasa I y se completó hasta $11\text{ }\mu\text{l}$ con H_2O libre de RNasas. La mezcla se incubó en el termociclador a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Pasado ese tiempo, se adicionó $1\text{ }\mu\text{l}$ del tampón de parada de la reacción, también suministrado junto a la DNasa I y se incubó de nuevo en el termociclador a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min, desnaturalizándose de este modo la DNasa I.

Una vez eliminados los posibles restos de DNA genómico se procedió a la síntesis del cDNA. Cada reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de $20\text{ }\mu\text{l}$ que contenía $2\text{ }\mu\text{l}$ de Tampón RT (10X), $2\text{ }\mu\text{l}$ de dNTPs (5 mM), $2\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla de Hexámeros degenerados ($10\text{ }\mu\text{M}$) (Random Primer, BioLabs, NewEngland), $1\text{ }\mu\text{l}$ del inhibidor de RNasas ($10\text{ u}/\mu\text{l}$) (RNaseOUT™, Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen, USA) y $1\text{ }\mu\text{l}$ de la retrotranscriptasa Omniscript. Se mezclaron bien todos los componentes con pipeta y por último se añadieron los $12\text{ }\mu\text{l}$ de RNA tratado con la DNasa I. Se homogeneizó en vortex durante 2 s y posteriormente se

dio un pulso de centrifuga para recoger los posibles restos que hubiesen quedado en la pared de los tubos y se incubó en el termociclador a 37 °C durante 60 min. El cDNA obtenido se guardó en congelador a -20 °C hasta su uso.

3.8.4 Análisis de la expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* mediante PCR en Tiempo Real

La cuantificación por PCR en tiempo real permite monitorizar la reacción al mismo tiempo que ésta tiene lugar, ya que los procesos de amplificación y detección del DNA se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. La detección comienza durante los primeros ciclos de amplificación en el momento que la cantidad de producto amplificado sobrepasa un determinado umbral. La detección se realiza mediante un lector de fluorescencia incorporado al termociclador. En la reacción de PCR se adiciona un fluorocromo o agente intercalante que aumenta notablemente la emisión de fluorescencia cuando se une a DNA de doble hélice. El aumento de la concentración de DNA en cada ciclo de la PCR se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Durante los primeros ciclos de PCR se produce muy poco cambio en la señal de fluorescencia, formándose la línea base de la curva de amplificación. Cuando se produce un incremento en la intensidad de la fluorescencia sobre esta línea base se inicia el proceso de detección. Ligeramente por encima de esta línea base puede fijarse el umbral de detección de fluorescencia (*Threshold*). El parámetro C_T (*Threshold Cycle*) o valor umbral se define como el ciclo de amplificación en el que tiene lugar este incremento significativo en la intensidad de la señal de fluorescencia y en el que se inicia la detección.

Existen dos maneras de estimar la concentración de DNA de una muestra problema mediante esta técnica: la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. En este trabajo se ha realizado la cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método de comparación de C_T . En la cuantificación relativa es necesario el uso de un control endógeno que permite la normalización de la cantidad de cDNA añadida en cada reacción. En nuestro caso como control endógeno se ha utilizado el RNA ribosomal *18S*. Para poder comparar las C_T del gen de estudio (gen diana) y la C_T del control endógeno (constitutivo) la eficiencia de la amplificación de ambos fragmentos mediante PCR debe de ser aproximadamente igual.

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* por PCR a tiempo real, se empleó el kit comercial QuantiTect™SYBR Green de la casa comercial (QUIAGEN, USA) siguiéndose las instrucciones del fabricante, y el termociclador SmartCycler II (Cepheid).

En este caso se diseñaron cebadores que amplificaban fragmentos para el *CitAMT1* de 175 pb, para el *CitNRT2* de 185 pb y para el *18S* de 206 pb, ya que amplificados de tamaño pequeño mejoran la eficiencia de la técnica. Los cebadores utilizados fueron AMT-R² y AMT-F² para amplificar el gen el *CitAMT1* y NRT-R² y NRT-F² para amplificar el gen el *CitNRT2* y 18S-R y 18S-F (Tabla 3) para amplificar el rRNA *18S*.

En primer lugar, se realizaron curvas de calibrado relativas para cada gen, realizando diluciones 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 de una mezcla de cDNAs de diferentes muestras. A continuación se preparó el medio de reacción para la PCR en Tiempo Real con 12,5 µl de QuantiTect SYBR Green PCR, 0.75 µl de cada cebador específicos para cada gen (10 µM) y 9 µl H₂O libre de RNasas. La mezcla se agitó bien y se dio un pulso de centrifuga. Al medio de reacción con un volumen final de 23 µl se le

añadieron 2 μ l del cDNA diluido. Se centrifugaron y se introdujeron en el termociclador.

El programa utilizado para la amplificación fue el siguiente: 95° C durante 15 min seguidos de 40 ciclos de 95° C durante 15 s, 60° C durante 30 s y 72° C durante 30 s para *CitAMT1* y rRNA *18S* y 95 °C durante 15 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s para *CitNRT2*.

Para demostrar que la eficiencia de la amplificación de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* respecto rRNA *18S* (control endógeno) son aproximadamente iguales, se representaron los valores del log de la concentración (en unidades relativas) *versus* C_T y se comprobó que las diferencias entre las pendientes eran menores de 0.1 para ambos genes.

El nivel de la abundancia relativa de los transcritos (ΔC_T) se determinó restándole a la C_T del gen diana la C_T del control endógeno de acuerdo con la función $\Delta C_T = C_{T \text{ diana}} - C_{T \text{ 18S}}$. El nivel relativo de expresión se calculó con la siguiente fórmula: la expresión relativa del gen de interés es $2^{-\Delta C_T}$, donde $\Delta C_T = C_{T \text{ diana}} - C_{T \text{ 18S}}$. Para comparar los niveles de expresión entre las plantas control y las plantas tratadas, la función utilizada es $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ (tratamiento)}} - \Delta C_{T \text{ (control)}}$. El efecto del tratamiento se calculó con la fórmula $2^{-\Delta \Delta C_T}$.

Finalmente se verifica la existencia de una única temperatura de fusión de los productos amplificados para confirmar la especificidad del producto génico formado y que no existe apareamiento entre los cebadores utilizados (*primer-dimer*) o productos no específicos.

3.9 Tratamientos estadísticos

En los diferentes tratamientos estadísticos se ha realizado la comparación de medias utilizando el test de diferencia significativa mínima (LSD) con un nivel de confianza del 95 %. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático StatGraphics Plus v.2.1 para el entorno de Windows. Cada experimento se ha realizado como mínimo tres veces y en los experimentos de expresión génica se muestra el más representativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Identificación y caracterización de los cDNAs de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* implicados en el transporte de NH_4^+ y NO_3^- , respectivamente

4.1.1 Obtención de un fragmento de ambos genes

Para poder aislar y caracterizar los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se compararon las secuencias de ambos genes *AMT1* y *NRT2* de otras especies vegetales conocidas y se diseñaron cebadores específicos en zonas de elevada homología. Un fragmento de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se amplificó mediante PCR, utilizando los cebadores diseñados, a partir de DNA genómico extraído de hojas jóvenes de plantas de citrange Troyer. En la figura 5, se muestra la banda correspondiente al fragmento de 576 pb obtenido para el gen *CitAMT1*. El fragmento se secuenció y se confirmó su identidad. El análisis de la secuencia reveló una elevada homología con la familia de genes *AMT1* de las especies vegetales utilizadas en el diseño de

los cebadores, del 77.35 % con el gen *OsAMT1* de *Oryza Sativa* (AF001505), del 71.65 % con el gen *LeAMT1* de *Solanum Lycopersicon* (X92854) y del 71% con el gen *AtAMT1* de *Arabidopsis thaliana* (X75879).

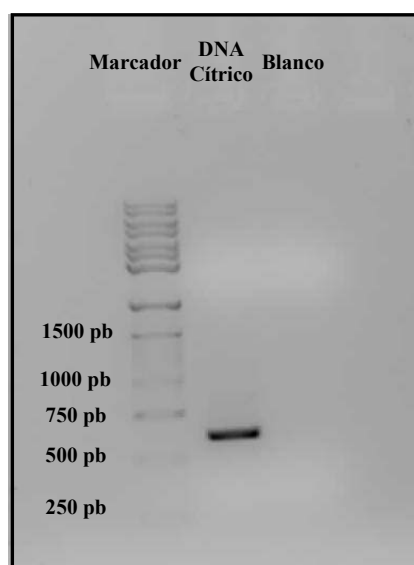


Figura 5. Electroforesis de la amplificación de un fragmento del gen *CitAMT1* a partir de DNA genómico.

Gel de agarosa 1.2 %. Pocillo 1, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Francia); Pocillo 2, citrange Troyer; Pocillo 3, control negativo (sin DNA). La PCR se ha realizado a 35 ciclos con T^a de 55 °C (Apartado 3.4.2 de Material y Métodos).

En la figura 6, se muestra el fragmento del gen *CitNRT2*, del que también se ha obtenido una única banda. El fragmento obtenido de 314 pb, se secuenció y se confirmó su identidad. El análisis de las secuencias reveló una elevada homología, con la familia de genes *NRT2* de las especies vegetales utilizadas en el diseño de los cebadores, del 79.53 % con el gen *LjNRT2* de *Lotus japonicus* (AJ292342) y de 74.83 % con los genes *BnNRT2*

de *Brassica napus* (AJ293028) y *LeNRT2* de *Solanum lycopersicon* (AF092655).

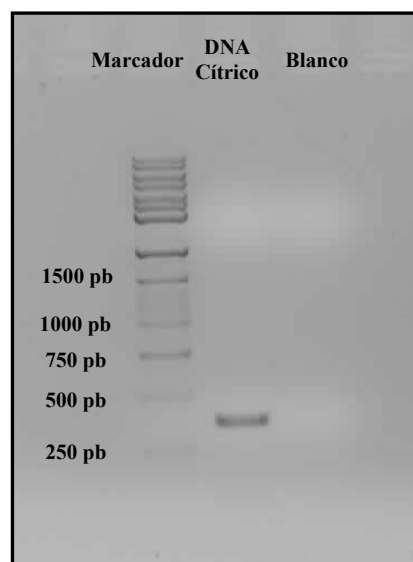


Figura 6. Electroforesis de la amplificación de un fragmento del gen *CitNRT2* a partir de DNA genómico.

Gel de agarosa 1.2 %. Pocillo 1, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Francia); Pocillo 2, citrange Troyer; Pocillo 3, control negativo (sin DNA). La PCR se ha realizado a 35 ciclos con T^a de 55 °C (Apartado 3.4.2 de Material y Métodos).

4.1.2 Determinación de la secuencia completa del cDNA de ambos genes

Una vez obtenidos los fragmentos de 576 pb y 314 pb se amplificaron los extremos 3' y 5' terminales mediante la técnica de amplificación rápida de los extremos terminales del cDNA, RACE, obteniéndose la secuencia completa de ambos cDNAs como se indica en el apartado 3.4.3 del Material y Métodos. La electroforesis en gel de agarosa

reveló una única banda específica para cada extremo amplificado del cDNA de *CitAMT1* (Figura 7) y del cDNA del *CitNRT2* (Figura 8).

En el caso del cDNA de *CitAMT1*, los fragmentos se secuenciaron, obteniéndose un fragmento de 734 pb para el extremo 5' y otro de 1301 pb para el extremo 3'. Ambos fragmentos contienen una zona de solapamiento por lo que la secuencia completa del gen es de 1762 pb y se ha denominado *CitAMT1*.

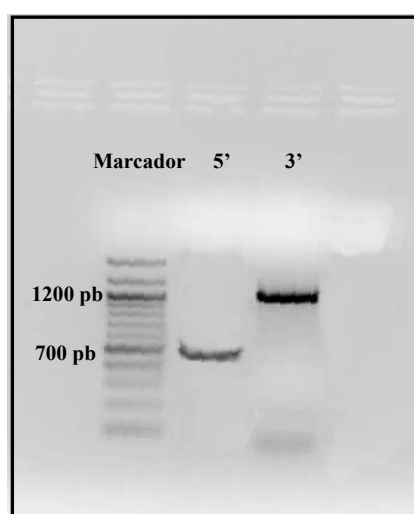


Figura 7. Electroforesis de los extremos 5' y 3' del cDNA del gen *CitAMT1*.

Gel de agarosa 1 %. Pocillo 1, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Francia); Pocillo 2, extremo 5' del gen *CitAMT1*; Pocillo 3, extremo 3' del gen *CitAMT1*. En la PCR *touchdown* se han realizado 5 ciclos de 94 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min; 5 ciclos de 94 °C durante 30 s, 70 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min y por último, 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min.

La secuencia de cDNA de *CitAMT1* se ha depositado en la base de datos GenBank y se le ha asignado el código de acceso DQ887678.

En el caso del cDNA de *CitNRT2*, los fragmentos se secuenciaron, obteniéndose un fragmento de 897 pb para el extremo 5' y otro de 1253 pb para el extremo 3'. Ambos fragmentos contienen una zona de solapamiento

por lo que la secuencia completa del gen es de 1759 pb y se ha denominado *CitNRT2*.

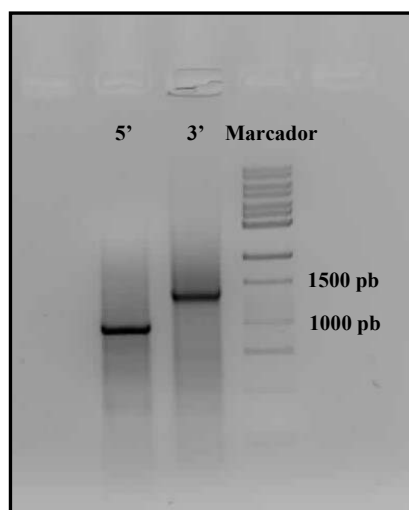


Figura 8. Electroforesis de los extremos 5' y 3' del cDNA del gen *CitNRT2*.

Gel de agarosa 1 %. Pocillo 1, extremo 5' del gen *CitNRT2*; Pocillo 3, extremo 3' del gen *CitNRT2*; Pocillo 3, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Francia). En la PCR *touchdown* se han realizado 5 ciclos de 94 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min; 5 ciclos de 94 °C durante 30 s, 70 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min y por último, 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 30 s, y 72 °C durante 3 min.

La secuencia de cDNA de *CitNRT2* se ha depositado en la base de datos GenBank y se le ha asignado el código de acceso EF579917.

4.1.3 Análisis de las secuencias de aminoácidos

El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *CitAMT1* reveló la presencia de una pauta de lectura abierta de 1506 pb, obteniéndose un polipéptido de 502 aminoácidos cuyo peso molecular es de aproximadamente 53.5 KDa.

La secuencia del cDNA del *CitNRT2* muestra una pauta de lectura abierta de 1590 pb que codifican un polipéptido de 530 aminoácidos cuyo peso molecular es de aproximadamente 57.8 KDa.

La composición en aminoácidos expresada en porcentaje molar de los transportadores CitAMT1 y CitNRT2 se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición en aminoácidos de los polipéptidos CitAMT1 y CitNRT2

Aminoácido	CitAMT1		CitNRT2	
	Número de residuos	Porcentaje molar	Número de residuos	Porcentaje molar
Ala (A)	62	12.4	54	10.2
Cys (C)	9	1.8	9	1.7
Asp (D)	18	3.6	15	2.8
Glu (E)	11	2.2	13	2.5
Phe (F)	36	7.2	43	8.1
Gly (G)	59	11.8	53	10
His (H)	10	2.0	10	1.9
Ile (I)	24	4.8	32	6
Lys (K)	16	3.2	17	3.2
Leu (L)	50	10.0	43	8.1
Met (M)	10	2.0	23	4.3
Asn (N)	18	3.6	17	3.2
Pro (P)	15	3.0	24	4.5
Gln (Q)	10	2.0	12	2.3
Arg (R)	15	3.0	26	4.9
Ser (S)	40	8.0	42	7.9
Thr (T)	31	6.2	34	6.4
Val (V)	35	7.0	36	6.8
Trp (W)	12	2.4	13	2.5
Tyr (Y)	21	4.2	14	2.6

```

LjAMT1      ---MALPECSAANLAQLIGPNATDAAAVAGFICDQFTAVGQRFSDTAFAVDSTYLLFSAY 57
AtAMT1      -----MSCSATDLAVLLGPNAT---AAANYICGQLGDVNNKFIDTAFADNTYLLFSAY 51
CitAMT1     MARATSLSCSADLLAGFLGPNATNASSAASLICSQLEAINNKFTDTAYAVDSTYLLFSAY 60
CsAMT1      ---MASLTCSDQLAQLFGSNTTNA--AATYICDHFTAVSQKFSDAASIDSTYLLFSAY 56
:           ***  *  :*:*:*  *  *  :  :*: *  *  :*:*****

LjAMT1      LVFSMQLGFAMLCAGSVRAKNTMNIMLTNVLDAAAGGLFYLLFGFAFAFGAPSNNGFIGRH 117
AtAMT1      LVFSMQLGFAMLCAGSVRAKNTMNIMLTNVLDAAAGGLFYLLFGYAFAGSPSNNGFIGRH 111
CitAMT1     LVFSMQLGFAMLCAGSVRAKNTMNIKLTNVLDAAAGGLFYLLFGFAFAFGTSPSNNGFIGRH 120
CsAMT1      LVFSMQLGFAMLCAGSVRAKNTLNIMLTNVLDAAAGAIFFYLLFGFAFAFGSPSNNGFIGSH 116
*****: *  *****:*****:***** *

LjAMT1      FFGLKDVPTVAFDYSYFLYQWAFATAAAGITSGSIAERTQFVAYLIYSSFLTGFVYPPVVS 177
AtAMT1      YFGLKDIPTASADYSNFLYQWAFATAAAGITSGSIAERTQFVAYLIYSSFLTGFVYPPVVS 171
CitAMT1     NFALKSFPTSNFDYSYFLYQWAFATAAAGITSGSIAERTQFVAYLIYSSFLTGFVYPPVVS 180
CsAMT1      FFALKSIPTSSFDYSFFLQWAFATAAAGITSGSIAERTQFAAYLIYSAFLTGFVYPPVVS 176
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

LjAMT1      HFWSGDGWASATNT-GNLLFGTGVDFAGSGVVHMGVGGVAGLWALIEGPRIGRFDHAG 236
AtAMT1      HFWSVGDWASAPFRDGDLLFTGGAIDFAGSGVVHMGVGGIAGLWALIEGPRIGRFDNGG 231
CitAMT1     HFWSVGDWASASNT-GDLLFGSGVIDFAGSGVVHMGVGGIAGLWALIEGPRIGRFDMSG 239
CsAMT1      HFWSGDGWASASNT-NHLLFGSGVIDFAGSGVVHMGVGGIAGLYGAFIEGPRIGRFDNPG 235
***** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

LjAMT1      RAVSLRGHSASLVVLGTFLWFGWYGFNPGSFTKILSAYDSGNYGQWSAIGRTAVTTTL 296
AtAMT1      RAIALRGHSASLVVLGTFLWFGWYGFNPGSFKILVYETGTYNQWSAVGRTAVTTTL 291
CitAMT1     QSV-IRGHSASLVVLGTFLWFGWYGFNPGSFTKILSAYNTGSYYQWSAIGRTAVTTTL 298
CsAMT1      QSVTIKHSASLVVLGTFLWFGWYGFNPGSFTKIANPYTSGSYGQWSAVGRTAVTTTL 295
:  :  :  :*****:***** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

LjAMT1      AGCTAALTTLFGKRIISGHWNVTDVCNGLLGGFAAITAGCSVVEPWAAIVCGFVAAVLI 356
AtAMT1      AGCTAALTTLFGKRLLSGHWNVTDVCNGLLGGFAAITGGCSVVEPWAAICGFVAALVLI 351
CitAMT1     AGCTAALTTLFGKRIISGHWNVTDVCNGLLGLAIAITAGCSVVEPWAAIVCRFGAAVLI 358
CsAMT1      AGSTAALTTLFLNRVVS GHWNVTDVCNGLLGGFAAITAGCSVVEPWAAIVCGLVAALVLI 355
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

LjAMT1      ACNMLAEKRVYDDPLEAAQLHGCGGAWGIIFALFAKEEYVNVQVYPGKPRPYGLFMGG 416
AtAMT1      GCNKLAEKLYDDPLEAAQLHGCGGAWGLIFALFAQEKYLNQIYGNKPRPHGLFMGG 411
CitAMT1     ACNKLAEKAKYDDPLEAAQLHGCGGAWGVIIFALFAKEKFVNEVYPGKPRPYGLFMGG 418
CsAMT1      GCNKVAERVKFDDPLEAAQLHGCGGAWGVIIFALFASEKYVNEVYPGKSDRPGYGLMGG 415
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

LjAMT1      GKLLGAHVIIQILVIGWVSATMGPLFFILNKMKLLRISTEDELACMDLTRHGGFAYAYED 476
AtAMT1      GKLLGAQLIQIIVIIGWVSATMGTLEFFILKMKLLRISSEDEMAGMDMTRHGGFAYMYFD 471
CitAMT1     GKLLAAHVIIQILVVAGWVSATMGPLFFVHLKLLRISPEDEMAGMDLTRHGGFAYVYHD 478
CsAMT1      GRLLAAHVIIQIVVIGWVSATMGPLFFVHLKLLRISAEDEIAGMDMTRHGGFAYVYQY 475
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

LjAMT1      DES---HKPGIQLRKIEPNSSSTPSAES----- 501
AtAMT1      DDE---SHKAIQLRRVEPRSPSPSGANTPTPV 501
CitAMT1     DDDVQSN--GIQLRKIEPTATPSSV----- 502
CsAMT1      HDEDES NKLGMQMRKIDPEDKS----- 497
:  .  .  :*:*:*: *  :

```

Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los transportadores de la familia AMT1.

Lotus japonicus, *LjAMT1.1* (AAG24944); *Camellia sinensis*, *CsAMT1.1* (ABI17640); *Arabidopsis thaliana*, *AtAMT1.1* (P54144) y *Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*, *CitAMT1* (ABI52423).

Los asteriscos indican aminoácidos idénticos; dos puntos indican posiciones con sustituciones conservadas y un punto indica sustituciones semiconservadas.

Cuando se compara la secuencia de aminoácidos del transportador CitAMT1 de cítricos con otros AMT1.1, se ha obtenido la identidad mayor con las siguientes especies vegetales: del 85% con *Lotus japonicus*, del 80.9 % con *Camelia sinensis* y del 80 % con *Arabidopsis thaliana*. En la figura 9 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los transportadores AMT1 de estas especies con el CitAMT1.

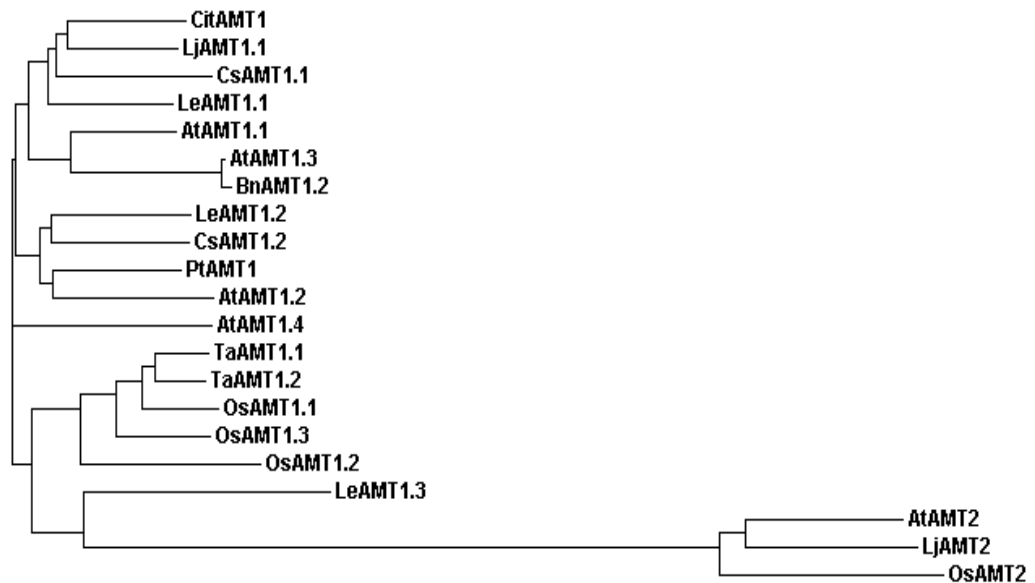


Figura 10. Análisis filogenético de los transportadores AMT en especies vegetales.

Análisis basado en el alineamiento de secuencias de aminoácidos mediante el programa informático CLUSTALW. Las proteínas alineadas son CitAMT1 (ABI52423) de *Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*; LjAMT1.1 (AAG24944), LjAMT2 (AAL08212) de *Lotus japonicus*; CsAMT1.1 (ABI176401), CsAMT1.2 (BAD29977) de *Camelia sinensis*; AtAMT1.1 (P54144), AtAMT1.2 (AAD54639), AtAMT1.3 (AAD54638), AtAMT1.4 (CAA2298), AtAMT2 (Q9M6N7) de *Arabidopsis thaliana*; LeAMT1.1 (P58905), LeAMT1.2 (O04161), LeAMT1.3 (AAG11397) de *Solanum lycopersicon*; PtAMT1 (AAS19467) *Populus tremula x Populus tremuloides*; BnAMT1.2 (AAG28780) de *Brassica napus*; TaAMT1.1 (AAR27052), TaAMT1.2 (AAS19467) de *Triticum aestivum*; OsAMT1.1 (Q947N1), OsAMT1.2 (AAL05612); OsAMT1.3 (BAD21572), OsAMT2 (BAB64105) de *Oryza sativa*

De la comparación de las secuencias de las proteínas de la familia AMT se ha elaborado el dendrograma mostrado en la figura 10 donde se agrupan los diferentes miembros en base a su semejanza. El análisis filogenético de los transportadores AMT en especies vegetales muestra que *CitAMT1* está muy relacionado con las especies vegetales *Lotus japonicus* y *Camelia sinensis*.

Asimismo, cuando se compara la secuencia de aminoácidos del transportador CitNRT2 de cítricos con otros NRT2.1, se ha obtenido con las siguiente especies vegetales una mayor identidad: del 89 % con *Prunus persica* y *Glicine max* y del 87 % con *Populus tremula x Populus tremuloides*. En la figura 11 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los transportadores NRT2 de estas especies con el CitNRT2.

Comparando las secuencias de las proteínas de la familia NRT se ha elaborado el dendrograma mostrado en la figura 12 donde se agrupan los diferentes miembros en base a su semejanza. El análisis filogenético de los transportadores NRT2 en especies vegetales muestra que *CitNRT2* está muy relacionado con otro frutal, *Prunus persica*.

<i>PpNRT2.1</i>	MAEVEGEPGSSMHGVTGREQTFVAFSVASPIVPTDPTAKFDLPVDSEHKAKVKIIFSLANP	60
<i>PtNRT2.1</i>	MADVEGSPGSSMHGVTGREQSFVAFSVASPTVPTDPTAKFALPVDSEHKAKVKIIFSFANP	60
<i>CitNRT2</i>	MADIEGSPGSSMHGVTGREPAFVAFSVASPAVPTDPTAKFALPVDSEHKAKVKIIFSLANP	60
<i>GmNRT2.1</i>	MAEIEGSPGSSMHGVTGREQTFVAFSVASPIVPTDPTAKFALPVDSEHKAKVKIIFSLANP	60
	:..*.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***	
<i>PpNRT2.1</i>	HMRTFHLWSISFFTCFVSTFAAAPLVPIIRDNLNLTQDIGNAGVASVSGSIFSRVLMGA	120
<i>PtNRT2.1</i>	HMRTFHLWSISFFTCFVSTFAAAPLVPIIRDNLNLTQSDIGNAGVASVSGSIFSRVLMGA	120
<i>CitNRT2</i>	HMRTFHLWSISFFTCFVSTFAAAPLVPIIRDNLNLTQADIGNAGVASVSGSIFSRVLMGA	120
<i>GmNRT2.1</i>	HMRTFHLWSISFFTCFVSTFAAAPLVPIIRDNLNLTQSDIGNAGVASVSGSIFSRVLMGA	120
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
<i>PpNRT2.1</i>	VCDLLGPRYGCAFLIMLSAPTVMCFVSDAGGYLAVRFMIGFSLATFVSCQYWMSTMFN	180
<i>PtNRT2.1</i>	VCDLLGPRYGCAFLIMLSAPTVMCFVSDAGGYLAVRFMIGFSLATFVSCQYWMSTMFN	180
<i>CitNRT2</i>	VCDLLGPRYGCAFLIMLSAPTVMCFVSDAGGYLAVRFMIGFSLATFVSCQYWMSTMFN	180
<i>GmNRT2.1</i>	VCDLLGPRYGCAFLIMLSAPTVMCFVSDAGGYLAVRFMIGFSLATFVSCQYWMSTMFN	180
	.**.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
<i>PpNRT2.1</i>	SKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLLMLPLVFDIIGRVGATPPTAWRIAFFIPGWLHVIMGI	240
<i>PtNRT2.1</i>	SKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLVMPVLYELIKRAGSTFSAWRIAFFVPGWLHVIMGI	240
<i>CitNRT2</i>	SKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLLMLPLVYDIIRRCGATPPTAWRIAFFVPGWMLHVIMGI	240
<i>GmNRT2.1</i>	SKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLLMLPLVYELIKRAGATPPTAWRIAFFVPGWMLHVIMGI	240
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
<i>PpNRT2.1</i>	MVLTGLQDLPDGNLALQKKGVDKQFQSKVLWHAVTNYRTWIFVLLYGYSMGVELSTDN	300
<i>PtNRT2.1</i>	LVLNGLQDLPDGNLALQKKGVDKQFQSKVLWYAVTNYRTWIFVLLYGYSMGVELSTDN	300
<i>CitNRT2</i>	LVLNGLQDLPDGNLALQKKGVDKQFQSKVLWYAITNYRTWIFVLLYGYSMGVELSTDN	300
<i>GmNRT2.1</i>	LVLNGLQDLPDGNLALQKKGVDKQFQSKVLWYAVTNYRTWIFVLLYGYSMGVELSTDN	300
	:.**.*.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***	
<i>PpNRT2.1</i>	VIAEYFYDRFNLKLTAGIIAATFGMANLVARPFGGYFSDVAARYFGMRGLWVWILQT	360
<i>PtNRT2.1</i>	VIAEYFYDRFNLKLTAGIIAATFGMANLVARPFGGYFSDVAARYFGMRGLWVWILQT	360
<i>CitNRT2</i>	VVAEYFYDRFNLKLTAGIIAATFGMANLVARPFGGYASDMAARYFGMRGLWVWILQT	360
<i>GmNRT2.1</i>	VIAEYFYDRFNLKLTAGIIAATFGMANLVARPFGGYASDMAARYFGMRGLWVWILQT	360
	*.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***	
<i>PpNRT2.1</i>	LGGVFCIWLGRANSLPIAVFAMILFSVGAQAACGATFGIIPFISRRSLGIISGLTGAGGN	420
<i>PtNRT2.1</i>	LGGVFCIWLGRANSLPIAVTAMILFSVGAQAACGATFGIIPFISRRSLGIISGLTGAGGN	420
<i>CitNRT2</i>	MGGAFIWLGRANSLPIAVLAMILFSVGAQAACGATFGIIPFISRRSLGIISGLTGAGGN	420
<i>GmNRT2.1</i>	LGGVFCIWLGRANSLPIAVLAMILFSVGAQAACGATFGIIPFISRRSLGIISGLTGAGGN	420
	:.**.*.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***	
<i>PpNRT2.1</i>	FGSGLTQLVFFSSSAFSTATGLSLMGVMIVCCTLPVTLVHFPQWGMFLPPSKDVVKSTE	480
<i>PtNRT2.1</i>	FGSGLTQLVFFSSSLSTAAGLSWGMVIVCCTLPVTLVYFPQWGMFFPPSKDVVKSTE	480
<i>CitNRT2</i>	FGSGLTQLVFFSKTKFSTAQGLSWGMVIVACTLPVTLVHFPQWGMFFPPSKDVVKSTE	480
<i>GmNRT2.1</i>	FGSGLTQLVFFSTSKFSTATGLSLMGVMIVACTLPVSVVHFPQWGMFLPPSKDVVKSTE	480
	*****.***.:.***.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***	
<i>PpNRT2.1</i>	EYYAAEWNEEEKQKGLHQQLRFAENSRSERGRRRVASAPTPPNTTPSHV	530
<i>PtNRT2.1</i>	ESYYASEWDEDEKQKGLHQQLRFAENSRSERGRRIASAPTPPSTTPNRV	530
<i>CitNRT2</i>	EYYAAEWNEEEKQKGLHQQLRFAENSRSERGRRRKASAPTPPNTTPAHV	530
<i>GmNRT2.1</i>	EYYTSEWNEEEKQKGLHQQLRFAENSRSERGRKRVASAPTPPNATPTHV	530
	*.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***.:.***	

Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los transportadores de la familia NRT2.

Glicine max, *GmNRT2* (AAC09320); *Prunus persica*, *PpNRT2.1* (BAD02939); *Populus tremula x Populus tremuloides*, *PtNRT2.1* (CAG26716) y *Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*, *CitNRT2* (ABQ57241).

Los asteriscos indican aminoácidos idénticos; dos puntos indican posiciones con sustituciones conservadas y un punto indica sustituciones semiconservadas.

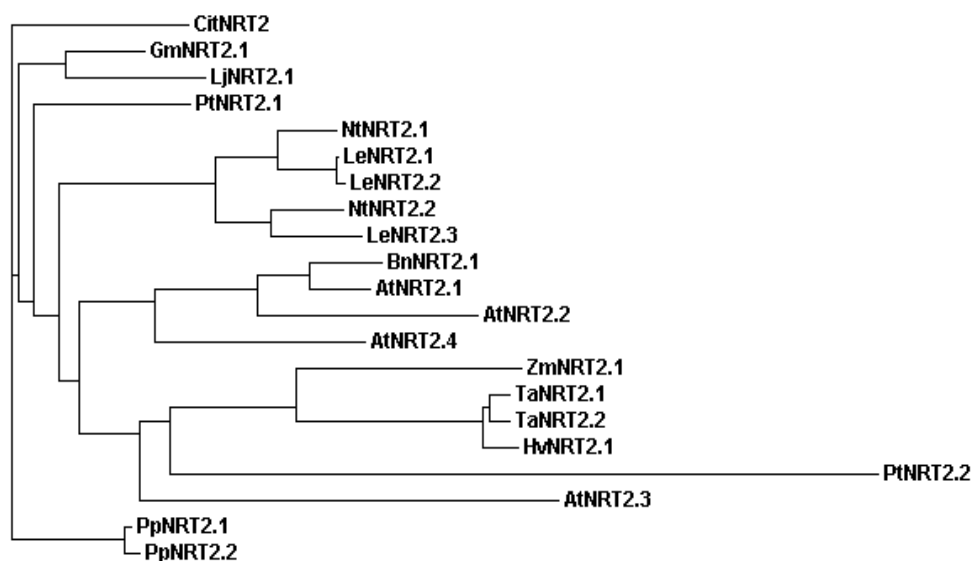


Figura 12. Análisis filogenético de los transportadores NRT2 en especies vegetales.

Análisis basado en el alineamiento de secuencias de aminoácidos mediante el programa informático CLUSTALW. Las proteínas alineadas son CitNRT2 (ABQ57241) de *Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*; GmNRT2 (AAC09320) de *Glicine Max*; PpNRT2.1 (BAD02939), PpNRT2.2 (BAD04063) de *Prunus persica*; LjNRT2 (CAC35729) de *Lotus japonicus*; NtNRT2.1 (CAD89798), NtNRT2.2 (CAD89799) de *Nicotiana tabacum*; AtNRT2.1 (NP_172288), AtNRT2.2 (NP_172289), AtNRT2.3 (NP_200886), AtNRT2.4 (NP_200885) de *Arabidopsis thaliana*; LeNRT2.1 (AAF00053), LeNRT2.2 (AAF00054), LeNRT2.3 (AAK72402) de *Solanum lycopersicon*; PtNRT2.1 (CAG26716), PtNRT2.2 (CAG26717) de *Populus tremula x Populus tremuloides*; BnNRT2 (CAC05338) de *Brassica napus*; TaNRT2.1 (AAK19519), TaNRT2.2 (AAG01172) de *Triticum aestivum*; ZmNRT2 (AAT66252) de *Zea may*; HvNRT2 (AAD28364) de *Hordeum vulgare*.

4.1.4 Estudio teórico de la topología

El análisis de hidrofobicidad de las secuencias de aminoácidos así como la localización de los dominios transmembrana muestra que la proteína CitAMT1 presenta 11 dominios transmembrana con el extremo N-terminal

extracitosólico y el extremo C-terminal citosólico y la proteína CitNRT2 presenta 12 dominios transmembrana con los extremos N y C terminales citosólicos, así como un gran lazo central entre los dominios 6 y 7 de 37 aminoácidos (Figuras 13 y 14).

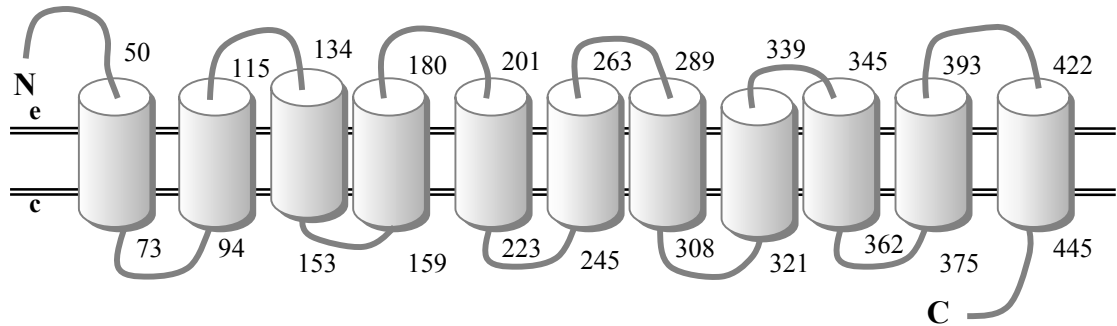


Figura 13. Modelo de la topología del transportador CitAMT1.

N y C son los dominios amino y carboxi terminales, respectivamente, c y e son citosol y espacio extracitosólico, respectivamente.

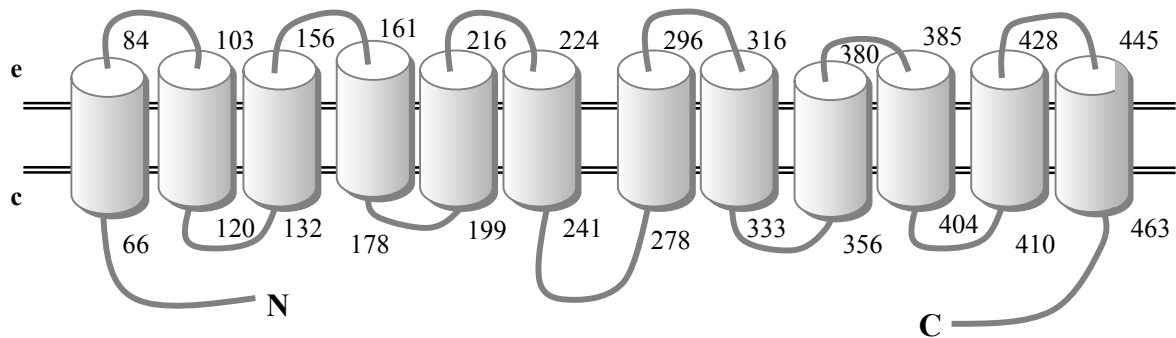


Figura 14. Modelo de la topología del transportador CitNRT2.

N y C son los dominios amino y carboxi terminales, respectivamente, c y e son citosol y espacio extracitosólico, respectivamente.

4.1.5 Perfil de expresión del gen *CitAMT1* en los diferentes órganos de las plantas de cítricos

Los niveles de mRNA del gen *CitAMT1* se midieron de manera individual en raíz primaria y secundaria, tallo y hoja en plantas de cítricos como se indica en el apartado 3.4.4 del Material y Métodos y se normalizaron respecto al RNA ribosomal *18S*.

El gen *CitAMT1* se expresa mayoritariamente en raíz, principalmente en raíz secundaria. En raíces primarias y secundarias, se observa un aumento de la expresión del gen *CitAMT1* en condiciones de carencia de N frente a condiciones control. Sin embargo, en hoja y tallo los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* son más bajos en condiciones de carencia que en plantas control (Figura 15).

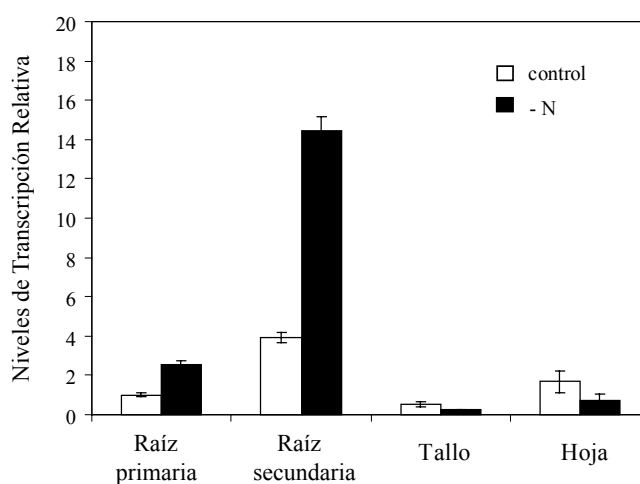


Figura 15. Análisis de la expresión del gen *CitAMT1* en diferentes órganos de cítricos.

Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en raíz primaria, raíz secundaria, tallo y hoja en plantas de cítricos mantenidas en solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) (control) y en plantas de cítricos que posteriormente se transfirieron durante 3 días a una solución de Hoagland carente de N (-N). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a los niveles del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

4.2 Efecto de la modificación del metabolismo del C sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1*

4.2.1 Efecto del ciclo día/noche

Con objeto de comprobar si la absorción del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* están reguladas por la fotosíntesis, se estudió el efecto del ciclo día/noche sobre la actividad de los sistemas de transporte del ión NH_4^+ de alta y baja afinidad, sobre la expresión del gen *CitAMT1*, así como sobre el contenido de azúcares en las raíces de plantas de cítricos. En estos experimentos se utilizaron plantas de citrange Troyer tratadas como se ha descrito en el apartado 3.5.1 del Material y Métodos.

Al igual que se observa en otras especies vegetales, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS muestra un marcado cambio diurno. Se alcanza un pico de máxima absorción en la mitad del periodo diurno, obteniéndose un valor de aproximadamente $20 \mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS de raíz})^{-1} \text{h}^{-1}$ y posteriormente al final del periodo de oscuridad, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ desciende hasta un valor menor de $5 \mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS de raíz})^{-1} \text{h}^{-1}$ (Figura 16A).

Por otra parte, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS, permanece constante a lo largo del ciclo día/noche (Figura 16A), mostrando valores en un intervalo de 15 a $20 \mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS de raíz})^{-1} \text{h}^{-1}$.

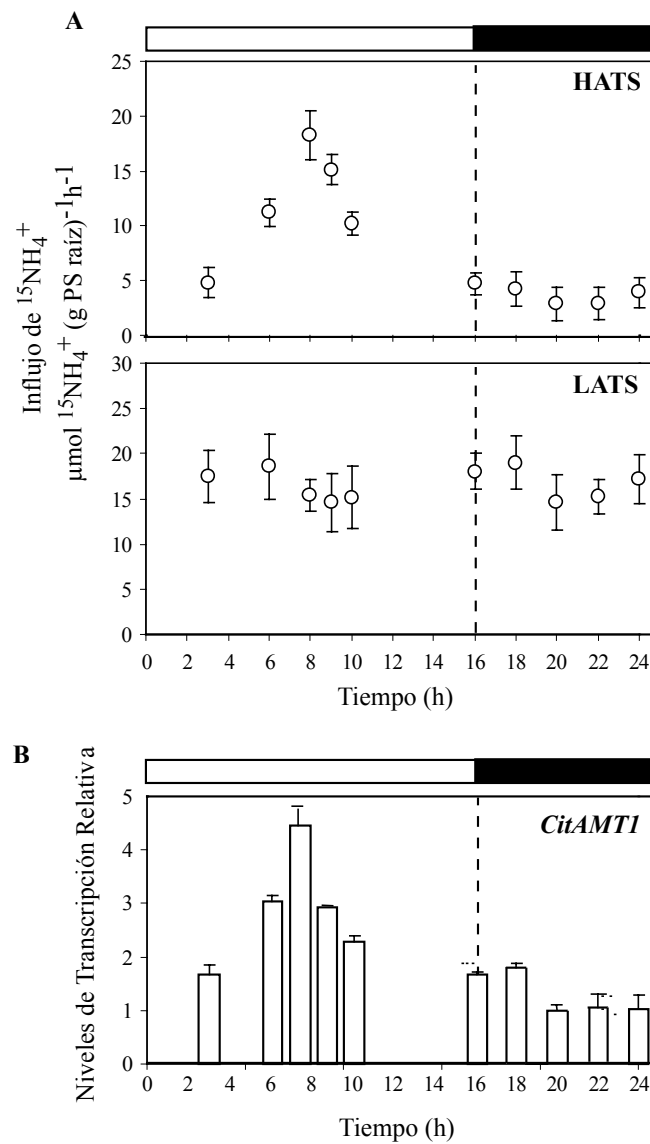


Figura 16. Efecto del ciclo día/noche sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos.

(A) Influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a diferentes horas del día en raíces de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en plantas sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a los niveles del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

En la figura 16B se observan los cambios obtenidos en la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos. Estos cambios se correlacionan con la actividad del HATS, de tal modo que la acumulación de transcritos alcanza un pico, también a mitad del periodo diurno y posteriormente durante el periodo de oscuridad disminuye en un 75 %.

Además, se midió la tasa fotosintética y el contenido de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) en las raíces de cítricos en las mismas condiciones y se observó un patrón muy similar. La tasa fotosintética se incrementa desde valores de $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ hasta alcanzar un máximo de $6.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ a las 8 horas desde el inicio del periodo diurno (Figura 17).

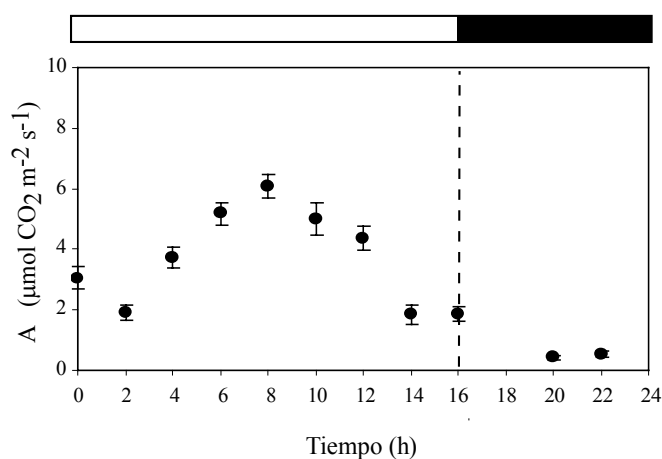


Figura 17. Efecto del ciclo día/noche sobre la tasa fotosintética.

La tasa fotosintética se midió a diferentes horas del día en plantas de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento ($1 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$) en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cada punto es la media de 25 réplicas \pm SE.

Respecto al contenido en azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) en las raíces de cítricos, la concentración de fructosa aumenta durante el periodo diurno, siendo su valor máximo de $35 \text{ mg fructosa/g PS raíz}$ a las 9 horas desde el inicio del periodo de luz, posteriormente

disminuye durante la oscuridad, hasta alcanzar un valor mínimo de 9.2 mg fructosa/g PS raíz. Por otra parte, el contenido de glucosa en las raíces de cítricos sigue un patrón similar, siendo su valor máximo de 22.2 mg glucosa/g PS raíz y su valor mínimo de 4.2 mg glucosa/g PS raíz. La concentración de sacarosa en la raíz también incrementa durante el periodo diurno hasta alcanzar una concentración máxima de 45 mg sacarosa/g PS raíz a las 8 horas desde el inicio del periodo de luz y durante el periodo de oscuridad la concentración disminuye hasta alcanzar un valor de 15.4 mg sacarosa/g PS raíz (Figura 18).

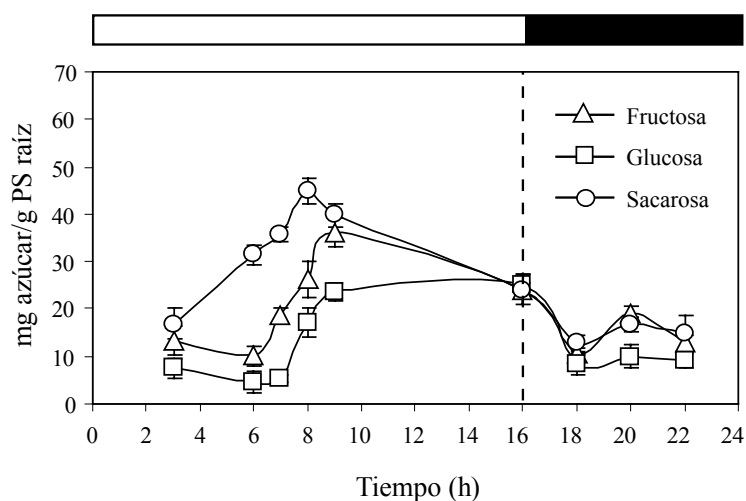


Figura 18. Efecto del ciclo día/noche sobre el contenido de azúcares en la raíz.

El contenido de azúcares se determinó a diferentes horas del día en plantas de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cada punto es la media de 9 réplicas \pm SE.

Por otra parte, cuando se modifica el fotoperiodo (14 horas de luz y 12 horas de oscuridad), se observa un comportamiento similar al de las plantas mantenidas con un fotoperiodo de 16 horas de luz. Se observa un incremento en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ durante el periodo diurno alcanzando

un máximo a la mitad de dicho periodo y posteriormente, desciende la absorción durante el periodo de oscuridad (Figura 19).

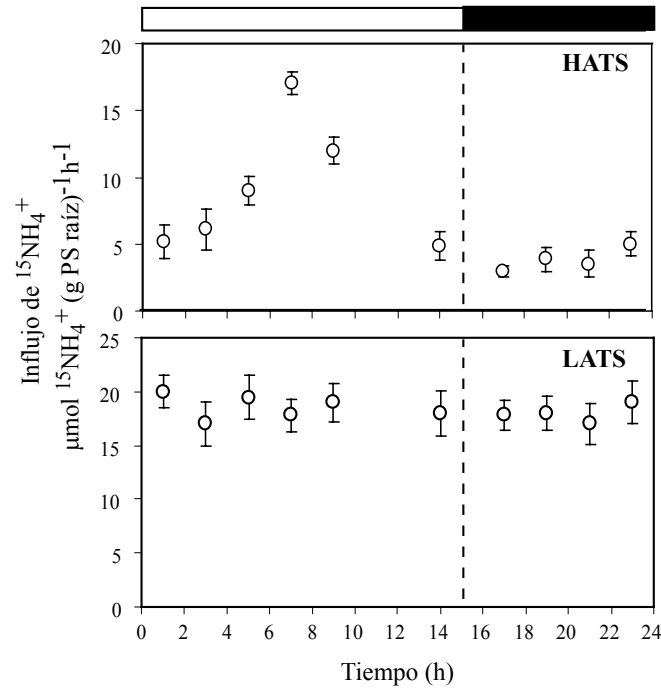


Figura 19. Efecto del ciclo día/noche sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en las raíces de cítricos.

Influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a diferentes horas del día en raíces de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE

Como en el caso del fotoperiodo de 16 horas de luz, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ debido al LATS permanece constante con un valor de aproximadamente $20 \mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS de raíz})^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 19).

4.2.2 Efecto de la luz continua

Como se ha observado que el fotoperiodo modifica la actividad del HATS, para comprobar si los cambios diurnos observados sobre ésta, así como en la expresión del gen *CitAMT1* eran debidos al propio ritmo circadiano de la planta y no al efecto de la fotosíntesis en si misma, se ha estudiado el efecto de la luz continua sobre el transporte del ión NH_4^+ y la acumulación de mRNA de *CitAMT1* en las raíces de cítricos. Para ello, se utilizaron plantas de citrange Troyer tratadas como se indica en el apartado 3.5.2 del Material y Métodos.

En un primer experimento las plantas permanecen durante 24 horas bajo condiciones de luz continua. En este experimento, se observa que la actividad del HATS aumenta progresivamente durante el periodo que se corresponde con el de oscuridad. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, tras permanecer las plantas durante 24 h bajo condiciones de luz continua, alcanza valores de $10 \mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, el doble del valor que se obtenía en el mismo punto bajo condiciones de fotoperiodo normal (comparar figura 20A con 16A).

El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ debido al sistema LATS no se ve prácticamente afectado cuando las plantas permanecen bajo condiciones de luz continua (Figura 20A).

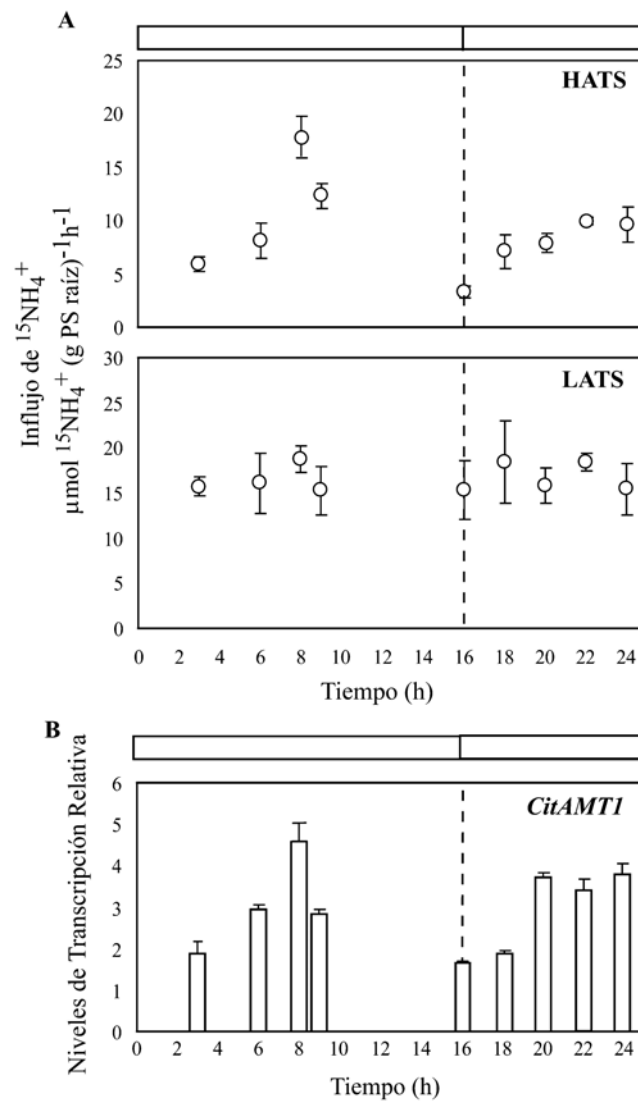


Figura 20. Efecto de la luz continua sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos.

(A) Influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a diferentes horas del día en raíces de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento con un fotoperiodo de 24 horas de luz. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en plantas sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

Asimismo, la expresión del gen *CitAMT1* muestra un comportamiento similar a la actividad del HATS, los niveles de transcritos se incrementan en condiciones de luz continua durante el periodo que se correspondería con el de oscuridad (comparar figura 20B con 16B).

En la figura 21, se observa que la luz continua no sólo previene el descenso en el contenido de sacarosa en la raíz durante el periodo que se correspondería con el de oscuridad, sino que incluso se estimula la acumulación de este azúcar cuando las plantas permanecen bajo estas condiciones, alcanzándose una concentración de 24 mg sacarosa/g PS de raíz a las 16 h de luz y un valor de 38 mg sacarosa/g PS al final del periodo que se correspondería con el de oscuridad. Este efecto no se observa en los otros dos azúcares analizados (glucosa y fructosa) ya que en ambos casos su concentración continua disminuyendo desde su valor máximo alcanzado a las 9 horas hasta las 20 h de luz y se incrementan ligeramente tras permanecer 22 horas bajo condiciones de luz continua (comparar figura 18 con 21).

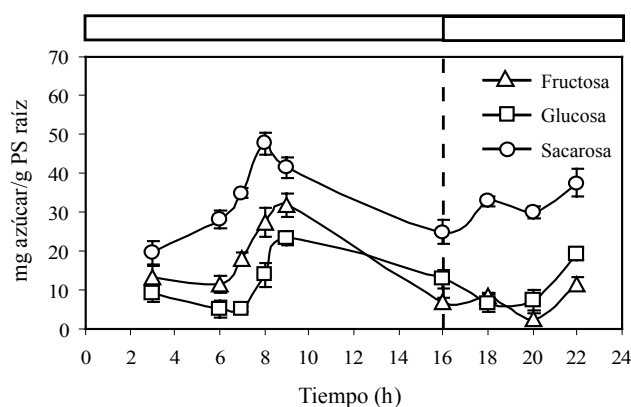


Figura 21. Efecto de la luz continua sobre el contenido de azúcares en la raíz.

El contenido de azúcares se determinó a diferentes horas del día en plantas de cítricos mantenidas en hidropoñía en solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 24 horas de luz. Cada punto es la media de 9 réplicas \pm SE.

En otro experimento con objeto de ver el efecto del pretratamiento con luz continua, las plantas de cítricos permanecieron durante 3 días en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 24 horas de luz.

En estas condiciones desaparecen tanto las variaciones en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, como las diferencias en la concentración endógena de sacarosa que se observaban en plantas control crecidas con un fotoperiodo normal. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y el contenido de sacarosa se mantienen constantes [(6-8 $\mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+$ (g PS de raíz) $^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 25-30 mg sacarosa/g PS raíz, respectivamente], siendo sus valores intermedios entre los valores máximo y mínimo que se alcanzaban durante el fotoperiodo normal (comparar figura 22A con 16A y figura 22B con 18).

En estas condiciones, la actividad del LATS se mantiene prácticamente constante, siendo similar su valor con el obtenido en plantas control crecidas con un fotoperiodo normal (comparar figura 22A con 16A).

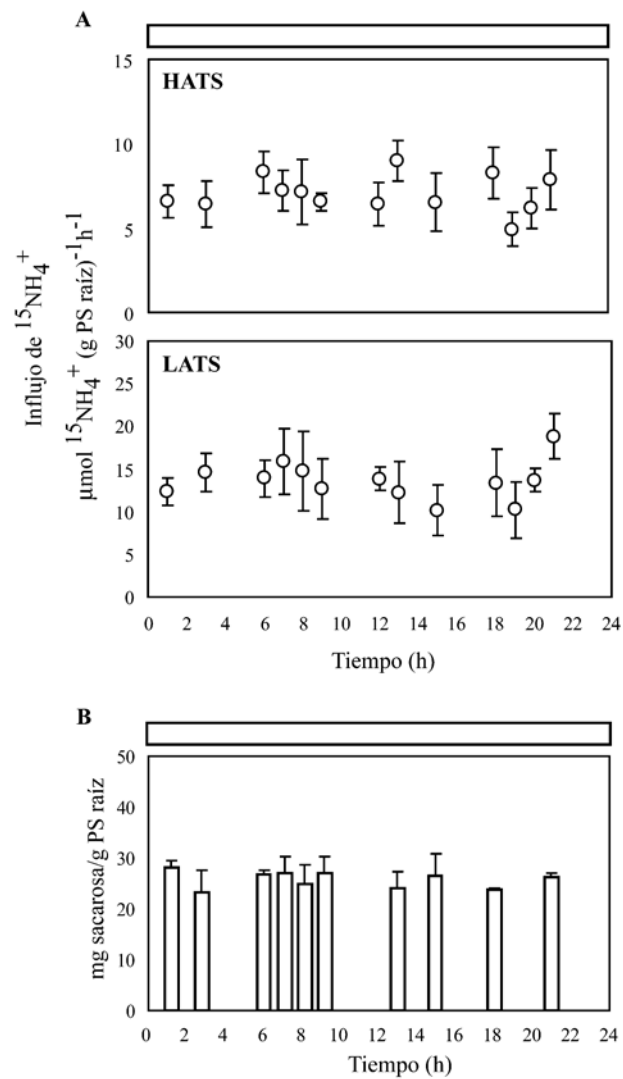


Figura 22. Efecto del pretratamiento con luz continua sobre el influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos.

(A) Influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a diferentes horas del día en raíces de cítricos que han permanecido durante 3 días en condiciones de luz continua (fotoperiodo de 24 horas de luz). Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en plantas sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

4.2.3 Efecto de la intensidad de la luz

Con objeto de ver el efecto que produce modificar la intensidad de la luz sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1*, las plantas de cítricos se tratan como se indica en el apartado 3.5.3 del Material y Métodos.

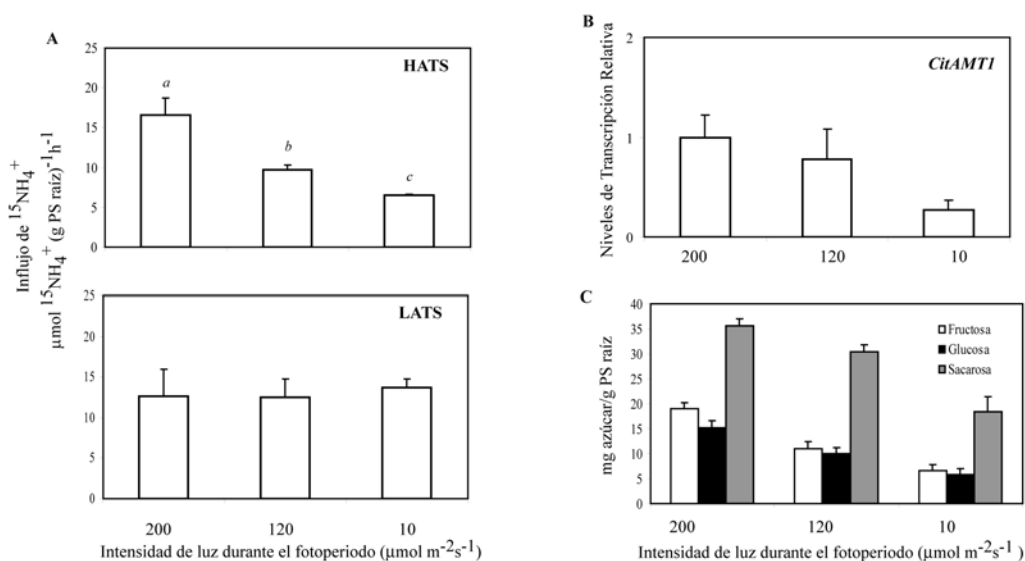


Figura 23. Efecto de la intensidad de luz sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, la expresión del gen *CitAMT1* y la acumulación de azúcares en las raíces de cítricos.

(A) Las plantas de cítricos de 3 meses de edad se mantuvieron en hidroponía en solución de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad luminosa de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 5 días antes del experimento las plantas se dividieron en 3 grupos, un grupo permaneció en las mismas condiciones (control) y los otros dos grupos se colocaron bajo mallas de manera que su intensidad de luz disminuyó a 120 y $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. El día del experimento el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió a las 8 h de iniciarse el periodo diurno. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en plantas sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

(C) Concentración de fructosa, glucosa y sacarosa en las raíces de cítricos. Cada punto es la media de 9 réplicas \pm SE.

Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La relación existente entre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la disponibilidad de C en las raíces se pone de manifiesto al observar que cuando la intensidad de la luz disminuye desde $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ o a $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS disminuye en un 45% y un 72%, respectivamente (Figura 23A).

El influjo mediado por el LATS no se ve afectado al disminuir la intensidad de luz (Figura 23A).

Asimismo, los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* en las raíces también disminuyen en los mismos tratamientos de intensidad de luz, en un 20 y un 80 %, respectivamente (Figura 23B).

Además, el contenido en azúcares solubles también desciende al disminuir la intensidad de luz. Observándose que las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa a $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se reducen en un 37, 47 y 17 % y a $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ disminuyen en un 73, 73 y 41 %, respectivamente (Figura 23C).

En otro experimento se ha medido el efecto de la intensidad de la luz sobre los parámetros cinéticos para ver si se regula postranscripcionalmente el transporte del ión NH_4^+ . En este experimento, las plantas de cítricos se trataron como se ha descrito anteriormente.

En estas condiciones se observa que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ sigue un patrón cinético bifásico. A bajas $[\text{}^{15}\text{NH}_4^+]_0$ ($< 1\text{mM}$) el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ sigue una cinética del tipo Michaelis-Menten, tanto en plantas control como en plantas sometidas a diferentes intensidades de luz, típica del los sistemas HATS saturables. En el rango de altas $[\text{}^{15}\text{NH}_4^+]_0$ ($> 1\text{mM}$) el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se incrementa de forma lineal, actuando el sistema no saturable LATS (Figura 24).

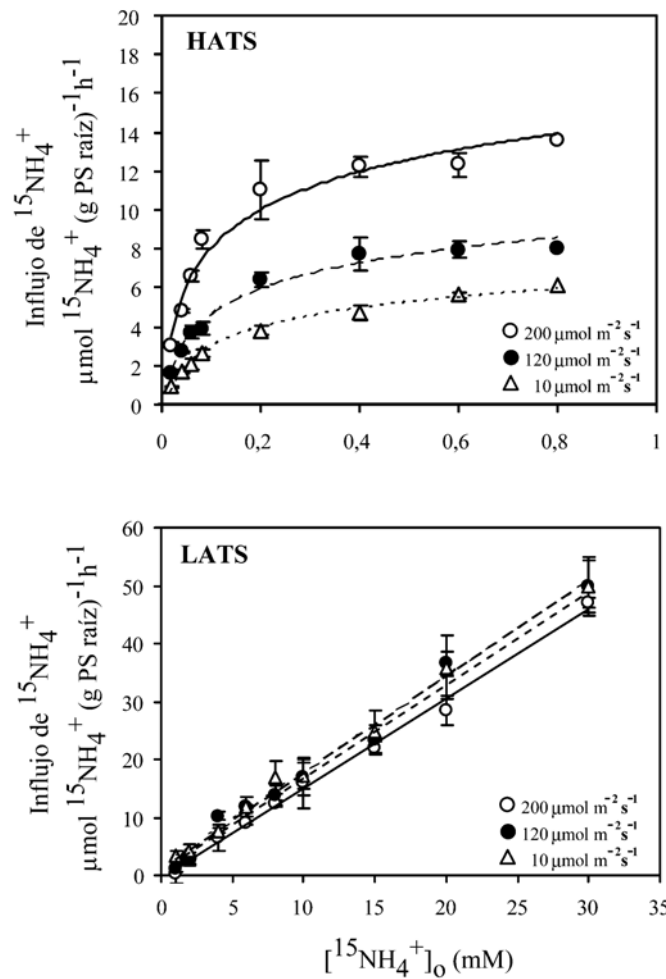


Figura 24. Cinética del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y el LATS en plantas de cítricos en diferentes condiciones de intensidad de luz (200, 120 y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Las plantas de cítricos tras permanecer durante una semana en la solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) se separaron en 3 grupos. Un grupo se mantuvo en las mismas condiciones y los otros dos grupos se colocaron bajo mallas de manera que su intensidad de luz disminuyó a 120 y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió al tercer día a diferentes $[^{15}\text{NH}_4^+]_0$. Para obtener los valores correspondientes al LATS, se restó a cada punto medido a $[^{15}\text{NH}_4^+]_0 > 1$ mM el valor de $V_{\text{máx}}$ obtenida para el sistema HATS. Cada punto es la media de 24 réplicas \pm SE.

Los parámetros cinéticos varían cuando se reduce la intensidad de luz a 120 y 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obteniéndose valores de $V_{\text{máx}}$ de 9.2 y 6.2 $\mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+$ (g PS de raíz) $^{-1} \text{h}^{-1}$ y de K_m de 94.9 y 112 μM , respectivamente (Tabla 5).

El influjo mediado por el LATS no se ve afectado por las diferentes intensidades de luz aplicadas, obteniéndose una pendiente similar alrededor de 1.6 $\mu\text{mol } ^{15}\text{NH}_4^+$ (g PS de raíz) $^{-1} \text{h}^{-1} \text{mM}^{-1}$ en todos los casos (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ bajo diferentes intensidades luminosas.

	Parámetros cinéticos	Intensidad de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
		200	120	10
HATS	$V_{\text{máx}}$	15.2 ± 0.8^a	9.2 ± 1.2^b	6.2 ± 0.5^c
	K_m	80.5 ± 5^a	94.9 ± 6^b	112 ± 8^c
LATS	a	-0.4	0.8	1.7
	b	1.5	1.6	1.6
	r^2	0.99	0.98	0.98

Los valores de $V_{\text{máx}}$ se expresan en $\mu\text{mol (g PS)}^{-1}\text{h}^{-1}$. Los valores de K_m se expresan en μM . Para obtener los valores correspondientes al LATS, se restó a cada punto medido a $[\text{NH}_4^+]_0 > 1 \text{ mM}$ el valor de $V_{\text{máx}}$ obtenida para el sistema HATS. Cada punto es la media de 24 réplicas \pm SE. Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.2.4 Efecto de la adición de sacarosa

Para comprobar si el principal compuesto sintetizado durante la fotosíntesis, como es la sacarosa, afecta al influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y a la expresión del gen *CitAMT1* en plantas de cítricos, se adicionó sacarosa a las plantas tal y como se ha descrito en el apartado 3.6.4 del Material y Métodos.

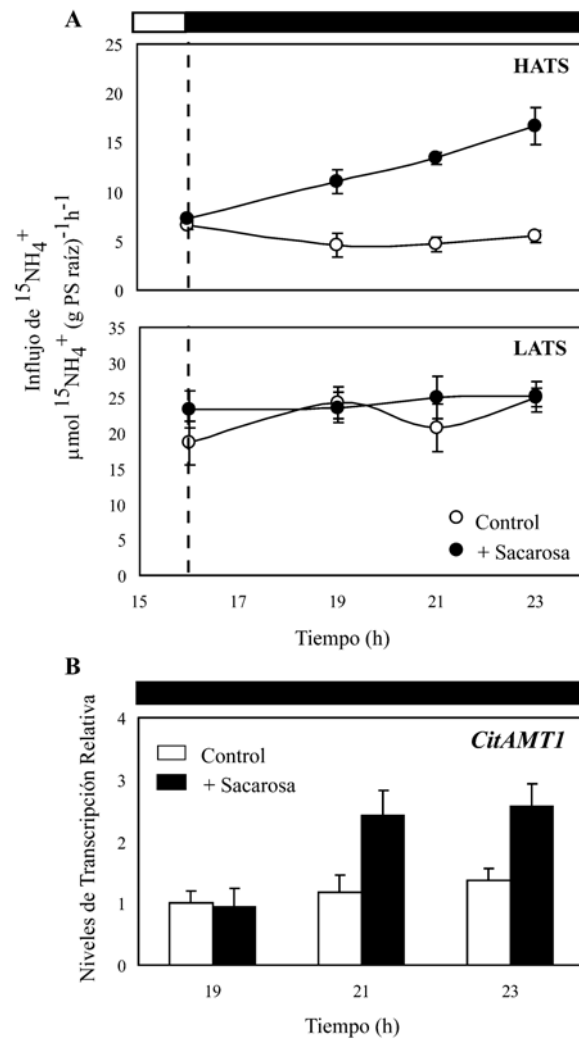


Figura 25. Efecto de la adición de sacarosa durante el periodo de oscuridad sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1*.

(A) Inlujo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a las 3, 5 y 7 horas del inicio del periodo de oscuridad en plantas de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento (control) o adicionadas con sacarosa (+ sacarosa). La sacarosa se ha adicionado al inicio del periodo de oscuridad a una concentración 1 % (p/v). Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real, en plantas de cítricos sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

Se observa que después de 7 horas de adicionar sacarosa al inicio del periodo de oscuridad, se incrementa el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS tres veces respecto del control (Figura 25A). Una respuesta similar, aunque menos acusada, se observa en la expresión del gen *CitAMT1* (Figura 25B), existiendo una correlación entre la expresión del gen y el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$. Sin embargo, el influjo mediado por el LATS no se ve afectado por el tratamiento con sacarosa (Figura 25A).

4.2.5 Efecto de la adición de diferentes azúcares y ácidos carboxílicos

Una vez comprobado que la sacarosa induce el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1*, también se estudia el efecto de otros metabolitos carbonados como fructosa y glucosa y los ácidos carboxílicos, 2-oxoglutarato y malato, para poder discernir la especificidad de estos compuestos. Para ello las plantas se trataron como se describe en el apartado 3.5.4 del Material y Métodos.

Al adicionar fructosa o glucosa al 1% (p/v) a la solución hidropónica de crecimiento al inicio del periodo de oscuridad, no se observan diferencias significativas respecto a las plantas control en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y por el LATS. Sin embargo, al adicionar sacarosa al 1% (p/v), la actividad del HATS se incrementa 3 veces respecto al control, mientras que el sistema LATS no se ve afectado (Figura 26A).

Los niveles de expresión del gen *CitAMT1* se incrementan al adicionar sacarosa respecto a las plantas control. Sin embargo, la expresión del gen no se modifica al adicionar fructosa o glucosa a la solución de crecimiento (Figura 26B).

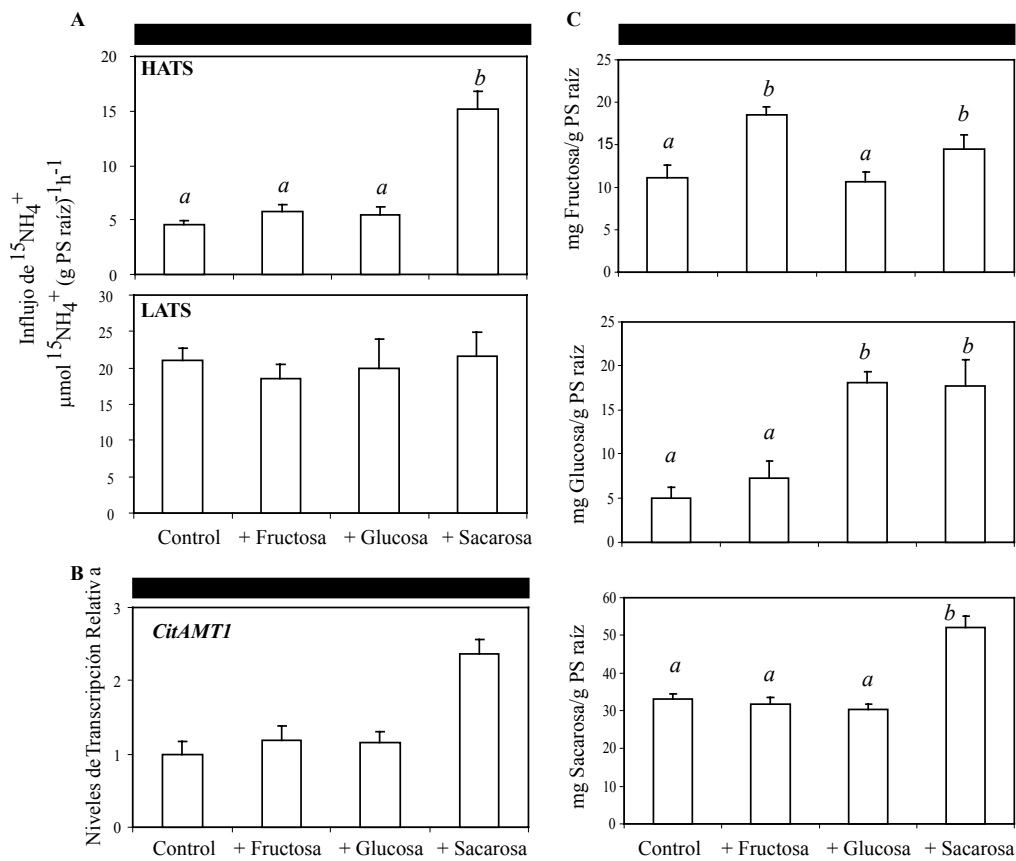


Figura 26. Efecto de la adición de fructosa, glucosa y sacarosa durante el periodo de oscuridad sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, la expresión del gen *CitAMT1* y el contenido de azúcares en las raíces de cítricos.

(A) Influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a las 5 horas del inicio del periodo de oscuridad en plantas de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento (control) o adicionada de fructosa, glucosa o sacarosa. La fructosa, glucosa o sacarosa se han adicionado al inicio del periodo de oscuridad a una concentración 1 % (p/v). Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real, en plantas de cítricos sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión de rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

(C) El contenido de azúcares se determinó en plantas de cítricos sometidas al mismo tratamiento que en (A). Cada punto es la media de 9 réplicas \pm SE.

Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la figura 26C se observa que la fructosa se acumula ligeramente en la raíz en respuesta a la adición exógena de fructosa y sacarosa. Sin embargo, esta acumulación no se produce al adicionar glucosa. Además, la concentración de glucosa en la raíz aumenta cuando se adiciona glucosa o sacarosa a la solución de crecimiento. Sin embargo, el contenido de sacarosa en la raíz únicamente se incrementa al adicionar sacarosa exógenamente.

Por otra parte, la adición de 2-oxoglutarato o malato a una concentración de 10 mM a la solución hidropónica de crecimiento al inicio del periodo de oscuridad no produce ningún efecto sobre la actividad del HATS y del LATS ni en la transcripción del gen *CitAMT1* (Figuras 27A y 27B).

La adición de estos ácidos orgánicos tampoco produce ningún efecto en la transcripción del gen *CitAMT1*, a pesar de que la adición de estos ácidos aumenta el contenido de sacarosa endógeno en las raíces (Figura 27C).

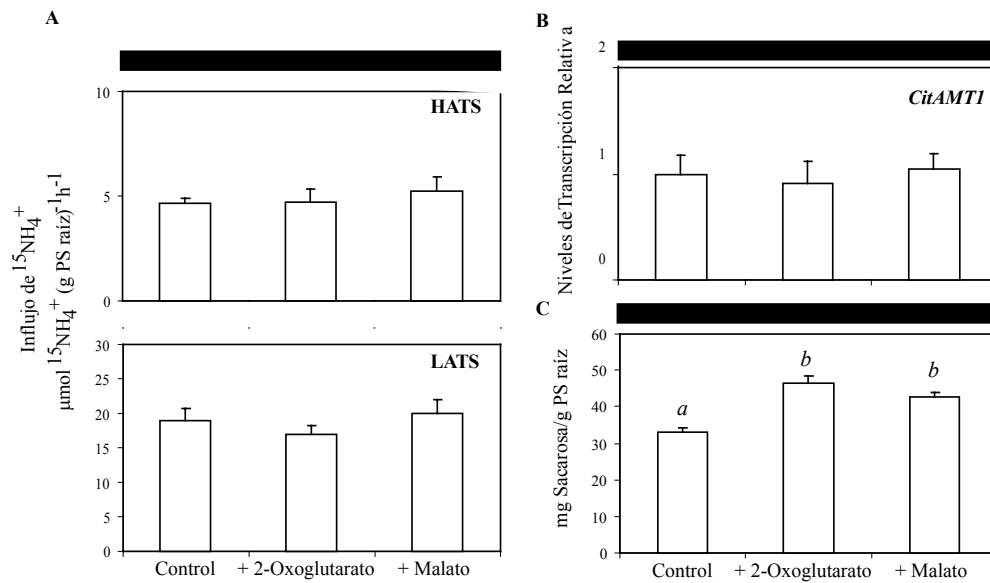


Figura 27. Efecto de la adición de 2-oxoglutarato y malato durante el periodo de oscuridad sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, la expresión del gen *CitAMT1* y el contenido de azúcares en las raíces de cítricos.

(A) Inlujo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ medido a las 5 horas del inicio del periodo de oscuridad en plantas de cítricos mantenidas en hidroponía en solución de crecimiento (control) o adicionada de 2-oxoglutarato y malato. El 2-oxoglutarato y malato se han adicionado al inicio del periodo de oscuridad a una concentración 1 % (p/v). Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real, en plantas de cítricos sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión de rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

(C) El contenido de sacarosa se determinó en plantas de cítricos sometidas al mismo tratamiento que en (A). Cada punto es la media de 12 réplicas \pm SE.

Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.3 Efecto de la modificación del metabolismo del N sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1*

4.3.1 Determinación de la preferencia de las plantas de cítricos por la fuente de N

Para estimar la preferencia de los cítricos para absorber el ión NH_4^+ o el ión NO_3^- , las plantas se tratan como se indica en el apartado 3.6.1 del Material y Métodos.

En la figura 28, se observa que las plantas de cítricos prefieren absorber NH_4^+ frente al NO_3^- . Tanto si uno de los dos iones se encuentran en la solución de influjo como única fuente de N (100% de $^{15}\text{NH}_4^+$ y 100% de $^{15}\text{NO}_3^-$), como si se encuentran ambos combinados en diferentes proporciones (75:25; 50:50 y 25:75). Si en la solución se encuentra presente el $^{15}\text{NH}_4^+$ como única fuente de N, el HATS absorbe $18.3 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+$ (g PS raíz) $^{-1}\text{h}^{-1}$, en cambio, si en la solución de influjo sólo está presente el ión $^{15}\text{NO}_3^-$, el HATS absorbe $3.6 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NO}_3^-$ (g PS raíz) $^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 28), lo que pone de manifiesto que a bajas concentraciones de NH_4^+ o de NO_3^- en el medio, los cítricos absorben cinco veces más $^{15}\text{NH}_4^+$ que $^{15}\text{NO}_3^-$. Asimismo, si en la solución están presentes ambos iones en diferentes proporciones, también se observa que las plantas siguen absorbiendo cinco veces más NH_4^+ que NO_3^- , independientemente de la proporción en la que se encuentren.

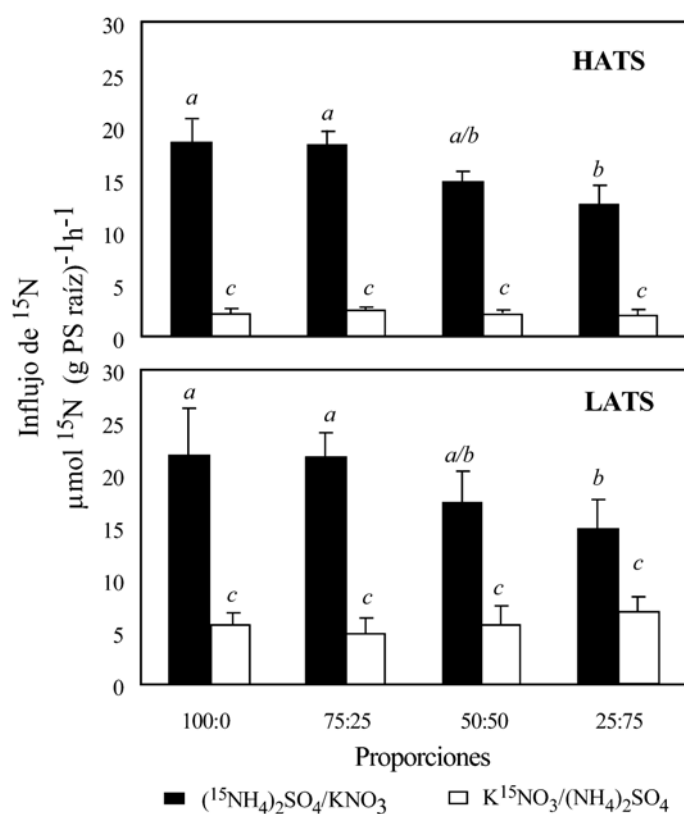


Figura 28. Influjos de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$ en función de sus diferentes proporciones en la solución de marcaje.

Las plantas de cítricos se mantuvieron en la solución hidropónica de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) durante una semana hasta el inicio del experimento. Las soluciones de influjos (solución de marcaje) se prepararon utilizando diferentes proporciones (100:0; 75:25; 50:50; 25:75) de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{KNO}_3$ o de $\text{K}^{15}\text{NO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE. Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El LATS se comporta de una manera similar al HATS. Si en la solución de influjos está presente únicamente el ión $^{15}\text{NH}_4^+$, las plantas absorben $21.8 \mu\text{mol}$ de $^{15}\text{NH}_4^+$ (g PS raíz)⁻¹h⁻¹ y si únicamente hay $^{15}\text{NO}_3^-$, absorben $6.2 \mu\text{mol}$ de $^{15}\text{NO}_3^-$ (g PS raíz)⁻¹h⁻¹ (Figura 28), lo que indica que el LATS absorbe 3.5 veces más NH_4^+ que NO_3^- . Además, también se observa

que independientemente de las proporciones en las que se encuentren combinados ambos iones en la solución las plantas prefieren absorber NH_4^+ .

Por último, en ambos sistemas de transporte del ión NH_4^+ , HATS y LATS, el influjo de éste ión está correlacionado de forma positiva con el incremento de su concentración en la relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Sin embargo, no se observa este efecto en el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por ambos sistemas.

4.3.2 Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de NH_4^+ y NO_3^-

Con objeto de discernir, tanto a nivel fisiológico como molecular, si diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ modifican la preferencia de la absorción del ión NH_4^+ , se utilizan plantas tratadas como se indica en el apartado 3.6.2 del Material y Métodos.

En la figura 29, se observa que tras mantener las plantas de cítricos durante 3 días en diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, las plantas también prefieren absorber NH_4^+ frente a NO_3^- , tal y como se ha comprobado en el apartado anterior.

Si las plantas se pretratan con NH_4^+ como única fuente de N, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS es de $9.6 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 29), siendo este valor más bajo que el obtenido cuando ambos iones están combinados en diferentes proporciones. Sin embargo, si en la solución hidropónica únicamente está presente el ión NO_3^- , se produce un marcado incremento en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ alcanzándose un valor de $33.2 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$.

Por otra parte, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS no se ve afectado por las diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ utilizadas en la

solución de crecimiento, siendo su valor entre 17 y 20 μmol de $^{15}\text{NH}_4^+$ (g PS raíz) $^{-1}\text{h}^{-1}$.

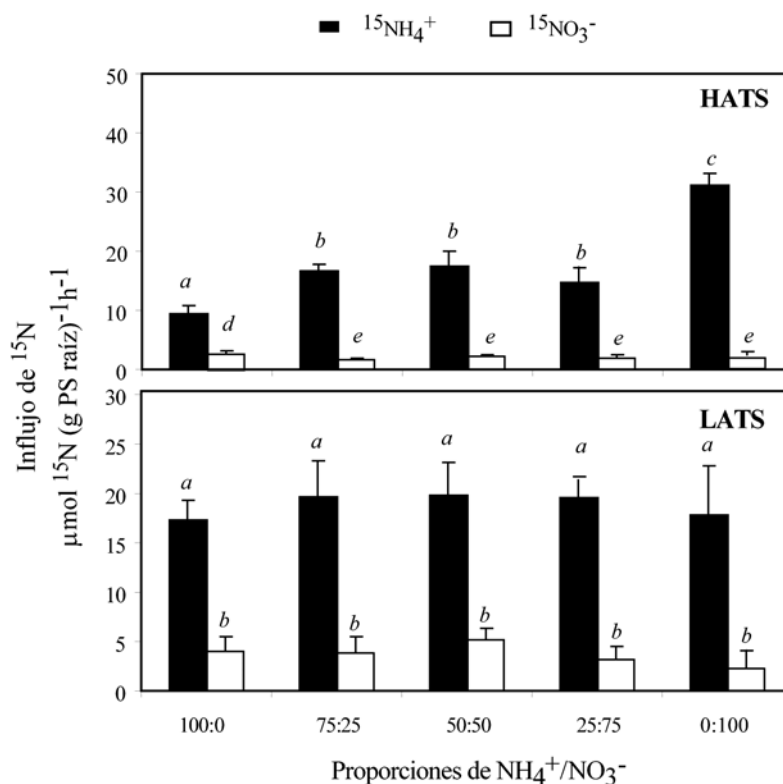


Figura 29. Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ sobre el influjo de ^{15}N .

El influjo de ^{15}N se midió al tercer día de transferir las plantas de cítricos desde la solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) a la solución de Hoagland modificada carente de N y adicionada con diferentes proporciones (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / KNO_3 a una concentración final de N de 1 mM. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE. Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tal y como muestra la figura 29, el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por el HATS, cuando en la solución esta presente el NH_4^+ como única fuente de N, es de 4.5 μmol de $^{15}\text{NO}_3^-$ (g PS raíz) $^{-1}\text{h}^{-1}$. El influjo de este ión se

reduce cuando está presente el NO_3^- junto al NH_4^+ en diferentes proporciones, o como única fuente de N, alcanzando un valor de aproximadamente $3 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NO}_3^- (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$, es decir, el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ se reduce hasta niveles basales a cuando el NO_3^- está presente a bajas concentraciones externas.

Respecto al influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por el LATS no existen diferencias significativas cuando se adicionan diferentes proporciones de ambos iones, alcanzando valores de influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ comprendidos entre 3 y $5 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NO}_3^- (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$.

En la figura 30 se observa que la expresión relativa del gen *CitAMT1* es similar si las plantas de cítricos se mantienen durante 3 días con diferentes proporciones de ambos iones o con NO_3^- como única fuente de N. Sin embargo, su expresión es menor si en el medio hidropónico está presente únicamente el NH_4^+ .

La máxima expresión del gen *CitNRT2* se obtiene cuando en la solución hidropónica está presente únicamente el ión NH_4^+ , sin embargo cuando únicamente hay NO_3^- en la solución, su expresión es más baja que cuando están presentes ambos iones en distintas proporciones.

En las figuras 29 y 30, se observa que hay una correlación positiva entre la expresión del gen *CitAMT1* y el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS cuando se adiciona NH_4^+ como única fuente de N o ambos iones en las diferentes proporciones. Sin embargo, no hay correlación cuando se pretratan las plantas con NO_3^- como única fuente de N, donde el nivel de expresión del gen *CitAMT1* no explica el aumento observado en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$.

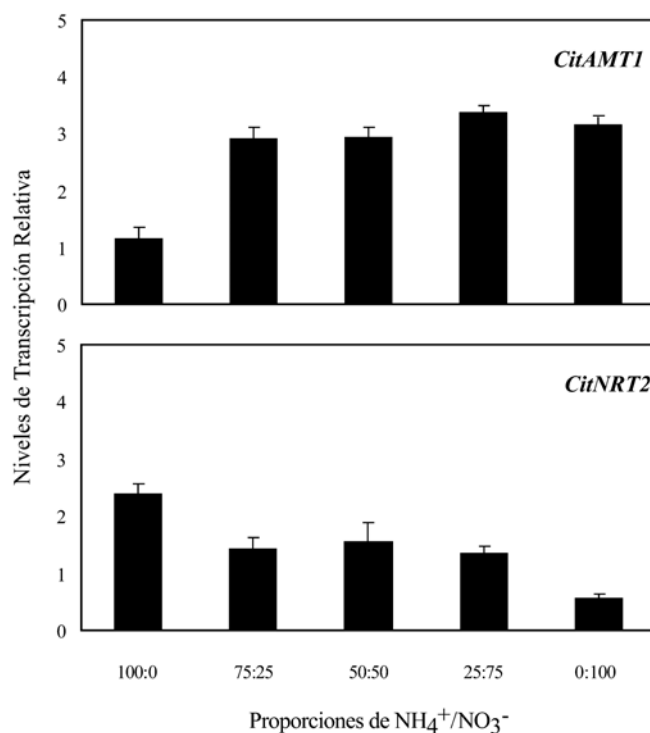


Figura 30. Efecto del pretratamiento con diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ sobre la expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2*.

La expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se determinó en las raíces de las plantas de cítricos al tercer día de transferir las plantas desde la solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) a la solución de Hoagland modificada carente de N y adicionada con diferentes proporciones (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / KNO_3 a una concentración final de 1 mM de N total. Los niveles de transcripción de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

Asimismo, la expresión del gen *CitNRT2* y el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por el HATS están correlacionados ligeramente cuando se adiciona NH_4^+ o NO_3^- en las proporciones indicadas.

4.3.3 Efecto de la carencia de NH_4^+ y de la carencia de N

Con objeto de discernir si la ausencia del ión NH_4^+ o la presencia del ión NO_3^- son los responsables del incremento del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, aunque se mantiene a un nivel constante la expresión del gen *CitAMT1*, al pretratar las plantas durante 3 días con NO_3^- , se realizaron los experimentos detallados a continuación, utilizando plantas de cítricos tratadas como se indica en el apartado 3.6.3 del Material y Métodos.

4.3.3.1 Efecto de la carencia de NH_4^+

En condiciones de carencia de NH_4^+ (presencia del ión NO_3^-), el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS se incrementa alcanzándose un pico de máxima absorción de $32.4 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$ a los 3 días desde el inicio del tratamiento (Figura 31A). Posteriormente, el influjo se reduce hasta niveles basales. Por tanto, las plantas reaccionan a la carencia de NH_4^+ , de-reprimiendo el HATS durante los 3 primeros días de tratamiento y de-induciéndolo hasta los 7 días de tratamiento.

Por otra parte, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS permanece prácticamente constante durante el periodo de tratamiento (Figura 31A).

La expresión del gen *CitAMT1* no se modifica a lo largo del tratamiento cuando las plantas se mantienen en carencia de NH_4^+ (Figura 31B).

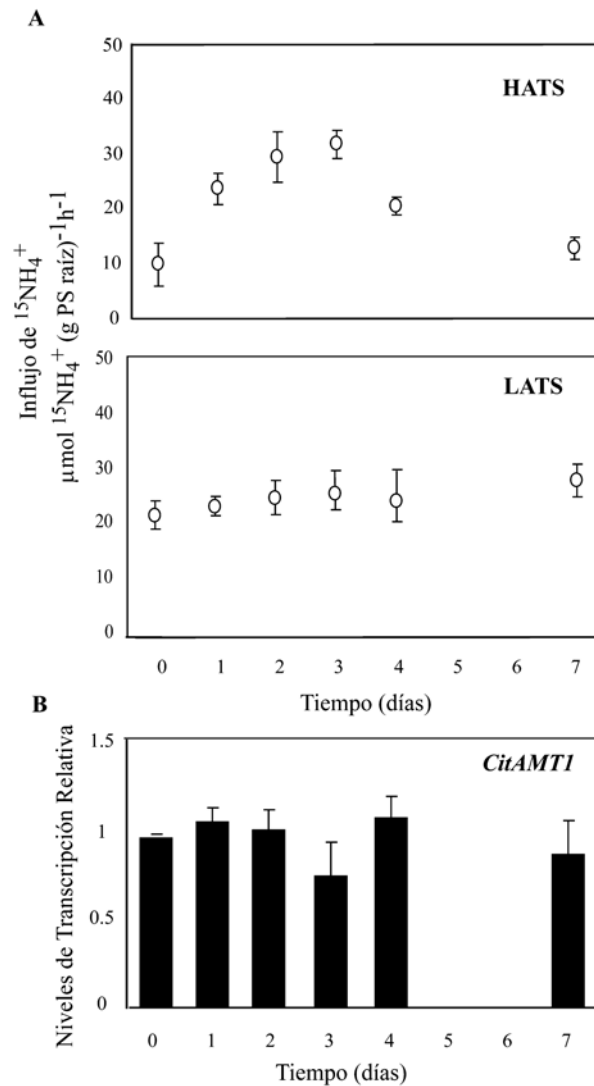


Figura 31. Efecto de la carencia de NH_4^+ sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos.

(A) El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió diariamente después de transferir las plantas de cítricos desde la solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) a la solución de Hoagland carente de N y adicionada de 1 mM de KNO_3 . Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en plantas sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

4.3.3.2 Efecto de la carencia de N

El incremento observado, en el apartado anterior, en la actividad del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, podría deberse tanto a la ausencia de NH_4^+ como a la presencia del ión NO_3^- en la solución. Con objeto de discernir el efecto del NO_3^- , éste se eliminó también de la solución, estudiándose el efecto de la carencia completa de N en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y en la expresión del gen *CitAMT1*.

Se observa que las plantas, a los 2 días de tratamiento, alcanzan un pico máximo de influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ de $39.6 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1} \text{h}^{-1}$ y posteriormente éste disminuye hasta alcanzar a los 7 días, valores basales similares a los del inicio del experimento ($10.4 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1} \text{h}^{-1}$) (Figura 32A).

El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el sistema LATS permanece constante, siguiendo un comportamiento similar al observado en condiciones de carencia de NH_4^+ (Figura 32A).

Los resultados muestran que existe una estrecha correlación entre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1* (Figuras 32A y B). Se observa al igual que ocurría con el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ (Figura 32A) que la expresión del gen *CitAMT1*, se de-reprime durante los 2 primeros días y posteriormente, se de-induce hasta los 7 días (Figura 32B).

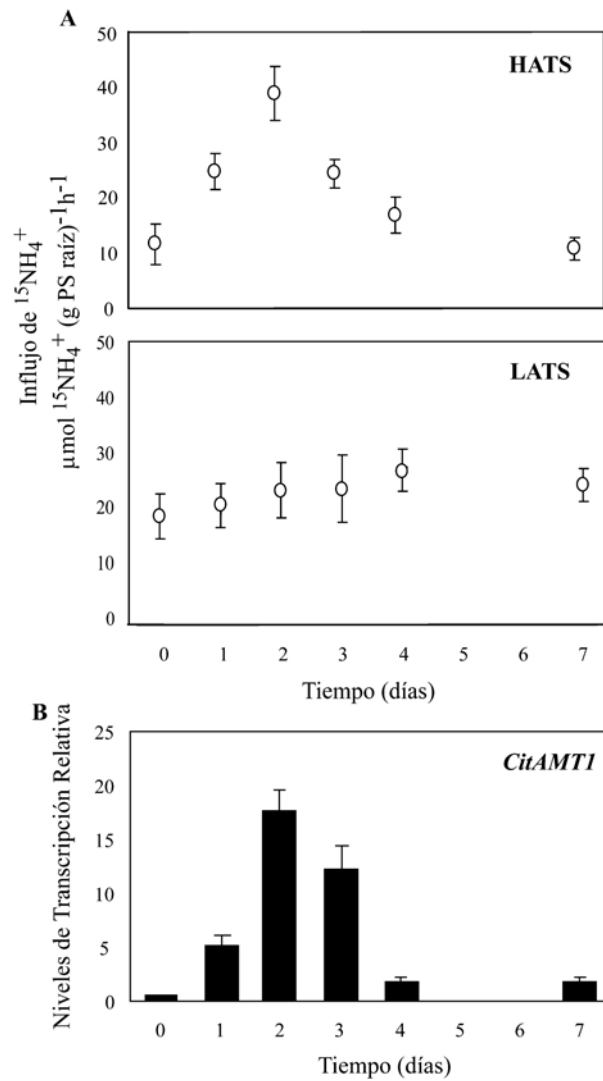


Figura 32. Efecto de la carencia de N sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos.

(A) El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió diariamente después de transferir las plantas de cítricos desde la solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) a la solución de Hoagland modificada carente de N. Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE.

(B) Determinación de la expresión del gen *CitAMT1* mediante PCR en Tiempo Real en plantas sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los niveles de transcripción del gen *CitAMT1* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

4.3.3.3 Efecto de la carencia de NH_4^+ y de N sobre los parámetros cinéticos

Con objeto de explicar si el mecanismo regulador del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en condiciones de carencia total y en carencia de NH_4^+ es similar, se estudia el efecto de ambas carencias sobre los parámetros cinéticos.

Cuando las plantas se someten a carencia de NH_4^+ o de N se observa que se modifican los parámetros cinéticos respecto a las plantas control. En ambos casos siguen manteniendo un patrón cinético bifásico pero los valores de K_m se reducen. En plantas que han sido sometidas a carencia de NH_4^+ alcanzan valores de 55 μM y en plantas sometidas a carencia de N valores de 71 μM , lo que indica que tienen una mayor afinidad por el sustrato que las plantas control. Respecto a los valores de $V_{m\acute{a}x}$, éstos se incrementan desde un valor de 12.6 en plantas control a 30.4 y 26.6 $\mu\text{mol de }^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS ra\acute{ı}z})^{-1}\text{h}^{-1}$ en plantas crecidas en carencia de NH_4^+ o de N, respectivamente, incrementándose la capacidad de absorción del ión NH_4^+ respecto a las plantas control (Figura 33, Tabla 6).

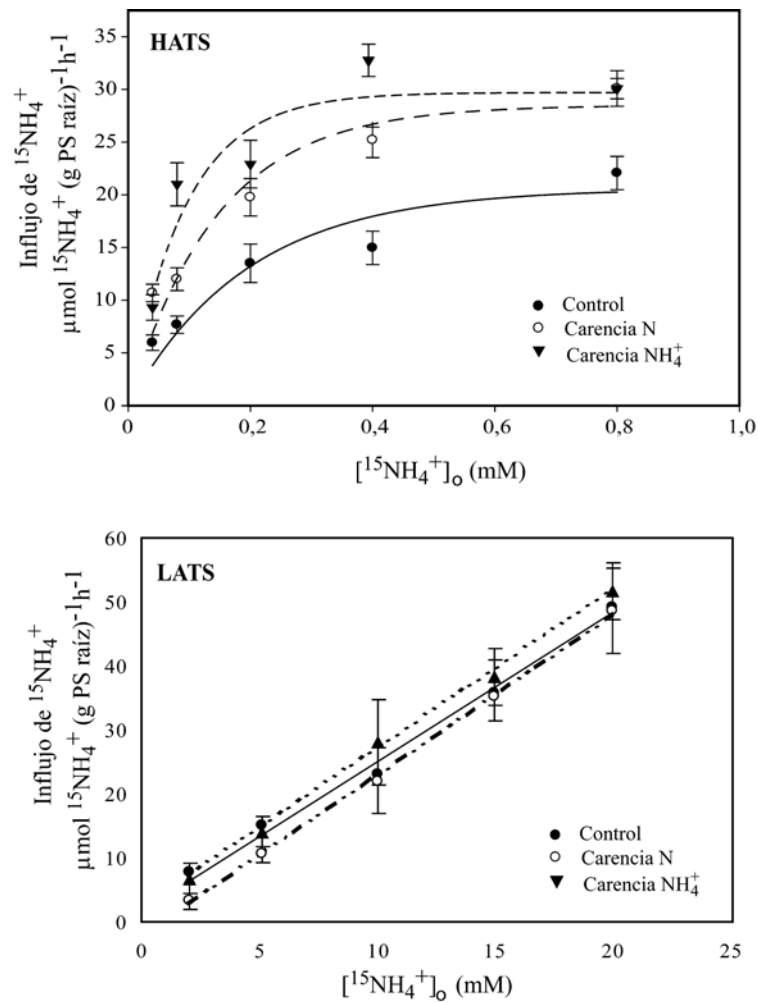


Figura 33. Cinética del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS y el LATS en plantas de cítricos sometidas a carencia de NH_4^+ o a carencia de N.

Las plantas de cítricos tras permanecer durante una semana en la solución de crecimiento ($1 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$) se separaron en 3 grupos. Un grupo se mantuvo en las mismas condiciones, otro grupo en solución de Hoagland carente por completo de nitrógeno (carencia N) y el tercer grupo en solución de Hoagland carente de NH_4^+ pero adicionada de 1 mM KNO_3 durante 3 días (carencia NH_4^+). El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió al tercer día a diferentes $[^{15}\text{NH}_4^+]_o$. Para obtener los valores correspondientes al LATS, se restó a cada punto medido a $[^{15}\text{NH}_4^+]_o > 1 \text{ mM}$ el valor de $V_{\text{máx}}$ obtenida para el sistema HATS. Cada punto es la media de 24 réplicas \pm SE.

El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS no se ve afectado por los tratamientos de carencia, obteniéndose una pendiente similar en todos los casos alcanzándose valores próximos a $2.5 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (Figura 33, Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ bajo condiciones de carencia.

	Parámetros cinéticos	Control	Carencia NH_4^+	Carencia N
HATS	$V_{m\acute{a}x}$	12.6 ± 0.8^a	30.4 ± 1.5^b	26.6 ± 1^b
	K_m	86 ± 6^a	55 ± 4^b	71 ± 5^c
LATS	a	1.8	2.3	2.3
	b	2.3	2.5	2.5
	r^2	0.99	0.98	0.99

Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ se expresan en $\mu\text{mol (g PS)}^{-1}\text{h}^{-1}$. Los valores de K_m se expresan en μM . Para obtener los valores correspondientes al LATS, se restó a cada punto medido a $[\text{NH}_4^+]_0 > 1 \text{ mM}$ el valor de $V_{m\acute{a}x}$ obtenida para el sistema HATS. Cada punto es la media de 24 réplicas \pm SE. Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.3.4 Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-represión y de de-inducción

La carencia de N, no así la carencia de NH_4^+ , presenta mecanismos de regulación del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y de la expresión del gen *CitAMT1*, distintos en función del tiempo. Para estudiar que mecanismos operan en función de la fuente de N y de su concentración, se estudió como afecta la adición de NH_4^+ y NO_3^- en condiciones de de-represión y de de-inducción.

4.3.4.1 Condiciones de de-represión

Para llevar a cabo este experimento las plantas de citrange Troyer se trataron como se indica en el apartado 3.6.4 del Material y Métodos.

En la figura 34, al igual que se observa en la figura 32, los sistemas de transporte de alta afinidad se encuentran de-reprimidos cuando las plantas de cítricos han permanecido durante 3 días en condiciones de carencia total de nitrógeno. Los valores de influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ son de $14 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$ en las plantas control y de $34 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$ en las plantas sometidas a carencia de N. Por lo tanto, en condiciones de carencia de N, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, se incrementa 2.5 veces. Sin embargo, cuando se adiciona NH_4^+ a ambas concentraciones, 0.2 y 10 mM, se produce, a las 24 horas, la represión del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, disminuyendo éste a $28 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$ y $23.4 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Por último, al adicionar NO_3^- a 0.2 y 10 mM, se observa que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS no se ve afectado por ninguna de las dos concentraciones, manteniéndose valores próximos a $36 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$.

La adición de NH_4^+ o NO_3^- a ambas concentraciones 0.2 y 10 mM no afecta al influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS, permaneciendo su valor próximo a $20 \mu\text{mol de } ^{15}\text{NH}_4^+ (\text{g PS raíz})^{-1}\text{h}^{-1}$.

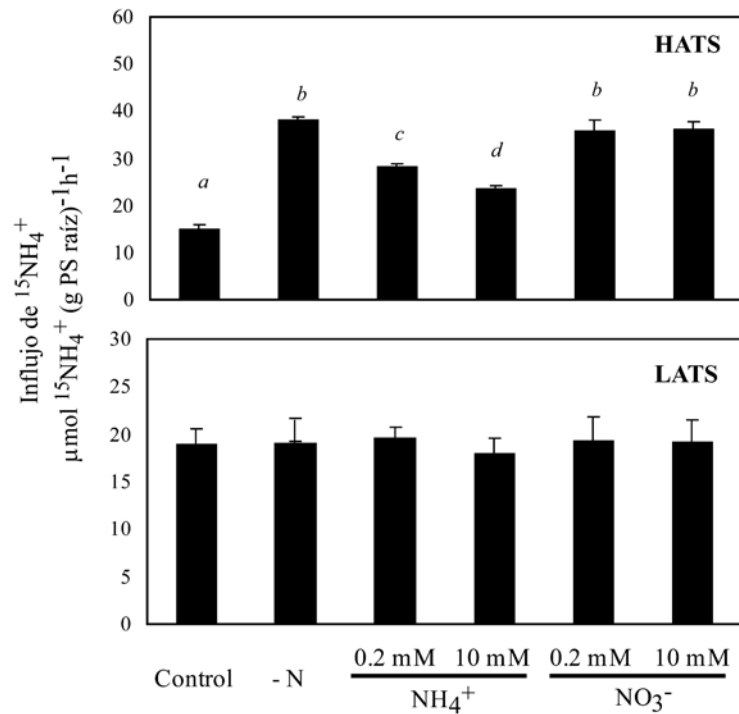


Figura 34. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en condiciones de de-represión.

Las plantas de cítricos se mantuvieron en solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) y se midió el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ al inicio del experimento (control). Posteriormente, las plantas permanecieron durante 3 días en solución de Hoagland carente de N (-N). Transcurridos 3 días las plantas se separaron en 4 grupos, a los grupos 1 y 2 se les adicionó NH_4^+ a una concentración de 0.2 y 10 mM, respectivamente y a los grupos 3 y 4 se les adicionó NO_3^- a una concentración de 0.2 y 10 mM, respectivamente. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió transcurridas 24 horas de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- . Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE. Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la figura 35, se muestra como el gen *CitAMT1*, al igual que ocurre con el HATS, a los 3 días de carencia de N se de-reprime. Cuando se adiciona NH_4^+ a 0.2 y 10 mM, se observa un descenso en el nivel de transcritos del gen. También se observa un descenso aunque más leve en la expresión del gen, al adicionar NO_3^- , a ambas concentraciones, 0.2 y 10 mM.

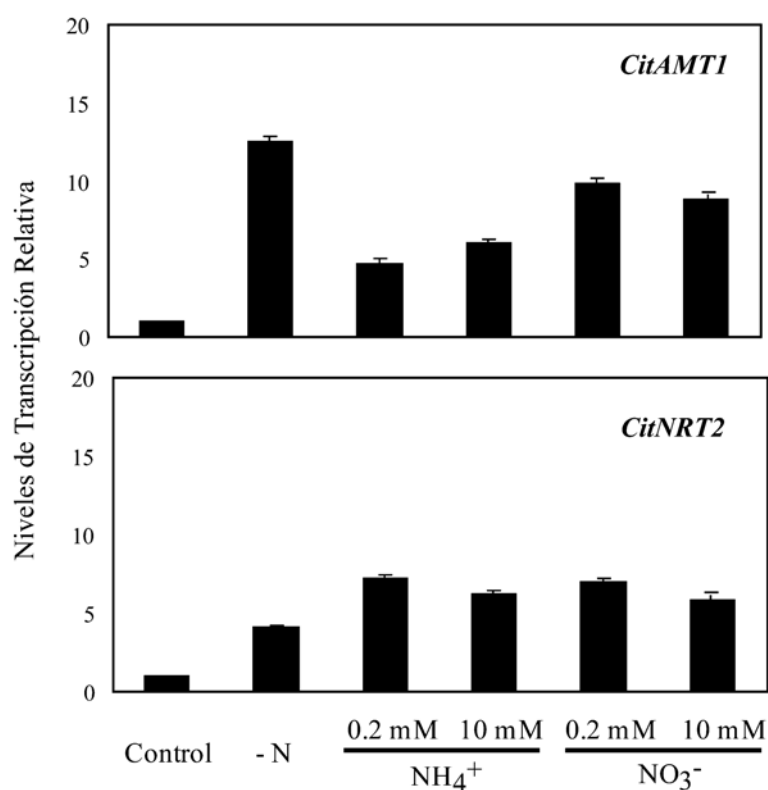


Figura 35. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación de la expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* en condiciones de de-represión.

La expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se determinó en las raíces de las plantas de cítricos mantenidas en solución de crecimiento (control). Posteriormente, las plantas permanecieron durante 3 días en solución de Hoagland carente de N y se midió la expresión de ambos genes (-N). Una vez transcurridos los 3 días las plantas se separaron en 4 grupos, a los grupos 1 y 2 se les adicionó NH_4^+ a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente y a los grupos 3 y 4 se les adicionó NO_3^- a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente. En estos grupos, la expresión de ambos genes se determinó en las raíces de cítricos a las 24 horas desde el momento de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- . Los niveles de transcripción de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se normalizaron frente a la expresión del rRNA *18S* medido en las mismas muestras.

Por otra parte, el gen *CitNRT2* también se de-reprime a los 3 días de carencia de N, aunque sus niveles de transcripción son 3.5 veces más pequeños que los del gen *CitAMT1* (Figura 35). En este caso, los niveles de transcripción del gen *CitNRT2* siguen incrementándose a las 24 horas, si en

la solución de carencia se adiciona NH_4^+ o NO_3^- a ambas concentraciones (0.2 mM y 10 mM).

4.3.4.2 Condiciones de de-inducción

Para llevar a cabo este experimento las plantas de citrange Troyer se trataron como se indica en el apartado 3.6.5 del Material y Métodos.

En la figura 36, al igual que se observa en la figura 31, los sistemas de transporte de alta afinidad se encuentran de-inducidos cuando las plantas de cítricos han permanecido durante 7 días en condiciones de carencia total de N. Una vez sometidas las plantas a un periodo de de-inducción durante 7 días, se adicionó NH_4^+ y NO_3^- a concentraciones 0.2 y 10 mM, observándose un incremento en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS a las 24 horas, respecto de las plantas control y respecto de las plantas de-inducidas.

La adición de NH_4^+ y de NO_3^- a la solución carente de N a las concentraciones 0.2 y 10 mM no produce ningún efecto en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS a las 24 horas de su adición, manteniéndose sus niveles constantes (Figura 36).

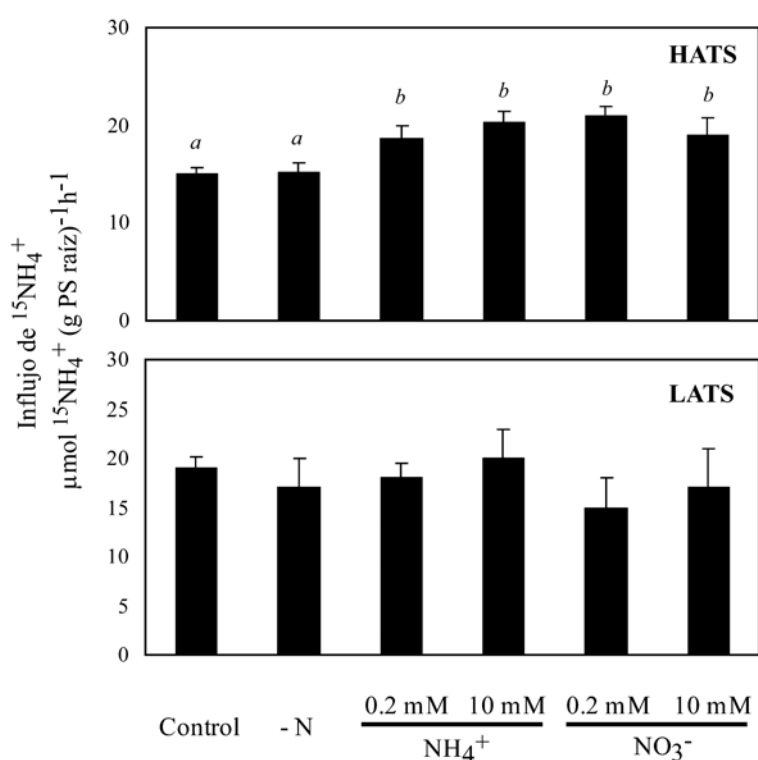


Figura 36. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación del influjo del ion $^{15}\text{NH}_4^+$ en condiciones de de-inducción.

Las plantas de cítricos se mantuvieron en solución de crecimiento (1 mM NH_4NO_3) y se midió el influjo del ion $^{15}\text{NH}_4^+$ al inicio del experimento (control). Posteriormente, las plantas permanecieron durante 7 días en solución de Hoagland carente de N (-N). Transcurridos los 7 días las plantas se separaron en 4 grupos, a los grupos 1 y 2 se les adicionó NH_4^+ a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente y a los grupos 3 y 4 se les adicionó NO_3^- a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente. El influjo del ion $^{15}\text{NH}_4^+$ se midió transcurridas 24 horas de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- . Cada punto es la media de 18 réplicas \pm SE. Valores que muestran la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Respecto a la expresión del gen *CitAMT1* se observa que en condiciones de carencia de 7 días su expresión es similar a la obtenida en plantas control (Figura 37). La adición de NH_4^+ a 0.2 y 10 mM produce a las 24 horas un aumento en los niveles de transcritos del gen. Sin embargo la adición de NO_3^- (0.2 y 10 mM) no produce ningún efecto sobre su expresión.

Por otra parte, los niveles de expresión relativos del gen *CitNRT2* también son similares en plantas control y en plantas mantenidas en condiciones de carencia de 7 días (Figura 37). En este caso, los niveles de transcripción del *CitNRT2* no varían si se adiciona NH_4^+ a 0.2 y 10 mM. Sin embargo, al adicionar NO_3^- a ambas concentraciones (0.2 y 10 mM) se incrementan sus niveles de expresión.

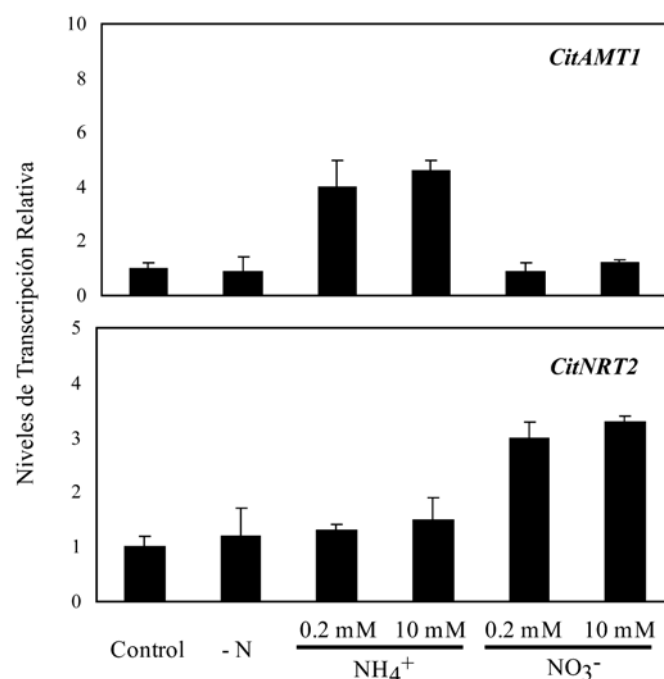


Figura 37. Efecto de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la regulación de la expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* en condiciones de de-inducción.

La expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se determinó en las raíces de las plantas de cítricos mantenidas en solución de crecimiento (control). Posteriormente, las plantas permanecieron durante 7 días en solución de Hoagland carente de N y se midió la expresión de ambos genes (-N). Una vez transcurridos los 7 días las plantas se separaron en 4 grupos, a los grupos 1 y 2 se les adicionó NH_4^+ a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente y a los grupos 3 y 4 se les adicionó NO_3^- a una concentración de 0.2 y 10 mM respectivamente. En estos grupos, la expresión de ambos genes se determinó en las raíces de cítricos a las 24 horas del momento de la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- . Los niveles de transcripción de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se normalizaron frente a la expresión de rRNA 18S medido en las mismas muestras.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Identificación y caracterización de los cDNAs de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2*

Se han aislado por primera vez los cDNA de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2*, pertenecientes a la familia de genes *AMT1* y *NRT2*, que codifican sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) implicados en el influjo de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$, respectivamente. Anteriormente, se han identificado genes homólogos al gen *CitAMT1* en otras especies vegetales tales como *Solanum lycopersicon* (Lauter y col., 1996, von Wirén y col., 2000b), *Arabidopsis thaliana* (Gazzarrini y col., 1999), *Oryza sativa* (von Wirén y col., 1997; Saiki y col., 2002; Kumar y col., 2003), *Brassica napus* (Pearson y col., 2002) y *Lotus japonicus* (Salvemini y col., 2001, D'Apuzzo y col., 2004). Asimismo, se han identificado genes homólogos del gen *CitNRT2* en *Hordeum vulgare* (Trueman y col., 1996); *Glycine max* (Amarasinghe y col., 1998), *Arabidopsis thaliana* (Filleur y Daniel-Vedele, 1999) y *Solanum lycopersicon* (Ono y col., 2000).

Se comparó la homología de las secuencias de aminoácidos de los transportadores *CitAMT1* y *CitNRT2* con las secuencias conocidas en otras especies vegetales, obteniéndose una homología para el *CitAMT1* del 85%,

80.9% y 80% con *Lotus japonicus* (AAG24944), *Camelia sinensis* (AB117640) y *Arabidopsis thaliana* (P54144), respectivamente (Figuras 9 y 10). A su vez, para el transportador CitNRT2, se ha obtenido una homología de 89 % con *Prunus persica* (BAD02939) y *Glicine max* (AAC09320) y del 87 % con *Populus tremula x Populus tremuloides* (CAG26716) (Figuras 11 y 12). El análisis de hidrofobicidad de ambas secuencias muestra que la proteína CitAMT1 presenta 11 dominios transmembrana con el extremo N-terminal extracitosólico y el C-terminal citosólico y la proteína CitNRT2 presenta 12 dominios transmembrana con ambos extremos N y C terminales citosólicos, de acuerdo con las predicciones hechas en otras especies vegetales (Figuras 13 y 14) (Howitt y Udvardi, 2000; Forde, 2000). Estos resultados sugieren que CitAMT1 es un nuevo miembro de la familia de transportadores AMT y CitNRT2 es un nuevo miembro de la familia de transportadores NRT2, siendo los primeros transportadores de NH_4^+ y de NO_3^- , respectivamente, que se han identificado en cítricos.

El gen *CitAMT1* se expresa en hojas, tallos y mayoritariamente en las raíces. En condiciones de carencia, se incrementa su expresión en las raíces, mientras que en las hojas se reduce (Figura 15). Esta reciprocidad en la expresión del gen *CitAMT1* en raíces u hojas en función de la concentración del N disponible en el medio, podría deberse a que en condiciones de carencia de N, la raíz necesita activar los transportadores de NH_4^+ para captar el máximo N posible del medio. Sin embargo, en condiciones óptimas de N en la planta, el sistema fotosintético producirá una gran cantidad de esqueletos carbonados necesarios para la asimilación de N, incrementándose así la demanda de N por la planta. En este caso de gran demanda de N, la absorción del NH_4^+ se produciría por el LATS y el NH_4^+ absorbido se transportaría a través del xilema hacia las hojas, donde se requeriría una elevada expresión del gen *CitAMT1*, para que las células de la

hoja satisfagan su demanda de NH_4^+ y sinteticen aminoácidos (Engineer y Kranz, 2007). Otra posible explicación del aumento de la expresión del gen *CitAMT1* en hojas, podría ser evitar la pérdida del NH_4^+ que se produce durante el proceso de fotorrespiración, incorporándolo nuevamente a la célula (Mayer y Ludewing, 2006).

5.2 Efecto de la modificación del metabolismo del C sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1*

La fotosíntesis regula la absorción del ión NH_4^+ en plantas de cítricos

Nuestros resultados muestran que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, mediado por el HATS en plantas de cítricos, es fuertemente dependiente de la luz y muestra marcados cambios diurnos, presentando una elevada tasa de influjo en la mitad del periodo diurno y una tasa muy baja durante el periodo de oscuridad (Figura 16). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otras especies vegetales, en los que se ha puesto de manifiesto que la absorción del ión NH_4^+ y de otros iones como NO_3^- , SO_4^{2-} o K^+ son dependientes de la luz y de las fluctuaciones diurnas (Delhon y col., 1995a; Peuke y Jeschke, 1998; Gazzarrini y col., 1999; Lejay y col., 1999; Kumar y col., 2003). Además, como se ha encontrado previamente en plantas herbáceas (Delhon y col., 1996; Lejay y col., 1999 y 2003; Matt y col., 2001), los cambios diurnos observados en la absorción del ión NH_4^+ en plantas de cítricos, no son debidos a la luz por si misma, sino a los fotoasimilados que podrían regular los sistemas de transporte del ión NH_4^+

presentes en la raíz por varias razones: primero, la actividad del HATS para el ión NH_4^+ (no así la del LATS) se estimula fuertemente al añadir sacarosa en la solución nutritiva durante el periodo de oscuridad (Figura 25); segundo, los cambios diurnos de la actividad del HATS para el ión NH_4^+ se correlacionan con la fotosíntesis y la acumulación de azúcares solubles en la raíz (comparar figuras 16 y 18); tercero, la luz continua mantiene un valor constante del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ a lo largo de las 24 h (Figura 22), lo que indica que las fluctuaciones día/noche, de la actividad del HATS, no son debidas al ritmo circadiano. Finalmente, se observa que la actividad del HATS es bruscamente reducida cuando las plantas son expuestas a bajas intensidades de luz, lo que demuestra que el efecto de la luz es cuantitativo, como era de esperar si existe un control asociado a la fotosíntesis.

En resumen, nuestros resultados revelan que, en cítricos, la regulación del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ es muy similar a lo que sucede en plantas herbáceas (Delhon y col. 1996; Gazzarrini y col., 1999; Lejay y col., 1999 y 2003). Sin embargo en este trabajo, se ha encontrado un resultado original, que muestra un estrecho paralelismo entre los cambios diurnos de la actividad del HATS para el ión NH_4^+ , la actividad fotosintética y la acumulación de azúcares en la raíz. En todos ellos, se observa un pico de máxima actividad a la mitad del periodo diurno, lo que sugiere una dependencia, casi inmediata, del transporte de la sacarosa hacia la raíz para que tenga lugar la absorción del ión NH_4^+ . Se sabe que la absorción de ambos iones NH_4^+ y NO_3^- es afectada en pocas horas, tanto por la intensidad de la luz como por la concentración de CO_2 en la atmósfera (Delhon y col. 1996; Matt y col., 2001), aunque la respuesta es más pronunciada para el ión NH_4^+ (Matt y col., 2001), ya que muestra un mayor cambio a las variaciones diurnas que el ión NO_3^- (Ourry y col., 1996; Lejay y col., 1999; Gazzarrini y col., 1999; Kumar y col., 2003). Estos resultados resaltan el importante papel

que juega la fotosíntesis sobre la regulación de la adquisición del ión NH_4^+ en las raíces. Otros estudios muestran que el ión NH_4^+ , debido a los bajos niveles encontrados en la raíz, es asimilado principalmente en este órgano (Chaillou y col., 1994), ésto sugiere que los esqueletos carbonados deben de estar disponibles en las raíces para poder incorporar cada ión de NH_4^+ absorbido por los sistemas de transporte. Este fuerte requerimiento de esqueletos carbonados, que no es aplicable a otros nutrientes minerales, es una razón convincente para asumir una respuesta rápida y apreciable de la absorción del ión NH_4^+ en las raíces ante cualquier cambio ambiental que afecte a la fotosíntesis. Por otro lado, nuestros datos proporcionan una nueva idea respecto a este hecho, al mostrar que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, también responde a la regulación endógena de la fotosíntesis que tiene lugar en ausencia de cambios ambientales. De hecho, el declive en la fijación de CO_2 al final del día, que se da en plantas expuestas a luz artificial de intensidad constante, ha sido atribuido con frecuencia al ritmo circadiano o a una retro-inhibición de la fotosíntesis (Rolland y col., 2002). En cítricos se ha encontrado que la actividad del HATS para el ión NH_4^+ sigue el mismo patrón que la actividad fotosintética en esas circunstancias, confirmando que los cambios diurnos del influjo de $^{15}\text{NH}_4^+$ son determinados, en última instancia, por las variaciones en la síntesis de carbohidratos y su transporte a las raíces como se ha demostrado con anterioridad por otros autores (Riens y col. 1994; Delhon y col. 1996).

Otro interesante resultado encontrado en este trabajo, es que cuando las plantas de cítricos están expuestas durante varios días a luz continua, los cambios diurnos de la actividad HATS para el ión NH_4^+ desaparecen, sin que se observe un incremento de la capacidad de absorción del ión NH_4^+ a lo largo del periodo estudiado (comparar figuras 16 y 22). Efectivamente, la estimulación observada de la actividad HATS para el ión NH_4^+ , durante el

periodo que correspondería con el de oscuridad, es compensada por una reducción en la absorción del ión NH_4^+ durante el resto del día. Esto indica que, a pesar de la regulación que ejerce la fotosíntesis, durante el ciclo día/noche, sobre los sistemas de absorción del ión NH_4^+ de las raíces, no es un factor que controle completamente la adquisición del ión NH_4^+ por las plantas. Esto podría sugerir que la exposición a la luz continua, en gran parte estaría compensada por una baja actividad fotosintética, que produciría la misma cantidad diaria de C fijado que cuando la planta está sometida a un fotoperiodo normal. Alternativamente, en condiciones de luz continua debería tener lugar, una mayor producción de esqueletos carbonados que provocaría un incremento de la absorción del ión NH_4^+ . Sin embargo este hecho no ocurre, probablemente debido a que esté actuando otro mecanismo de regulación como es la represión de la absorción del ión NH_4^+ por retroinhibición producida por metabolitos nitrogenados formados en el proceso de asimilación (Rawat y col., 1999; von Wirén y col., 2000a; Cerezo y col., 2001b; Loqué y von Wirén, 2004). Independientemente del mecanismo implicado, nuestros datos confirman que los cambios diurnos regulan a los sistemas de absorción y son importantes para que la planta ajuste la adquisición del N en función de la demanda necesaria para su crecimiento.

La expresión del gen CitAMT1 es inducible por sacarosa y podría justificar la regulación del HATS para el ión NH_4^+ causada por fotosíntesis

Otro resultado interesante encontrado, es que las condiciones de luz/oscuridad o la adición de sacarosa afectan a la actividad del HATS, pero no a la del LATS para el ión NH_4^+ (Figuras 16, 22, 23, 24 y 25). El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS en ausencia de luz o en condiciones de

bajo contenido de C permanece constante, posiblemente porque no hay en la planta limitación de energía o baja transpiración. Por el contrario, se observa en estas condiciones una represión de los sistemas de absorción HATS y además, la disminución de la intensidad luminosa modifica los parámetros cinéticos (K_m y $V_{máx}$, Tabla 5), sugiriendo que estos sistemas de transporte, pueden estar regulados a nivel postranscripcional por la fotosíntesis.

Aunque en este estudio no hemos investigado otros posibles miembros de la familia génica *AMT1* en cítricos, nuestros datos muestran que *CitAMT1* es probablemente uno de los transportadores que regula el HATS para el NH_4^+ por la fotosíntesis. Efectivamente, la acumulación del mRNA, en las raíces del gen *CitAMT1* es fuertemente estimulada tanto por la luz como por la sacarosa (Figuras 16, 21, 23, 24 y 25). Este hallazgo, sugiere que el control ejercido por la luz y los azúcares actúa a nivel molecular y son la clave del proceso regulador de la expresión de los genes responsables de codificar los transportadores del ión NH_4^+ en las raíces. Además, existe una estrecha correlación entre la actividad HATS para el ión NH_4^+ y el nivel de transcritos del gen *CitAMT1* en respuesta a los tratamientos con diferentes intensidades de luz o a la adición de azúcares en las raíces. Por ello, postulamos que la regulación del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ por la fotosíntesis, es causada, al menos en parte, por cambios en la expresión del gen *CitAMT1*. Debido al patrón similar encontrado entre el contenido de azúcares endógeno en las raíces y la fotosíntesis, sugerimos que, los azúcares podrían ser las moléculas señal que modulan la expresión del gen *CitAMT1* en función de la fotosíntesis, siendo el nexo de unión entre el metabolismo del C y del N en las plantas. Resultados similares han sido encontrados con anterioridad en *Arabidopsis thaliana* (Gazzarrini *et al*, 1999; Lejay y col., 2003), *Solanum lycopersicon* (von Wirén y col., 2000b) y *Oryza Sativa* (Kumar y col., 2003), en los que se comprobó que los genes *AMT* también se inducían por luz y/o

azúcares y estaban sujetos a cambios diurnos y estos cambios eran paralelos a la absorción del ión NH_4^+ . Recientemente Blasing y col. (2005), han encontrado que los azúcares contribuyen en mayor medida a los cambios de expresión de diferentes genes durante el ciclo diurno, que la propia luz y los metabolitos nitrogenados.

Los datos disponibles para *A. thaliana* confirman que los niveles de mRNA regulan el transporte de los iones NO_3^- y NH_4^+ por un estímulo dado y son los responsables de la respuesta del HATS para los iones NO_3^- y NH_4^+ a esos estímulos. De hecho, mutantes “knock-out” deficientes en el gen *AtAMT1.1* han perdido parte de la de-represión del HATS para el ión NH_4^+ en condiciones de carencia de N (Kaiser y col., 2002; Loqué y col., 2006). Lo mismo ocurre en mutantes carentes en el transportador del ión NO_3^- , *AtNRT2.1*, inducible por sacarosa, en el que la respuesta del HATS para el ión NO_3^- a tratamientos de luz y adición de sacarosa está muy atenuada cuando se comparan con el ecotipo silvestre (Lejay y col., 2003). Los resultados anteriores resaltan la importancia de la regulación a nivel transcripcional de los genes *AMT1*, sin embargo nuestros resultados no permiten descartar que también estén implicados mecanismos de regulación a nivel postranscripcional como han descrito anteriormente otros autores (Rawat y col., 1999; Loqué y von Wirén, 2004).

La regulación de la expresión del gen CitAMT1 es específica de sacarosa

En conjunto nuestros datos indican que la regulación de la absorción del ión NH_4^+ es bastante similar tanto a nivel fisiológico como molecular en plantas herbáceas y en plantas de cítricos. De este modo, el gen *CitAMT1* parece ser que juega el mismo papel que los genes *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3* en

Arabidopsis thaliana, o como el gen *OsAMT1.3* en arroz, asegurando el control por la fotosíntesis del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS. Sin embargo, un hecho original de este trabajo es que la expresión del gen *CitAMT1* y la actividad HATS para el ión NH_4^+ parecen estar específicamente estimuladas por la sacarosa y no por otros azúcares solubles como la glucosa y la fructosa, ni por ácidos carboxílicos como el 2-oxoglutarato y el malato (Figuras 26 y 27). De acuerdo con esto, la mejor correlación entre la expresión del gen *CitAMT1* y la concentración de azúcares en la raíz, se encuentra con la sacarosa y no con la glucosa ni la fructosa (Figuras 25 y 26).

La ausencia de efecto del 2-oxoglutarato y el malato sobre la expresión del gen *CitAMT1* es sorprendente, puesto que los ácidos carboxílicos son los principales esqueletos carbonados utilizados en la síntesis de aminoácidos. A pesar de ello, nuestros datos coinciden con los obtenidos por Lejay y col. (2003), los cuales muestran que la expresión de los genes inducibles por sacarosa, *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3*, no se incrementan en respuesta a la adición exógena de 2-oxoglutarato y malato. El efecto de otros azúcares diferentes a sacarosa no ha sido estudiado por estos autores y se desconoce. También, cabe destacar la regulación específica de la sacarosa sobre la actividad HATS para el ión NH_4^+ en los cítricos, que difiere del HATS para el ión NO_3^- , el cual se estimula indistintamente por sacarosa, glucosa o galactosa en *Arabidopsis thaliana* (Lejay y col., 2003). La estimulación por glucosa de la absorción del ión NO_3^- , también ha sido puesta de manifiesto en otras especies herbáceas (Delhon y col., 1996). Además, la inducción por azúcares del gen *AtNRT2.1*, el cual codifica un componente mayoritario del HATS para el ión NO_3^- (Cerezo y col., 2001a; Filleur y col., 2001), no es específica de la sacarosa y se ha relacionado con

el metabolismo del C en las primeras etapas de la glucólisis en las que actúa la enzima hexoquinasa (Lejay y col., 2003).

Por el momento se desconoce como la absorción del ión NH_4^+ se regula de manera específica por la sacarosa en cítricos, mientras que la absorción del ión NO_3^- en *A. thaliana* está controlada por compuestos que se encuentran al principio de la ruta del metabolismo de la sacarosa. Sin embargo, la sacarosa es la forma mayoritaria de C que se transporta por el floema, lo que la hace una muy buena candidata, como molécula señal, que coordine la actividad de los sistemas de transporte de N con el estado carbonado de las raíces. Además, varias rutas han sido identificadas como responsables de la regulación de la expresión de diversos genes vegetales mediada por azúcares (Rolland y col., 2002). Entre estas rutas, la sacarosa actúa como señal controlando varios procesos fisiológicos tales como la síntesis y degradación de almidón (Loreti y col., 2000; Fernie y col., 2001), la síntesis de fructano (Müller y col., 2000) y la síntesis de antocianinas (Solfanelli y col., 2006). La sacarosa como sensor específico actúa también a nivel molecular y modula la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo del C, incluyendo los que codifican la α -amilasa (Loreti y col., 2000), la sacarosa:fructano-6-fructosiltransferasa (Müller y col., 2000), enzimas de la ruta biosintética de las antocianinas (Solfanelli y col., 2006) o del factor de transcripción ATB2 regulado por luz (Rook y col., 1998). Lo más interesante, es que la sacarosa actúa como una molécula señal que regula la expresión de uno de sus propios sistemas de transporte, el simporte floemático H^+ /sacarosa, que juega un papel importante en el transporte de la sacarosa desde órganos fuente a órganos sumidero (Chiou y Bush, 1998). Así pues, nuestro hallazgo de que la sacarosa puede regular de manera específica los genes de los transportadores de NH_4^+ en las raíces, sugiere que es una señal pivotante que gobierna ambos procesos, asimilación y

utilización en los órganos sumidero así como asimilación y reparto en órganos fuente.

5.3 Efecto de la modificación del metabolismo del N sobre la regulación del influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1*

Las plantas de cítricos prefieren absorber N-NH_4^+ frente a N-NO_3^-

Nuestros resultados confirman que cuando ambas fuentes de N (NH_4^+ y NO_3^-) están presentes en la solución de absorción, en las plantas de cítricos se ve favorecido el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ frente al influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ (Figura 28). Esta preferencia por el ión NH_4^+ ha sido puesta de manifiesto anteriormente en cítricos (Serna y col., 1992), así como en otras especies vegetales (Macduff y Jackson, 1991; Gebler y col., 1998; Gazzarrini y col., 1999).

Además, parece ser que no hay ningún efecto recíproco del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ sobre el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ y viceversa. El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, mediado por el HATS y el LATS, es entre 3 y 5 veces superior al influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ y está correlacionado de forma positiva con el incremento de su concentración en la relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Sin embargo, el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$, mediado por el HATS y el LATS, permanece constante independientemente de la relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (Figura 28). Este hecho resulta sorprendente, porque en estudios previos en cítricos así como en otras especies vegetales, sí que se muestra una correlación positiva entre el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ y la concentración externa del mismo (Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995; Cerezo y col., 1997). Ello se podría explicar porque en estos estudios, el N no ha sido suministrado en la solución de influjo como una mezcla de NH_4^+ y NO_3^- .

La preferencia por absorber el ión NH_4^+ se mantiene cuando las plantas de cítricos están expuestas durante tres días a diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ o cuando ambos iones están presentes como única fuente de N, siendo los valores del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* superiores a los valores del influjo de $^{15}\text{NO}_3^-$ y la expresión del gen *CitNRT2* (Figura 29). En algunas especies vegetales se ha observado que algunos genes implicados en la asimilación del ión NO_3^- están reprimidos en presencia del ión NH_4^+ (Fernández y Cárdenas, 1989; Glass, 2003). Esta represión de la absorción del ión NO_3^- favorecería la absorción y asimilación del ión NH_4^+ , que supone un menor coste energético para la planta (Bloom y col., 1992).

El influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ se mantiene constante independientemente de la proporción de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ presente en el medio, pero varía cuando están presentes el NH_4^+ o el NO_3^- como única fuente de N, es decir el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ responde a la concentración de NH_4^+ presente en el medio. Sin embargo, el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ tiene un comportamiento diferente cuando está presente únicamente el NO_3^- o el resto de proporciones $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (Figura 29). Ello podría ser debido a que en el HATS para el NO_3^- tiene menor capacidad para absorber N que el HATS de NH_4^+ (Kronzucker y col., 1995 y 1996; Cerezo y col., 1997; Glass y col., 1997). Por tanto, cuando las dos fuentes de N están presentes, el sistema de mayor capacidad de absorción de N (en este caso el del ión NH_4^+) es el que está más favorecido y tendrá una mayor capacidad para responder a los cambios en la concentración externa de N. Por el contrario, el sistema de menor capacidad (en este caso el del ión NO_3^-) permanece en un nivel basal y sin capacidad de respuesta frente a las variaciones en la concentración externa. Esta respuesta diferente se puede explicar por una mayor sensibilidad a la concentración de N externa de la maquinaria de absorción del ión NO_3^- que la del ión NH_4^+ ,

puesto que el ión NO_3^- es una molécula esencial para la planta, implicada en diferentes procesos de regulación (Wang y col., 2000, 2001, 2003; Scheible y col., 2004).

Otro resultado interesante encontrado es que la expresión de los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* se correlaciona positivamente con el influjo de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por el HATS, respectivamente (Figuras 29 y 30). Esto evidencia que el *CitNRT2* es el responsable mayoritario del influjo de $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por el HATS y corrobora el papel del gen *CitAMT1*.

Los influjos de los iones $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{NO}_3^-$, mediados por el LATS, no se ven alterados cuando las plantas son expuestas a diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, lo que pondría de manifiesto la ausencia de control sobre este sistema, cuando el estado nitrogenado de la planta es óptimo como se ha observado en otras especies vegetales (Mäck y Tischner, 1994; Zhou y col., 1998; Wang y col., 1998). Estos resultados se contradicen con los encontrados anteriormente, en plantas de cítricos por Cerezo y col. (2001b), aunque estas discrepancias podrían ser debidas a que las plantas han sido cultivadas en condiciones diferentes en ambos estudios. Cerezo y col. (2001b) mostraron que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS estaba regulado por el estado nutricional de la planta, estando reprimido cuando las plantas habían crecido durante todo el tiempo en condiciones limitantes de N y por el contrario estaba favorecido en aquellas plantas que habían crecido en condiciones óptimas de N. Este hecho se explica por un efecto de disponibilidad de N para poder sintetizar proteínas en general y concretamente proteínas transportadoras, más que por un efecto de control.

En resumen, podemos concluir que las plantas de cítricos tienen preferencia para absorber el ión NH_4^+ frente al ión NO_3^- cuando ambas fuentes de N están presentes en la solución de absorción o cuando las plantas

se pretratan con diferentes proporciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, independientemente de la relación de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ en ambos casos. Una posible explicación a este hecho podría ser el menor gasto energético que le supone a la planta la asimilación del N- NH_4^+ y por la mayor capacidad que tiene el sistema de absorción de alta afinidad del ión NH_4^+ respecto al del ión NO_3^- .

El influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* están regulados por mecanismos de inducción, represión, de-represión y de-inducción en función de la fuente de N y de su disponibilidad en el tiempo.

En cítricos, tanto el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, así como la expresión del gen *CitAMT1* están reprimidos cuando las plantas han sido expuestas únicamente a N- NH_4^+ . Del mismo modo, el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitNRT2*, se reprimen cuando las plantas han sido expuestas a N- NO_3^- como única fuente de N. (Figuras 29 y 30). Estos resultados coinciden con otros estudios, que explican este hecho por la acción negativa de los propios iones o sus asimilados sobre los genes y/o los propios transportadores (Glass y Siddiqi, 1995; Kronzucker y col., 1996; von Wirén y col., 1997, 2000b; Gazzarrini y col., 1999; Pal'ove-Balang y col., 2002).

Por el contrario, cuando las plantas han sido expuestas a N- NH_4^+ como única fuente de N, se observa una estimulación máxima del influjo de NO_3^- mediado por el HATS, que se correlaciona con la expresión del gen *CitNRT2*. En este caso las plantas podrían interpretar que hay una carencia de NO_3^- y posiblemente por un mecanismo similar al de de-represión, se produce la estimulación del HATS y la expresión de *CitNRT2*, como ha sido

puesto de manifiesto anteriormente por otros autores (Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Zhuo y col., 1999; Ono y col., 2000; Gansel y col., 2001; Okamoto y col., 2003). Además, cuando se exponen a N-NO_3^- como única fuente de N, se observa un incremento del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, pero permanece constante la expresión del gen *CitAMT1*. En estas condiciones las plantas podrían estar interpretando la existencia de una carencia de NH_4^+ o detectar la presencia del ión NO_3^- . El incremento en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ producido por la de-represión del HATS en condiciones de carencia, ha sido puesto de manifiesto por diferentes autores en especies herbáceas (Gazzarrini y col., 1999; von Wirén y col., 2000b; Sonoda y col., 2003a). Nuestros resultados muestran que cuando las plantas de cítricos están expuestas durante una semana a carencia de NH_4^+ (presencia del ión NO_3^-) o carencia total de N, se produce una estimulación en el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS durante los primeros días y un descenso a los siete días (Figuras 31 y 32). En el primer caso, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ alcanza su máximo al tercer día y en el segundo al segundo día, lo que podría estar indicando mecanismos diferentes de activación. En las mismas condiciones se comprueba que la expresión del gen *CitAMT1* varía de forma diferente, permanece constante cuando las plantas están sometidas a carencia de NH_4^+ (presencia del ión NO_3^-) y sigue un patrón similar al del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el HATS, cuando las plantas están sometidas a carencia de N. En base a nuestros resultados, en condiciones de carencia de N total, parece que podrían estar operando dos mecanismos de regulación diferentes en función del tiempo de exposición a la carencia de N: 1) un mecanismo de de-represión tanto a nivel transcripcional como sucede con los genes *AtAMT1.1* en *Arabidopsis thaliana* (Gazzarrini y col., 1999) u *OsAMT1.1* y *OsAMT1.2* en *Oryza Sativa* (Kumar y col., 2003) así como, a nivel postranscripcional puesto que se ha

observado que se modifican los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ (Tabla 6). Yuan y col. (2007) muestran que el gen *AtAMT1.1* de *A. thaliana* está regulado a nivel postranscripcional por el estado nutricional de la planta. 2) Otro mecanismo de de-inducción a nivel transcripcional como ocurre con el gen *PtAMT1.2* en *Populus trichocarpa* (Couturier y col., 2006). Por otro lado, en condiciones de carencia de NH_4^+ (presencia del ión NO_3^-), parece que operen también dos mecanismos, uno de inducción a nivel postranscripcional, distinto al anterior, puesto que se modifican los parámetros cinéticos de forma diferente (Tabla 6) y otro podría ser debido a la inducción inicial y posterior represión por NO_3^- de otro gen de la familia *AMT*, presente posiblemente también en cítricos. En tomate, la transcripción del gen *LeAMT1.2* se induce por la adición de NH_4^+ y aún más por la adición de NO_3^- (Lauter y col., 1996; von Wirén y col., 2000b; Wang y col., 2001). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en especies herbáceas, en los que han puesto de manifiesto la presencia de múltiples genes de la familia *AMT* en el que cada uno puede ser responsable de modular la absorción del ión NH_4^+ por una señal endógena o exógena específica (luz, estado carbonado de la planta, disponibilidad de NH_4^+ y estado nitrogenado de la planta) (Gazzarrini y col., 1999; Rawat y col., 1999; Lejay y col., 1999; von Wirén y col 2001a). Respecto al LATS, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en cítricos, al igual que en plantas herbáceas (Mäck y Tischner, 1994), no responde a las condiciones de carencia de N, probablemente porque se produce un influjo pasivo del ión NH_4^+ por esta vía.

Finalmente, cabe destacar que hay una correlación entre el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ y la expresión del gen *CitNRT2* que nos indicaría una posible regulación a nivel transcripcional por la fuente de N disponible. Además, el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ y la expresión del gen *CitNRT2* muestran una mayor sensibilidad para responder a las variaciones de concentración de N externa,

que en el caso del gen *CitAMT1* y el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$. Esta diferencia podría indicar el importante papel que ejerce la expresión del gen *NRT2* como sensor tanto para la disponibilidad local de N como del estado nutricional de la planta e incluso de otros fenómenos no relacionados con la asimilación del N, como el crecimiento de raíces (Remans y col., 2006).

En conjunto podemos concluir que el influjo del ión $^{15}\text{NO}_3^-$ y la expresión del gen *CitNRT2* estarían sometidos a una regulación a nivel transcripcional, mientras que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* estarían sometidos a una regulación a nivel transcripcional y postranscripcional.

El influjo del ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* están regulados por mecanismos diferentes de inducción y de represión, en condiciones de carencia de N, en función de la fuente de N y de su concentración

La carencia de N presenta mecanismos de regulación del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* diferentes en función del tiempo. Cuando las plantas de cítricos se encuentran en condiciones de de-represión de sus sistemas de absorción de N (carencia en N durante 3 días), la represión, sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1*, que produce a corto plazo la adición de los iones NH_4^+ y NO_3^- es diferente (Figuras 34 y 35). Cuando se adiciona NH_4^+ en el medio, el influjo de éste ión mediado por el HATS, se reprime, de forma dependiente de la concentración externa del ión NH_4^+ , mientras que la expresión del gen *CitAMT1* también se reprime aunque de forma independiente. La mayor represión observada, al incrementarse la concentración del ión NH_4^+ , podría

deberse a que éste actúa inhibiendo directamente al transportador AMT1 y además, la glutamina producida durante el proceso de asimilación inhibe al gen *AMT1* (Rawat y col., 1999; von Wirén y col., 2000a). Estos resultados resaltan que el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen en estas condiciones estarían regulados por el ión NH_4^+ , tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Por otra parte, el influjo de ión $^{15}\text{NH}_4^+$ permanece constante al añadir NO_3^- . Esta diferencia en la represión por la fuente de N, podría ser debida a que el ión NH_4^+ es más rápidamente asimilado que el ión NO_3^- (Chaillou y col., 1994). Cabe destacar, que la expresión del gen *CitAMT1* se reprime ligeramente cuando se adiciona NO_3^- . La diferente respuesta que presentan el influjo y la expresión del gen al adicionar NO_3^- , se podría explicar por la puesta en marcha de un mecanismo de regulación a nivel postranscripcional debido al ión NO_3^- , o por la presencia de otro gen de la familia *AMT1* que no responde a la represión por el ión NO_3^- . Alternativamente y como se ha demostrado con anterioridad, el aumento de la expresión del gen *CitNRT2* observado, se debería a la adición del ión NO_3^- (Amarasinghe y col., 1998; Filleur y Daniel-Vedele, 1998; Ono y col., 2000; Gansel y col., 2001) y el incremento de la expresión del gen *CitNRT2* podría afectar negativamente a la expresión del gen *CitAMT1*. Con anterioridad en *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado la interacción reguladora recíproca que puede existir entre la expresión de genes de la misma familia e incluso de familias diferentes (Cerezo y col., 2001a; Kaiser y col., 2002; Muños y col., 2004). En lo que respecta al influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, mediado por el LATS, no parece sorprendente que en estas condiciones tampoco se produzca represión por la fuente de N o por su concentración, lo que confirmaría una vez más la ausencia de control sobre este sistema de transporte.

Finalmente, cuando las plantas de cítricos se encuentran en unas condiciones de de-inducción de sus sistemas de absorción de N (carencia en N durante 7 días), la inducción del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ que producen ambos iones, NH_4^+ y NO_3^- , es idéntica (Figuras 36 y 37). En este caso, el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, mediado por el HATS, se induce de manera independiente de la fuente de N y de su concentración, aunque el patrón de expresión del gen *CitAMT1* no es exactamente igual. La expresión de dicho gen, se induce por el ión NH_4^+ y permanece inalterable por la presencia del ión NO_3^- , lo que pondría de manifiesto nuevamente una regulación a nivel postranscripcional del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$, mediada por el ión NO_3^- , y/o a la presencia de un gen de la familia *AMT1* diferente al que tenemos caracterizado, y/o a la reciprocidad en la regulación la expresión de los genes *CitNRT2* y *CitAMT1*. Como era de esperar, no existe efecto inductor por N sobre el influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ mediado por el LATS.

De estos resultados se puede concluir que los mecanismos de regulación en condiciones de de-represión y de de-inducción del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ y la expresión del gen *CitAMT1* son dependientes de la fuente de N disponible y de su concentración. Cuando se adiciona NH_4^+ actúan posiblemente dos mecanismos, uno a nivel transcripcional y otro a nivel postranscripcional. Sin embargo, al adicionar NO_3^- podrían estar actuando tres mecanismos de regulación, uno postranscripcional, otro transcripcional de otro gen de la familia *AMT1* inducible por el ión NO_3^- y otro producido por la regulación recíproca de la expresión de los genes *CitNRT2* y *CitAMT1*.

La expresión del gen CitAMT1 responde tanto a la modificación del metabolismo del C como a la del metabolismo del N

En conjunto, nuestros resultados han mostrado que el gen *CitAMT1* tiene una elevada homología con los genes *AMT1* que codifican sistemas de transporte de alta afinidad para el ión NH_4^+ en otras especies vegetales, siendo el primer miembro de la familia de transportadores AMT que se ha identificado en cítricos. Los estudios de regulación de la expresión del gen *CitAMT1* han puesto de manifiesto que su expresión no depende del ritmo circadiano y es estimulada específicamente por la sacarosa, que modula su expresión en función de la fotosíntesis. Además, en función del N disponible en el medio su expresión se reprime o induce por diferentes mecanismos. Éste es un resultado interesante, porque aunque no se descarta la existencia de otros genes *AMT* en cítricos, el gen *CitAMT1* responde tanto a la modificación del metabolismo del C como del N. Contrariamente, en todas las especies vegetales estudiadas hasta la fecha, la inducción por luz y azúcares ocurre sólo en uno o dos miembros específicos de la familia multigénica *AMT*. En la mayoría de los casos, los otros genes *AMT* responden a otros estímulos. En *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, la luz y los azúcares estimulan en las raíces la expresión de los genes *AtAMT1.2* y *AtAMT1.3*, pero no el gen *AtAMT1.1*, el cual se de-reprime por carencia de N (Gazzarrini y col., 1999; Rawat y col., 1999). En arroz, sólo la expresión del gen *OsAMT1.3* en las raíces responde a cambios diurnos, mientras que los genes *OsAMT1.1* y *OsAMT1.2* (pero no *OsAMT1.3*) son de-reprimidos por carencia de N (Kumar y col., 2003). Esta regulación diferente también se ha encontrado en otras especies como *Solanum lycopersicon* (von Wirén y col., 2000b) y *Lotus japonicus* (D'Apuzzo y col., 2004), en las que se sugiere que cada gen *AMT* puede ser responsable de modular la absorción del ión NH_4^+ por una señal endógena o exógena específica (luz, estado carbonado de la planta, disponibilidad de NH_4^+ y estado nitrogenado de la planta).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los genes *CitAMT1* y *CitNRT2* son los responsables mayoritarios del influjo mediado por el HATS de los iones NH_4^+ y NO_3^- , respectivamente.

2. Los cambios diurnos de la actividad del HATS para el ión NH_4^+ y la expresión del gen *CitAMT1* se correlacionan con la fotosíntesis y no son debidos al ritmo circadiano.

3. El influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1* son específicamente estimulados por la sacarosa a nivel transcripcional, pero no podemos descartar un mecanismo postranscripcional.

4. La sacarosa podría ser la molécula señal que modula la expresión del gen *CitAMT1* en función de la fotosíntesis, siendo ésta el nexo de unión entre el metabolismo del C y del N en cítricos.

5. Las plantas de cítricos prefieren absorber N- NH_4^+ frente a N- NO_3^- cuando ambas formas están presentes, independientemente de su proporción.

6. La carencia de NH_4^+ (presencia del ión NO_3^-) regula a nivel postranscripcional el influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS.

7. La carencia de N total regula a nivel postranscripcional y transcripcional el influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1*.

8. El influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1* se de-reprimen y de-inducen en función del tiempo de carencia de N y se inducen y reprimen en función de la fuente de N disponible y de su concentración.

9. El influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1*, en condiciones de de-represión y de de-inducción, cuando se adiciona NH_4^+ , son regulados a nivel transcripcional y/o postranscripcional.

10. La regulación del influjo del ión NH_4^+ mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1*, en condiciones de de-represión y de de-inducción, cuando se adiciona NO_3^- , se debe a varios mecanismos: un mecanismo de regulación a nivel postranscripcional, otro a nivel transcripcional de otro gen de la familia *AMT1* inducible por el ión NO_3^- y/o una regulación recíproca por la expresión de ambos genes *CitNRT2* y *CitAMT1*.

11. El gen *CitAMT1* podría desempeñar el papel propuesto para los genes *AMT1.1*; *AMT1.2* y *AMT1.3* de plantas herbáceas, puesto que responde tanto a la modificación del metabolismo del C como del N.

12. La regulación del influjo del ión NH_4^+ , mediado por el LATS, no se ve afectada por cambios del metabolismo del C ni del N.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST – a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **25**: 3389-3402

Amarasinghe BHRR, Bruxelles GL, Braddon M, Onyeocha I, Forde BG, Udvardi MK (1998) Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta*. **206**: 44-52

Aslam M, Travis RL, Huffaker RC (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology*. **99**:1124-1133.

Aslam M, Travis RL, Huffaker RC (1994) Stimulation of nitrate y nitrite efflux by ammonium in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology*. **106**:1293-1301

Aslam M, Travis RL, Rains DW (2001) Inhibition of net nitrate uptake by ammonium in pima and acala cotton roots. *Crop Science*. **41**:1130-1136

Aslam M, Travis RL, Rains DW, Huffaker RC (1996) Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport systems in roots of intact barley (*Hordeum vulgare* L) seedlings. *Planta*. **200**: 58-63

Baozhen L, Weijie X, Shubin S, Qirong S, Guohua X (2006) Physiological and Molecular Responses of Nitrogen-starved Rice Plants to Re-supply of Different Nitrogen Sources. *Plant and Soil*. **287**: 145-159

Becker D, Stahnke R, Fendrick I, Frommer WB, Vanderleyden J, Kaiser WM, Hedrich R (2002) Expression of the ammonium transporter gene *LeAMT1;2* is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. *Planta*. **215**: 424–429

Behl R, Tischner R, Raschke K (1988) Induction of a high-capacity nitrate uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low-capacity mechanism. *Planta*. **176**: 235-240

Berleth T, Sachs T (2001) Plant morphogenesis: long distance coordination and local patterning. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**: 57-62

Blasing OE, Gibon Y, Gunther M, Hohne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadle B, Sheible WR, Stitt M (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **17**:3257-3281

Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology*. **99**: 1294-1301

Botella MA, Cerdá AC, Lips SH (1994) Kinetics of NO₃⁻ and NH₄⁺ uptake by wheat seedlings. Effect of salinity and nitrogen source. *Journal of Plant Physiology*. **144**: 53-57

Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*. **159**: 567-584

Britto DT, Siddiqi MY, Glass ADM, Kronzucker HJ (2001) Futile membrane ion cycling: a new cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*. **98**: 4255-4258.

Cerezo M (2001) Caracterización de los sistemas de absorción de nitrato en los cítricos e influencia de la salinidad en los mismos. Tesis Doctoral. Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L. ed, II

Cerezo M, Camañes G, Flors V, Primo-Millo E, García-Agustín P (2007) Regulation of nitrate transport in *Citrus* rootstocks depending of Nitrogen availability. *Plant Signalling Behaviour (aceptado)*.

Cerezo M, Flors V, Legaz F, García-Agustín P (2000) Characterization of the low affinity transport system for NO₃⁻ uptake by *Citrus* roots. *Plant Science*. **160**: 95-104

Cerezo M, GarciaAgustin P, Serna MD, PrimoMillo E (1997) Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Science*. **126**: 105-112

Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Munos S, Daniel-Vedele F, Gojon A (2001a) Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **127**: 262-271

Cerezo M, Tillard P, Gojon A, Primo-Millo E, Garcia-Agustin P (2001b) Characterization and regulation of ammonium transport systems in *Citrus* plants. *Planta*. **214**: 97-105

Chaillou S, Rideout JW, Raper CD, Morot-Gaudry JF (1994) Responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split-root system. *Physiology Plantarum*. **90**: 259-268.

Chiou TJ, Bush DR (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 4784-4788

Clarkson DT, Gojon A, Saker LR, Wiersema PK, Purves JV, Tillard P, Arnold GM, Paans AJM, Vaalburg W, Stulen I (1996) Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: Direct comparison of ¹³N and ¹⁵N tracing. *Plant Cell and Environment*. **19**: 859-868

Clarkson DT, Lüttge U (1986) Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport systems. *Progress in Botany*. **52**:61-83

Cooper HD, Clarkson DT (1989) Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals – a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient-uptake. *Journal of Experimental Botany*. **40**: 753-762

Coruzzi G, Bush DR (2001) Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signalling in plants. *Plant Physiology*. **125**: 61-64.

Coruzzi G, Zhou L (2001) Carbon and nitrogen sensing and signalling in plants: Emerging “matrix effects”. *Current Opinion of Plant Biology*. **4**: 247-253

Couturier J, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D, Chalot M (2007) The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytologist* **174**: 137-150

Cramer MD, Lewis OAM (1993) The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea Mays*) plants. *Annals of Botany*. **72**: 359-365

Crawford NM, Forde BG (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In *The Arabidopsis Book*, Ed. Meyerowitz E, Somerville C.

Crawford NM, Glass ADM (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Science*. **3**: 389-395

Criddle RS, Ward MR, Huffaker RC (1988) Nitrogen uptake by wheat seedlings, interactive effects of four Nitrogen-sources: NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ y urea. *Plant Physiology*. **86**: 166-175

Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion of Plant Biology*. **1**: 235-239

D'Apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, El Alaoui H, Barbulova A, Betti M, Dimou M, Katinakis P, Marquez A, Marini AM, Udvardi MK, Chiurazzi M (2004) Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation spatial expression. *Plant Physiology*. **134**: 1763-1774

Deane-Drummond CE, Glass ADM (1983) Short-Term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. 1. Control of net uptake by NO_3^- efflux. *Plant Physiology*. **73**: 100-104

Dejoux JF, Recous S, Meynard JM, Trinsoutrot I, Leterme P (2000) The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil*. **218**: 257-272

Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L (1995a) Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants.1. Changes in NO_3^- influx, efflux, and N utilization in the plant during the day-night cycle. *Journal of Experimental Botany*. **46**: 1585-1594

Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L (1995b) Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants.2. Relationship with accumulation of NO_3^- and asparagine in the roots. *Journal of Experimental Botany*. **46**: 1595-1602

Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L (1996) Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants. 4. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *Journal of Experimental Botany*. **47**: 893-900

Edwards JH, Horton BD (1982) Interaction of seedlings to $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratios in nutrient solutions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **107**:142-147

Engineer CB, Kranz RG (2007) Reciprocal leaf and root expression of *AtAMT1.1* and root architectural changes in response to nitrogen starvation. *Plant Physiology*. **143**:236-250

Feingenbaum S, Bielorai H, Erner Y, Dasberg S (1987) The fate of ^{15}N labelled nitrogen applied to mature citrus trees. *Plant and Soil*. **97**: 179–187

Fernández E, Cárdenas J (1989) Genetic and regulatory aspects of nitrate assimilation in algae. In: *J.L. Wray and J.R. Kinghorn* (Eds.) *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*. Oxford University Press, Oxford, pp. 101-124

Fernie AR, Roessner U, Trethewey RN, Willmitzer L (2001) The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber. *Planta* **213**: 418-426

Filleur S, Daniel-Vedele F (1999) Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*. **207**: 461-469

Filleur S, Dorbe MF, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters*. **489**: 220-224

Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimie Biophysics Acta* **1465**: 219-235

Forde BG (2002a) The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 39-43

Forde BG (2002b) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Reviews of Plant Biology*. **53**: 203-224

Forde BG, Clarckson DT (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research*. **30**: 1-90

Foyer CH, Parry M, Noctor G (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*. **54**: 585-593

Fraisier V Dorbe MF, Daniel-Vedele F (2001) Identification and expression analyses of two genes encoding putative low-affinity nitrate transporters from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology*. **45**:181-190

Fraisier V, Gojon A, Tillard P, Daniel-Vedele F (2000) Constitutive expression of putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *The Plant Journal*. **23**: 489-96

Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A (2001) Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal*. **26**: 143-155

Gazzarrini S, Lejay T, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*. **11**: 937-947

Gebler A, Kopriva S, Rennenberg H (2004) Regulation of nitrate uptake at the whole-tree level: interaction between nitrogen compounds, cytokinins and carbon metabolism. *Tree Physiology* **24**:1313-1321

Gebler A, Schneider S, von Sehbusch D, Weber P, Hanemann U, Huber C, Rothe A, Kreutzer K, Rennenberg H (1998) Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytologist*. **138**:275-285

Glass ADM (2003) Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **22**:453-470

Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kinghom JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE, Vidmar JJ (2002) The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 855-864

Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat SR, Siddiqi MY, Silim SM, Vidmar JJ, Zhuo D (2001) Nitrogen transport in plants, with emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. *Zeitschrift für Pflanzenernährung Bodenkunde*. **164**: 199–207

Glass ADM, Erner Y, Kronzucker HJ, Schjöerring JK, Siddiqi MY, Wang M-Y (1997) Ammonium fluxes into plant roots: energetic, kinetics and regulation. *Zeitschrift für Pflanzenernährung Bodenkunde*. **160**: 261–268

Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiology*. **99**:456-463

Glass ADM, Siddiqi MY (1995) Nitrogen absorption in higher plants. In: HS Srivastava, RP Singh (eds) Nitrogen nutrition in higher plants. Association Publishing, New Delhi, India, pp 21-55

Guo FQ, Wang RC, Chen MS, Crawford NM (2001) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNrt1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell*. **13**: 1761-1777

Guo FQ, Wang RC, Crawford NM (2002) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (*CHL1*) is regulated by auxin in both shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 835-844

Guo FQ, Young J, Crawford NM (2003) The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought stress susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **15**: 107-117

Hartman PL, Mills HA, Jones Jr. JB (1986) The influence of nitrate: ammonium ratios on growth, fruit development, and element concentration in “Floradel” tomato plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **111**:487-490

Haynes RJ, Goh KM (1978) Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biological Reviews*. **53**:465-510

Hoagland DR, Arnon DJ (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. St. Circ.* **347**: 1-32

Hole DJ, Emran AM, Fares Y, Drew MC (1990) Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with ¹³N. *Plant Physiology*. **93**:642-647

Howitt SM, Udvardi MK (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica Biophysica Acta-Biomembrane*. **1465**: 152-170

Huang NC, Chiang CS, Crawford NM, Tsay YF (1996) *Chl1* encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *The Plant Cell*. **8**: 2183-2191

Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell*. **11**: 1381-1392

Imsande J, Touraine B (1994) N-Demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology*. **105**: 3-7

Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass ADM (2002) Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "Knockout" of the high-affinity NH₄⁺ transporter *AtAMT1.1*. *Plant Physiology*. **130**: 1263-1275

Kirk GJD, Kronzucker HJ (2005) The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: a modelling study. *Annals Botany*. **96**:639-646

Koch KE (1997) Molecular crosstalk and the regulation of C- and N-responsive genes, In: C.H. Foyer, W.P. Quick (Eds.), *A Molecular Approach to Primary Metabolism in Higher Plants*, Taylor and Francis, London, pp. 105-124

Kosola KR, Bloom AJ (1994) Methylammonium as a transport analog for ammonium in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Physiology*. **105**: 435-442

Krapp A, Fraiser V, Scheibel WR, Quesada A, Gojon A, Stitt M, Caboche M, Daniel-Vedele F (1998) Expression studies of *Nrt2* : *INp*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *The Plant Journal*. **14**: 723-731

Kronzucker HJ, Glass ADM, Siddiqi Y (1999a) Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley: Analysis of component fluxes. *Plant Physiology*. **120**:283-291.

Kronzucker HJ, Kirk GJD, Siddiqi MY, Glass ADM (1998) Effects of hypoxia on $(\text{NH}_4^+)^{15}\text{N}$ - fluxes in rice roots - Kinetics and compartmental analysis. *Plant Physiology*. **116**: 581-587

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1995) Kinetics of NO_3^- Influx in *Spruce*. *Plant Physiology*. **109**: 319-326

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1996) Kinetics of NH_4^+ influx in *Spruce*. *Plant Physiology*. **110**: 773-779

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM, Kirk GJD (1999b) Nitrate–ammonium synergism in rice: a subcellular flux analysis. *Plant Physiology*. **119**:1041–1046

Kumar HJ, Silim SN, Okamoto M, Siddiqi MY, Glass ADM (2003) Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies *indica*. *Plant, Cell and Environment*. **26**: 907–914

Lainé P, Ourry A, Boucaud J (1995) Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L. Effects of localized nitrate supply. *Planta*. **196**: 77-83

Lancien M, Ferrario-Méry S, Roux Y, Bismuto E, Masclaux C Hirel B, Nadal P, Hodges M (1999) Simultaneous expression of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and other Krebs cycle genes alter nitrate resupply so short-term nitrogen starved tobacco. *Plant Physiology*. **120**:717-725

Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW, Frommer WB (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **93**: 8139-8144

Lee RB, Drew MC (1989) ^{15}N studies of nitrate fluxes in barley roots. 2. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. *Journal of Experimental Botany*. **37**: 1768-1779

Legaz F (1993) Absorción, distribución y translocación del nitrógeno en cítricos. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia

Legaz F y Primo-Millo E (1988a) Normas para la fertilización de los agrios. IVIA, Generalitat Valenciana. Serie "Fullets Divulgación nº 15-88 Consellería de Agricultura y Pesca, Generalitat Valenciana.

Legaz F, Primo-Millo E (1988b) Absorption and Distribution of ¹⁵Nitrogen applied to Young Orange Trees. Proceedings of the 6th International Citrus Congress, Tel Aviv, Israel **2**: 643–661.

Legaz F, Serna MD, Primo-Millo E (1995) Mobilization of the reserve N in citrus. *Plant and Soil*. **173**:205-210

Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: Functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell*. **15**: 2218-2232

Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A (1999) Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal*. **18**: 509-519

Li SM, Shi WM (2006) Quantitative Characterization of Nitrogen Regulation of *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* y *OsAMT2.2* Expression in Rice Seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*. **53**:837-843

Lin CM, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY, Tsay YF (2000) Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiology*. **122**:379-388

Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedel F, Krapp A, Malamy JE (2005) the putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **102**: 13693-13698

Liu KH, Huang CY, Tsay YF (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell*. **11**: 865-874

Liu KH, Tsay YF (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO Journal*. **22**: 1-9

Loqué D, Ludewig U, Yuan L, von Wirén N (2005) Tonoplast aquaporins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiology*. **137**: 671-680

- Loqué D, von Wirén N** (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany*. **55**: 1293-1305
- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H, von Wirén N** (2006) Additive contribution of *AtAMT1.1* and *AtAMT1.3* to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*. **48**:522-534
- Loreti E, Alpi A, Perata P** (2000) Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of α -amylase in barley embryos. *Plant Physiology*. **123**: 939-948
- Ludewig U, von Wirén N, Frommer WB** (2002) Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter *LeAMT1.1*. *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 13548-13555
- Ludewig U, Wilken S, Wu B, Jost W, Obrdlik P, El Bakkoury M, Marini AM, Andre B, Hamacher T, Boles E, von Wirén N, frommer WB** (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH_4^+ uniporters. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 45603–45610
- MacDuff JH, Jackson SB** (1991) Growth and preferences for ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. *Journal of Experimental Botany*. **42**: 521-530
- Mäck G, Tischner RJ** (1994) Constitutive and inducible net NH_4^+ uptake of barley (*Hordeum vulgare*. L.) seedlings. *Plant Physiology*. **144**: 351-357
- Mansell RS, Fiskell JGA, Calvert DV, Rogers JS** (1986) Distributions of labeled nitrogen in the profile of a fertilized sandy soil. *Soil Science*. **141**: 120-126
- Marini AM, Andre B** (2000) *In vitro* N-glycosylation of the mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Molecular Microbiology*. **38**:552-564
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, Andre B** (1994) Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*. **13**:3456-3463
- Marschner H** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, Ed 2. Academic Press, London

Mata C, van Vemde N, Clarkson DT, Martins-Loucao MA, Lambers H (2000) Influx, efflux and net uptake of nitrate in *Quercus suber* seedlings. *Plant and Soil*. **221**: 25-32

Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M (2001) Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment*. **24**: 1119-1137

Mayer M, Ludewig U (2006) Role of *AMT1.1* in NH_4^+ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*. **8**:522-528

McClure PR, Kochian LV, Spanswick RM, Shaff JE (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology*. **93**:290-294

Mehouachi J, Serna D, Zaragoza S, Agusti M, Talon M, Primo-Millo E (1995) Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate-levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus Unshiu*. *Plant Science*. **107**: 189-197

Min X, Siddiqi MY, Guy RD, Glass ADM, Kronzucker HJ (2000) A comparative kinetic analysis of nitrate and ammonium influx in two early-successional tree species of temperate and boreal forest ecosystems. *Plant, Cell and Environment* **23**: 321-328

Mistrik I, Pavlovkin J, Wachter R, Pradel KS, Schwalm K, Hartung W, Mathesius U, Stohr C, Ullrich CI (2000) Impact of *Agrobacterium tumefaciens*-induced stem tumors on NO_3^- uptake in *Ricinus communis*. *Plant and Soil*. **226**: 87-98

Mooney PA, Richardson AC (1994) Seasonal trends in the uptake and distribution of nitrogen in satsuma mandarins. In *Proceedings of 7th International Citrus Congress, 1992*, Acireale, Italy, pp. 593–597.

Morgan MA, Jackson WA (1988) Inward and outward movement of ammonium in root systems: transient responses during recovery from nitrogen deprivation in presence of ammonium. *Journal of Experimental Botany*. **39**:179-191

Morgan MA, Jackson WA, Volk RJ (1985) Uptake and assimilation of nitrate by corn roots during and after induction of the nitrate uptake system. *Journal of Experimental Botany*. **36**: 859-869

Müller J, Aeschbacher, RA, Sprenger N, Boller T, Wiemken A (2000) Disaccharide-mediated regulation of sucrose: fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology*. **123**: 265-273

Muños S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A (2004) Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter *NRT1.1* in the regulation of another nitrate transporter, *NRT2.1*. *The Plant Cell*. **16**: 2433-2447

Nakamura Y, Umemiya Y, Masuda K, Inoue H, Fukumoto M (2007) Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding a putative *NRT2* nitrate transporter from peach. *Tree Physiology*. **27**:503-510

Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB (1994) Identification of a High-Affinity NH_4^+ Transporter from plants. *EMBO Journal*. **13**: 3464-3471

Okamoto M, Kumar A, Li WB, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNrt3.1*. *Plant Physiology*. **140**: 1036-1046

Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (2003) Regulation of *Nrt1* and *Nrt2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology*. **44**: 304-317

Ono F, Frommer WB, von Wiren N (2000) Coordinated diurnal regulation of low- and high-affinity nitrate transporters in tomato. *Plant Biology*. **2**: 17-23

Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F (2004) Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta*. **219**: 714-721

Orsel M, Filleur S, Fraiser V, Daniel-Vedele F (2002a) Nitrate transport in plants: which gene and which control? *Journal of Experimental Botany*. **47**: 871-883

Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002b) Analysis of the *NRT2* nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology*. **129**: 886-896

Ourry A, Macduff JH, Ougham HJ (1996) The relationship between mobilization of N reserves and changes in translatable messages following defoliation in *Lolium temulentum* L and *Lolium perenne* L. *Journal of Experimental Botany*. **47**: 739-747

Pal'ove-Balang P, Mistrik I (2002) Differential effect of amino acids on nitrate uptake by intact maize roots. *Biologia*. **57**: 119-124

Pao SS, Paulsen IT, Saier Jr MH (1998) Major Facilitator Superfamily *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34

Pearson CJ, Finnegan PM, Schjöerring JK (2002) Regulation of the high-affinity ammonium transporter (BnAMT1;2) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant Molecular Biology*. **49**: 483-490.

Peuke AD, Jeschke WD (1998) The effects of light on induction, time courses, and kinetic patterns of net nitrate uptake in barley. *Plant, Cell and Environment*. **21**: 765-774

Quaggiotti S, Ruperti B, Borsa P, Destro T, Malagoli M (2003) Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany*. **54**:1023-1031

Quesada A, Galván A, Fernández E (1994) Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. **5**: 407-419

Quesada A, Krapp A, Trueman LJ, Daniel-Vedele F, Fernández E, Forde BG, Caboche M (1997) PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Molecular Biology*. **34**: 265-274

Quiñones A, Bañuls J, Primo-Millo E, Legaz F (2005) Recovery of the ¹⁵N-labelled fertiliser in citrus trees in relation with timing of application and irrigation system. *Plant and Soil*. **268**: 367-376

Raper CD, Vessey JK, Henry LT (1991) Increase in nitrate uptake by soybean plants during interruption of the dark period with low intensity light. *Physiologia Plantarum*. **81**:183-189

Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1999) *AtAmt1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal*. **19**: 143-152

Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A (2006) A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**: 909-921

Riens B, Lohaus G, Winter H, Heldt HW (1994) Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia-Oleracea* L) and barley (*Hordeum-Vulgare* L). *Planta* **192**: 497-501

Robinson D (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist*. **127**: 635-674

Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*. S185-S205

Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S (1998) Sucrose-specific signaling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal*. **15**: 253-263

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

Ruffy TW, MacKown CT, Volk RJ (1989). Effects of altered carbohydrate availability on whole-plant assimilation of $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiology*. **89**:457-463.

Saiki S, Sonoda Y, Ikeda A, Yamaya T, Yamaguchi J (2002) Functional analysis of rice ammonium transporter gene *OsAMT1;3*. *Plant and Cell Physiology*. **43(S)**: 127

Salvemini F, Marini AM, Riccio A, Patriarca EJ, Chiurazzi M (2001) Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. *Gene*. **270**: 237-243

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2^a Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Santi S, Locci G, Pinton R, Cesco S, Varanini Z** (1995) Plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots induced for NO₃⁻ uptake. *Plant Physiology*. **109**:1277-1283
- Scaife A** (1989) A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant and Soil*. **114**:139-141
- Scaife A, Schloemer S** (1994) The diurnal pattern of nitrate uptake and reduction by spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Annals of Botany* **73**:337-343
- Scheible WR, Gonzalez FA, Lauerer M, Muller RB, Caboche M, Stitt M** (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*. **9**: 783-798
- Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M** (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*. **136**: 2483-2499
- Schjörriing JK, Husted S, Marck G, Mattsson M** (2002) The regulation of ammonium translocation in plants. *Journal of Experimental Botany*. **53**:883-890
- Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flugge UI, Kunze R** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology*. **131**:16-26
- Segel IH** (1975) Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems, in: Enzyme s. John Wiley y Jons (Eds), New York, pp 100-160.
- Serna MD, Borrás R, Legaz F, Primo-Millo E** (1992) The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant and Soil*. **147**: 13-23
- Shelden MC, Dong B, de Bruxelles GL, Trevaskis B, Whelan J, Ryan PR, Howitt SM, Udvardi** (2001) *Arabidopsis* ammonium transporters, *AtAMT1.1* and *AtAMT1.2* have different biochemical properties and functional roles. *Plant and Soil*. **231**: 151-160

Shelp BJ (1987) Plant characteristics and nutrient composition and mobility of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) supplied with NH_4^+ , NO_3^- or NH_4NO_3 . *Journal of Experimental Botany*. **38**:1603-1618.

Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ, Rufty TW Jr (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant Physiology*. **93**:1426-1432.

Siddiqi MY, Glass ADM, Thomas JR, Mala F (1989) Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{13}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiology*. **90**:806-813.

Simon-Rosin U, Wood C, Udvardi MK (2003) Molecular and cellular characterization of LjAMT2.1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*. **51**: 99-108

Smart DR, Bloom AJ (1998) Investigations of ion absorption during NH_4^+ exposure I. Relationship between H^+ efflux and NO_3^- absorption. *Journal of Experimental Botany*. **49**:95-100.

Smith PF (1966) *Citrus Nutrition. In temperate and Tropical Fruit Nutrition*. Ed. N F Childers Hort. Pub State Univ: New Brunswick, New Jersey Chap. VII, pp 174-207

Sohlenkamp C, Suelden M, Howitt S, Udvardi M (2000) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Letters*. **467**:273-278

Sohlenkamp C, Wood CC, Roeb GW, Udvardi MK (2002) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiology*. **130**: 1788-1796

Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **140**: 637-646

Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wirén N, Yamaya T, Yamaguchi J (2003a) Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3) in rice. *Plant and Cell Physiology*. **44**: 726-734.

Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, Yamaya T, Yamaguchi J (2003b) Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. *Plant and Cell Physiology*. **44**: 1396-1402

Stark JM, Hart SC (1997) High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forest. *Nature*. **385**: 61-64

Stitt M (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion of Plant Biology*. **2**: 178-186

Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* **22**:583-621

Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 959-970

Suárez MF, Avila C, Gallardo F, Canton FR, García-Gutiérrez A, Claros MG, Canovas FM (2002) Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 891-904

Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, von Wiren N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T (2003) Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology*. **44**: 206-211

Thomas GH, Mullins JG, Merrick M (2000) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Molecular Microbiology*. **37**:331-344

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL-W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680

Tillard P, Passama L, Gojon A (1998) Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO₃⁻ uptake in *Ricinus communis* plants? *Journal of Experimental Botany*. **49**: 1371-1379

Tobin AK, Yamaya T (2001) Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *Journal of Experimental Botany*. **52**: 591-604

Tong Y, Zhou JJ, LI Z, Miller AJ (2005) A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *The Plant Journal*. **41**: 441-450

Touraine B, Glass ADM (1997) NO_3^- and ClO_3^- fluxes in the *Chl1-5* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Does the *Chl1-5* gene encode a low-affinity NO_3^- transporter? *Plant Physiology*. **114**: 137-144

Touraine B, Müller B, Grignon C (1992) Effect of phloem-translocated malate on NO_3^- uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiology*. **99**: 1118-1123

Trueman LJ, Richardson A, Forde BG. (1996) Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*. **175**:223–231

Tsay YF, Schroeder JI, Feldman KA, Crawford NM (1993) The herbicide sensitive gene *Chl1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*. **72**: 705-713

Ullrich WR, Larsson M, Larsson CM, Lesch S, Novacky A (1984) Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiologia Plantarum*. **61**: 369-376

Ullrich WR, Novacky A (1981) Nitrate-Dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba*. *Plant Science Letters*. **22**: 211-217

Unkles SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P, Kinghorn JR. (1991) *cnrA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **88**: 204–208

Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjöerring JK, Touraine B, Glass ADM (2000) Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology*. **123**: 307-318

von Wirén N, Bergfeld A, Ninnemann O, Frommer WB (1997) OsAMT1.1: a high-affinity ammonium transporter from rice (*Oryza sativa* cv. Nipponbare). *Plant Molecular Biology*. **3**: 681

von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB (2000a) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion of Plant Biology*. **3**: 254-261

von Wirén N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB (2000b) Differential regulation of three functional ammonium transporter

genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *The Plant Journal*. **21**: 167-175

Wang MY, Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV (1994) Ammonium uptake by rice roots .3. Electrophysiology. *Plant Physiology*. **104**: 899-906

Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM (1993) Ammonium uptake by rice roots.2. Kinetics of NH_4^+ - ^{13}N - Influx across the plasmalemma. *Plant Physiology*. **103**: 1259-1267

Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *The Plant Cell*. **12**: 1491–1510

Wang R, Liu D, Crawford (1998) The *Arabidopsis* CHL protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **95**: 15134-15139

Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1000 rapidly responding genes new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*. **132**: 556–567

Wang X, Below FE (1992) Root growth, nitrogen uptake, and tillering of wheat induced by mixed-nitrogen source. *Crop Science*. **32**:997-1002

Wang Y-H, Garvin DF, Kochian LV (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in N nutrition. *Plant Physiology*. **127**: 345–359

Warner RL, Huffaker RC (1989) Nitrate transport is independent of NADH and NAD(P)H nitrate reductases in barley seedlings. *Plant Physiology*. **91**:947-953.

Williams LE, Miller AJ (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **52**: 659

Yokohama T, Kodama N, Aoshima H, Izu H, Matsushita K, Yamada M (2001) Cloning of a cDNA for a constitutive NRT1 transporter from soybean and comparison of gene expression of soybean NRT1 transporters. *BBA-Structure Gene and Expression*. **1518**:79-86

Yuan L, Loqué D, Ye F, Frommer WB, von Wirén (2007) Nitrogen-Dependent Posttranscriptional Regulation of the Ammonium Transporter *AtAMT1.1*. *Plant Physiology*. **143**:732-744

Zhang H, Forde BG (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*. **51**:51-59

Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*AtNrt2.1*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **17**: 563-568