e-ISSN: 2954-4440

ARTÍCULO

Current Topics in Agronomic Science

https://doi.org/10.5154/r.ctasci.2025.05.12

Versión en español

Impacto de la deficiencia de nitrógeno en la expresión y síntesis de clorofilas en tomate

Juan Pablo Ledesma-Valladolid[1]*; Mayra Isabel Niño-González[1]; Guadalupe Xóchitl Malda-Barrera[2]; Juan Ramiro Pacheco-Aguilar[1]; Gerardo Manuel Nava-Morales[1]*; Edmundo Mateo Mercado-Silva[1]*

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.
[2]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

Historial del artículo:
Recibido: Abril 21, 2025
Aceptado: Octubre 31, 2025
Publicado en línea:
Diciembre 22, 2025

***Autor para correspondencia:**
jpledesma95@gmail.com,
gerardomnava@gmail.com,
mercado501120@gmail.com

Resumen

La síntesis de clorofilas juega un papel importante en el mantenimiento de la eficiencia fotosintética, así como en la regulación del desarrollo vegetal y la resistencia a condiciones de estrés abiótico, como es la deficiencia de nitrógeno en el manejo de la nutrición. Se ha demostrado que la ruta de síntesis de clorofilas mantiene una dinámica de regulación mutua con la ruta de asimilación intracelular de nitrógeno. Dicha dinámica es regulada por la actividad de enzimas como la Uroporfirinógeno III metil transferasa (UPM1), la cual es clave en la resistencia a condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y en el mantenimiento del nivel óptimo de síntesis de clorofilas. El objetivo de este estudio fue identificar los genes de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1, su caracterización funcional, evaluación *in silico* de los niveles de expresión genética, y la cuantificación de clorofila total en tomate bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno. Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y su funcionalidad están conservadas en la planta de tomate. Asimismo, la deficiencia en el suministro de nitrógeno redujo el nivel de expresión genética de *SlHEMD* y *SlUPM1* (36 y 49 %, respectivamente), así como el contenido de clorofila total (20 %).

Palabras clave: Genómica comparativa, bio-informática, *Solanum lycopersicum*.

Introducción

La fotosíntesis es el mecanismo bioquímico más importante para los organismos biológicos. Se estima que entre el 90-95 % de la biomasa generada en las plantas proviene directamente de la fotosíntesis (Bag et al., 2020; Chen et al., 2023; Makino & Sage, 2007). La fotosíntesis se divide en dos principales etapas: las reacciones dependientes de la luz, y el Ciclo de Calvin-Benson (Shimizu et al., 2015). En las reacciones dependientes de la luz, la absorción de fotones provenientes de la energía solar desencadena un transporte de electrones a través de la membrana tilacoidal dentro de los cloroplastos. Dicho gradiente electrónico propiciará la síntesis de energía en forma de ATP y NADPH (Pietrzykowska et al., 2014). Posteriormente, dicha energía será utilizada por las reacciones del Ciclo de Calvin-Benson para la fijación de dióxido de carbono y síntesis de compuestos orgánicos (Smith et al., 2024).

El mantenimiento de la capacidad fotosintética es dependiente de la conformación de los fotosistemas I y II. Los fotosistemas están conformados por los centros de reacción y los complejos de captación de energía (LhcA/B, Light Harvesting Complex) (Croce & van Amerongen, 2013; Gao et al., 2018; Nelson & Yocum, 2006; van Amerongen & Croce, 2013). Los complejos de captación de energía están compuestos por una serie de proteínas denominadas “Chlorophyll a/b binding Protein” ó “proteínas de unión a las clorofilas”. Estas proteínas sirven como punto de unión con las clorofilas, que en conjunto llevan a cabo la absorción y transferencia de energía

Please cite this article as follows (APA 7): Ledesma-Valladolid, J. P., Niño-González, M. I., Malda-Barrera, G. X., Pacheco-Aguilar, J. R., Nava-Morales, G. M., & Mercado-Silva, E. M. (2025). Effects of nitrogen deficiency on chlorophyll expression and synthesis in tomato. *Current Topics in Agronomic Science, 5*. e2512. https://doi.org/10.5154/r.ctasci.2025.05.12

a los centros de reacción de los fotosistemas, y posteriormente desencadenarán el gradiente electrónico (Croce & van Amerongen, 2013; Gao et al., 2018; Nelson & Yocum, 2006; van Amerongen & Croce, 2013).

La ruta de síntesis de clorofilas es un componente esencial en la óptima conformación de los fotosistemas y en el mantenimiento de la capacidad fotosintética (Mao et al., 2025). Dicha ruta está coordinada por un conjunto de reacciones, las cuales se dividen en cuatro principales subetapas (Chatterjee et al., 2015). La primera etapa propicia la síntesis de ácido amino levulínico a partir de ácido glutámico como precursor. El segundo conjunto de reacciones estimula la síntesis de Uroporfirinógeno III usando el ácido 5-amino levulínico generado en la etapa anterior como precursor. La tercera etapa comprende la síntesis de Protoporfirina IX a partir de Uroporfirinógeno III como precursor. Por último, la cuarta etapa comprende la síntesis de clorofila *a*, a partir de Protoporfirina IX (Wu, et al., 2019b).

El nitrógeno es el macro elemento de mayor importancia en el manejo de la nutrición de los cultivos (Krapp, 2015). El nitrógeno es suministrado en la nutrición vegetal en sus formas de nitratos (NO^-_3) y amonio (NH^+_4) principalmente, y en menor proporción como aminoácidos y péptidos de cadena corta (Zayed et al., 2023). Una vez ingresados al sistema radicular, estos compuestos (NO^-_3 y NH^+_4) son transportados al sistema foliar a través del sistema vascular. En el sistema foliar son metabolizados a través de la ruta de asimilación intracelular de nitrógeno, donde intervienen enzimas como la nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR), glutamato sintasa (GOGAT), y glutamina sintetasa (GS) (Gilad, et al., 2025). Factores como la tasa de suministro y la proporción NO^-_3/NH^+_4 en la nutrición vegetal, así como la actividad de las enzimas de asimilación intracelular regulan la capacidad de síntesis de ácido glutámico, afectando la capacidad de síntesis de clorofilas, así como la capacidad fotosintética de los cultivos (Roosta et al., 2025; Guo et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado la reducción en el nivel del contenido de clorofilas, así como la reducción de la capacidad fotosintética en modelos sometidos a condiciones de deficiencia de nitrógeno (Cetner et al., 2017; Ferreira et al., 2016; Lu et al., 2021). Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno se ha observado la reducción en el nivel de expresión de genes asociados a enzimas de la ruta de síntesis de clorofilas como *HEMA1*, *HEMA2*, *HEMB1*, *HEMC*, *HEMD* y *HEMF*. Estos resultados se asociaron con la reducción en el nivel de ácido 5-amino levulínico y clorofila total, así como en la disminución en el nivel de expresión de genes asociados a enzimas de la ruta de asimilación intracelular de nitrógeno como *NR*, *NiR*, *GOGAT* y *GS* (Wen et al., 2019a).

Se ha demostrado que la dinámica en la interacción entre las rutas de síntesis de clorofilas y de asimilación intracelular de nitrógeno podría ser regulada por la actividad de la Uroporfirinógeno III metil transferasa (UPM1) (Garai et al., 2016). UPM1 juega un papel de vital importancia en la síntesis del grupo prostético Sirohemo. Sirohemo forma parte de la estructura del nitrito reductasa como grupo prostético. Este grupo es sintetizado en los cloroplastos a partir de Uroporfirinógeno III como precursor (Tanaka, et al., 2011). UPM1 parece jugar un papel de vital importancia en el metabolismo del nitrógeno a través de la conformación de nitrito reductasa, lo cual contribuye a la regulación del nivel de ácido glutámico en los cloroplastos. Esta dinámica metabólica contribuye a la regulación de la síntesis de clorofilas, así como la capacidad fotosintética de los cultivos (Garai & Tripathy, 2018).

La elucidación del impacto de un bajo nivel en el suministro de nitrógeno sobre los niveles de expresión de enzimas de la ruta de síntesis de clorofilas y de UPM1 es de vital importancia para comprender las respuestas de los cultivos a condiciones de estrés nutricional. El objetivo de este estudio fue llevar a cabo la identificación de los genes de la ruta de síntesis de clorofilas y de UPM1, su caracterización funcional, su evaluación *in silico* de los niveles de expresión genética, y la capacidad de síntesis de clorofilas en tomate bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Materiales y Métodos

Identificación y caracterización de los genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1

Para identificar las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos (CDS; secuencia codificante, y secuencia genómica) de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1 en tomate, primero se llevó a cabo la identificación de estas en *Arabidopsis thaliana*, la cual se tomó como modelo de referencia. Dichas secuencias fueron recuperadas de la base de datos TAIR (https://www.arabidopsis.org). Posteriormente, se llevó a cabo un análisis genómico comparativo a través de la herramienta BLASTP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) contra la colección completa de proteínas (CDS translatio ns+PDB+SwissProt+PIR+PRF) archivadas en el GenBank (834,777,505 secuencias; hasta noviembre del 2024). La búsqueda y comparación se limitó a *Solanum lycopersicum* (taxid:4081). Para el análisis se utilizaron los siguientes parámetros: % de Identidad (≥ 80 %), % de cobertura (≥ 90 %) y E-value ($1e^{-10}$). Los números de acceso con los mejores resultados se utilizaron para recopilar las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos (CDS; secuencia codificante, y secuencia genómica) en tomate depositadas en el GenBank. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Con las secuencias obtenidas se estimaron las características: peso molecular de proteína (PM-P), punto isoeléctrico (PI), longitud de la secuencia de Aminoácidos (LS-AA) y localización subcelular de las proteínas a través de las plataformas Expasy tool (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam), WoLF PSORT (https://www.genscript.com/

wolf-psort.html) y Cell-PLoc 2.0 (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/). Las secuencias de nucleótidos se utilizaron para estimar número de exones e intrones y la localización cromosomal de los genes identificados de *A. thaliana* y tomate (Lan et al., 2022).

Análisis de alineamiento múltiple y análisis filogenético de secuencias de aminoácidos

Para identificar la homología intraespecífica e interespecífica, así como para entender las relaciones evolutivas entre las secuencias proteicas identificadas en *A. thaliana* y tomate, se realizó un análisis de alineamiento múltiple. Para lo cual, se utilizó el método ClustalW, usando los parámetros predeterminados con el software Mega XI. Posteriormente, el árbol filogenético se construyó con el método Neighbor-Joining tree, ajustado al modelo Jones-Taylor Thornton con 1 000 réplicas bootstrap. Finalmente, la herramienta iTOL (https://itol.embl.de/) se utilizó para generar un esquema de alta calidad (Lan et al., 2022).

Análisis estructural de genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1

Con el objetivo de corroborar la funcionalidad de las secuencias proteicas y genómicas identificadas en tomate, se llevó a cabo un análisis estructural de las mismas. Se analizaron e identificaron los exones e intrones de las secuencias genómicas a través de la plataforma "Structure Display Server" (GSDS) (https://gsds.gao-lab.org/). Además, se identificaron los motivos proteicos conservados a través de las plataformas MEME (https://meme-suite.org/meme/tools/meme) e InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/). Los diagramas se generaron con la plataforma TBtools (v2.096, https://github.com/CJ-Chen/TBtools-II) (Lan et al., 2022).

Análisis *in silico* de expresión de genes de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1 en tomate bajo condiciones de bajo nitrógeno

Para determinar el efecto de condiciones de bajo nitrógeno sobre los niveles de expresión *in silico* de los genes identificados en tomate, se analizaron datos Illumina RNA-seq obtenidos de la base de datos NCBI-GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds). Los datos obtenidos corresponden a dos diferentes tratamientos; Tratamiento control (CT) y bajo nitrógeno (TBN). Se usaron los números de acceso de cada gen para identificar el efecto de cada tratamiento sobre sus niveles de expresión. Los resultados se reportaron como FPKM (Fragments per kilobase of exon per million).

Material vegetal y tratamientos

El presente estudio fue llevado a cabo en invernaderos comerciales bajo un sistema de producción en hidroponía utilizando como sustrato fibra de coco. Los invernaderos tuvieron las siguientes características estructurales; tipo gótico, con piso y cubierta de polietileno, orientación norte-sur y sistemas de ventilación pasiva con ventanas frontales. Después de 16 días de germinación, las plántulas fueron injertadas con injertos "Maxifort" y trasplantadas al sustrato en los sistemas de producción en hidroponía. Las plantas fueron sometidas a dos diferentes tratamientos; tratamiento control (CT) y tratamiento de bajo nitrógeno (TBN). Para el tratamiento control se utilizó un sistema de irrigación por goteo con solución Hoagland con la siguiente composición; NO^-_3 (17.54 mmol), NH^+_4 (1.91 mmol), H_2PO_4 (3.79 mmol), SO^-_4 (4.2 mmol), K^+ (9.65 mmol), Ca^+_2 (8.41 mmol), Mg^+_2 (2.3 mmol), B^+_3 (148.01 mmol), Cl^- (10.2 mmol), Cu^+_2 (1.58 mmol), Fe^-_2 (55.34 mmol), Mn^+_4 (13.29 mmol) y Zn^+ (12.54 mmol). Para TBN también se utilizó un sistema de irrigación por goteo con solución Hoagland con la siguiente composición; NO^-_3 (12.3 mmol), NH^+_4 (0.96 mmol), H_2PO_4 (1.34 mmol), SO^-_4 (3.2 mmol), K^+ (7.57 mmol), Ca^+_2 (3.87 mmol), Mg^+_2 (1.69 mmol), B^+_3 (83.26 mmol), Cl^- (4.6 mmol), Cu^+_2 (1.1 mmol), Fe^-_2 (43.34 mmol), Mn^+_4 (9.1 mmol) y Zn^+ (8.41 mmol). La conductividad eléctrica y el pH de la solución Hoagland del CT fue de 4.35 $mS \cdot cm^{-1}$ y 5.62, respectivamente, mientras que para TBN la conductividad eléctrica y el pH fueron de 2.54 $mS \cdot cm^{-1}$ y 5.15, respectivamente. El ciclo de producción del cultivo se situó entre las semanas de desarrollo después del trasplante 10 y 50. Durante este periodo se seleccionó aleatoriamente un total de 15 plantas por tratamiento para realizar el muestreo.

Recolección de muestras

Las muestras de hoja (n=15) fueron recolectadas de forma aleatoria dentro del área total del invernadero. Se colectó la octava hoja compuesta. Se consideró a la hoja en el extremo superior como la primera hoja. Las muestras se pusieron en bolsas estériles y se colocaron en frío a 4 °C, posteriormente, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -81 °C.

Contenido de clorofila total

El contenido de clorofila total fue estimado siguiendo la metodología reportada por Wu et al., (2019); Xi et al., (2021) y Zhong et al., (2017). Se pesaron 200 mg de tejido fresco de hoja y se añadieron 25 mL de solución de extracción alcohol:acetona utilizando una proporción 1:1 (v/v). La mezcla se homogenizó a 10 000 rpm por 1 minuto utilizando un Ultra-Turrax (IKA, T-25D). Posteriormente se centrífugo la mezcla a 10 000 rpm por 2 minutos a una temperatura de 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 663 y 645 nm. El contenido de clorofila total se expresó como $mg*g^{-1}$ PF. Se utilizó la siguiente fórmula para su cálculo:

Contenido de clorofila Total ($mg*g^{-1}$ PF) =
(20.2)(ABS 645 nm) - (8.02)(ABS 663 nm)

Resultados y Discusión

Identificación y caracterización fisicoquímica de genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1

En este estudio, se identificaron veintiséis genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas en *A. thaliana*. Además, se identificó un solo gen responsable de la expresión de UPM1. Se identificaron 19 genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas en tomate a través del análisis genómico comparativo, con la herramienta BLASTP y utilizando *A. thaliana* como modelo de referencia, además se encontró un gen responsable de la expresión de UPM1. Las características físico químicas de los genes y proteínas identificados como la longitud de la secuencia CDS (LS-CDS), número de exones (NE), localización cromosomal, longitud de la secuencia de aminoácidos (LS-AA), peso molecular de las proteínas (kDa) (PM-P), puntos isoeléctricos de las proteínas (PI) y la localización subcelular de las proteínas identificadas se describen sistemáticamente en el Cuadro 1. Para los genes de la ruta de síntesis de clorofilas en *A. thaliana*, la LS-CDS fue de 938 pb (*AtHEMD*) a 2 282 pb (*AtCHLD*). En el caso de los genes identificados en tomate, la LS-CDS fue de 908 pb (*SlHEMD*) a 2 300 pb (*SlCHLD*). Respecto a la localización cromosomal, los genes identificados en *A. thaliana*, el cromosoma 1 obtuvo la mayor densidad de genes (DG) localizados en su estructura con ocho de ellos. El cromosoma 2 mostró la menor DG, con tres de ellos localizados en su estructura. Respecto a tomate, los cromosomas 4 y 10 mostraron la mayor DG en sus estructuras obteniendo diez de ellos. Las secuencias proteicas identificadas en *A. thaliana* mostraron una longitud, PM-P y PI de 312 aa (*AtCHLM*) – 1 381 aa (*AtCHLH*), de 33 796 kDa (*AtCHLM*) – 153 574 kDa (*AtCHLH*) y 5.26 (*AtCHLD*) - 9.49 (*AtNOL*). Mientras que para tomate las secuencias proteicas identificadas mostraron para estas mismas variables: LS-AA de 302 aa (*SlHEMD*) a 1 381 aa (*SlCHLH*), PM-P de 32 359 kDa (*SlHEMD*) a 153 688 kDa (*SlCHLH*) y PI de 5.28 (*SlCHLD*) a 9.42 (*SlPORB*). La predicción de la localización subcelular de las proteínas identificadas en ambos modelos biológicos mostró que se encuentran localizadas en los cloroplastos, así como en estructuras que lo componen como las membranas del tilacoide y él estroma (Cuadro 1).

Análisis de alineamiento múltiple y análisis filogenético de secuencias de aminoácidos

Se evaluaron las relaciones evolutivas intra e interespecíficas de las proteínas identificadas en *A. thaliana* y tomate. El análisis filogenético mostró una estrecha relación entre las proteínas identificadas en ambas especies (Figura 1). Este análisis mostró el agrupamiento de las proteínas homólogas de tomate y *A. thaliana* en un mismo clado. Asimismo, el UPM1 de ambos modelos

Table 1. Identification of genes and proteins of the chlorophyll synthesis pathway and their physicochemical characteristics.

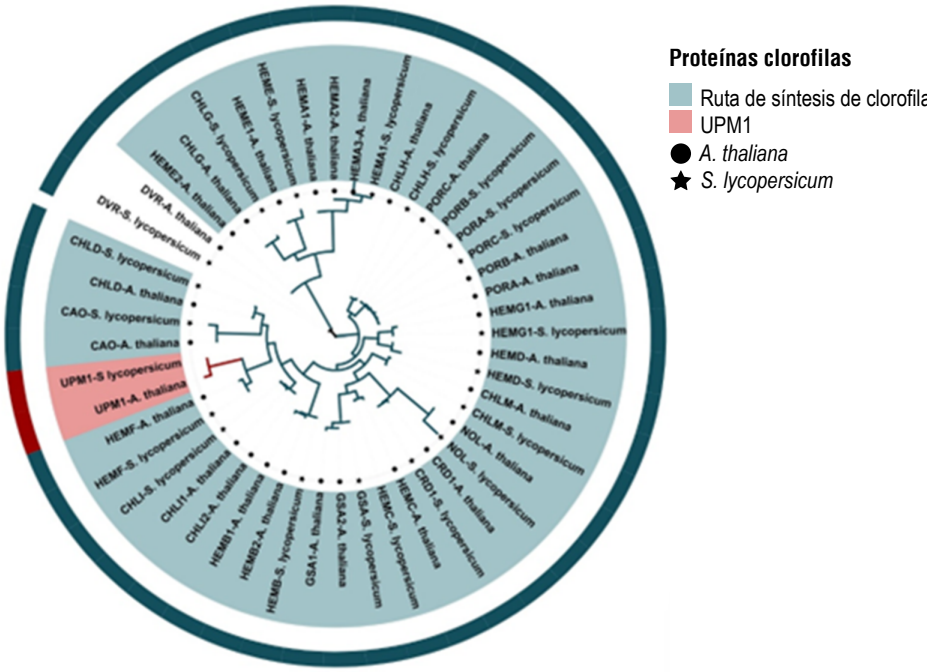
Especie	Nombre del gen	Proteína GenBank ID	Gen GenBank ID	Longitud de proteína (aa)	Peso molecular de proteína (kDa)	Punto isoeléctrico	Longitud CDS (pb)	Número de exones	Localización cromosomal	Localización subcelular	
										Cell-PLoc 2.0	WoLF PSORT
A. thaliana	*AtHEMA1*	NP_176125.1	NM_104609.4	543	59,515	7.95	1,631	3	1	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtHEMA2*	NP_172465.1	NM_100868.3	530	58,292	8.82	1,592	3	1	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtHEMA3*	NP_180683.1	NM_128681.3	524	58,691	8.78	1,574	3	2	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtGSA1*	NP_201162.1	NM_125752.4	474	50,370	6.42	1,424	3	5	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtGSA2*	NP_190442.1	NM_114732.5	472	50,142	7.01	1,418	4	3	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtHEMB1*	NP_177132.1	NM_105642.4	430	46,690	6.96	1,292	13	1	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtHEMB2*	NP_175085.1	NM_103545.2	406	44,878	8.39	1,221	10	1	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtHEMC*	NP_196445.1	NM_120911.4	382	41,043	8.75	1,148	5	5	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtHEMD*	NP_565625.1	NM_128211.4	321	34,225	7.81	965	9	2	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtHEME1*	NP_850587.1	NM_180256.2	418	46,254	6.64	1,256	6	3	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtHEME2*	NP_181581.1	NM_129611.5	394	43,580	8.29	1,184	6	2	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtHEMF*	NP_171847.4	NM_100230.7	386	43,796	6.24	1,160	8	1	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtHEMG1*	NP_192078.1	NM_116399.4	537	57,695	9.13	1,613	9	4	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtCHLH*	NP_196867.1	NM_121366.4	1381	153,574	5.8	4,145	5	5	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtCHLD*	NP_563821.2	NM_100725.4	760	83,284	5.26	2,282	15	1	Cloroplasto	Estroma
A. thaliana	*AtCHLI1*	NP_193583.1	NM_117962.3	424	46,270	6.08	1,274	3	4	Cloroplasto	Estroma
A. thaliana	*AtCHLI2*	NP_199405.2	NM_123961.4	418	46,098	5.36	1,256	3	5	Cloroplasto	Estroma

Table 1. Identification of genes and proteins of the chlorophyll synthesis pathway and their physicochemical characteristics. (*cont.*)

Especie	Nombre del gen	Proteína GenBank ID	Gen GenBank ID	Longitud de proteína (aa)	Peso molecular de proteína (kDa)	Punto isoeléctrico	Longitud CDS (pb)	Número de exones	Localización cromosomal	Localización subcelular	
										Cell-PLoc 2.0	WoLF PSORT
A. thaliana	*AtCHLM*	NP_194238.1	NM_118640.3	312	33,796	7.68	938	3	4	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtCRD1*	NP_191253.1	NM_115553.4	409	47,631	8.55	1,229	5	3	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
A. thaliana	*AtDVR*	NP_197367.1	NM_121871.3	417	45,893	7.47	1,253	1	5	Cloroplasto	Membrana tilacoidal / Estroma
A. thaliana	*AtPORA*	NP_200230.1	NM_124799.4	405	43,863	9.42	1,217	4	5	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtPORB*	NP_194474.1	NM_118879.4	401	43,359	9.23	1,205	5	4	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtPORC*	NP_171860.1	NM_100243.4	401	43,883	9.18	1,205	5	1	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtCAO*	NP_175088.1	NM_103548.5	536	60,331	7.96	1,610	8	1	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtNOL*	NP_568145.1	NM_120572.3	348	38,149	9.49	1,046	13	5	Cloroplasto	Cloroplasto
A. thaliana	*AtCHLG*	NP_190750.1	NM_115041.4	387	41,881	8.52	1,163	14	3	Cloroplasto	Estroma
S. lycopersicum	*SlHEMA1*	XP_004238036.1	XM_004237988.4	544	59,342	8.37	1,634	3	4	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlGSA*	NP_001234690.2	NM_001247761.2	482	51,500	6.53	1,448	3	4	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlHEMB*	XP_004245301.1	XM_004245253.4	430	46,836	6.36	1,292	14	8	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlHEMD*	XP_010320354.1	XM_010322053.4	302	32,359	8.19	908	10	4	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlHEME*	XP_010327114.1	XM_010328812.4	420	45,984	6.47	1,262	6	10	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlHEMF*	XP_004248412.2	XM_004248364.5	399	44,717	5.8	1,199	8	10	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlHEMG1*	NP_001335308.1	NM_001348379.1	558	60,446	8.98	1,676	8	1	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCHLH*	XP_004236610.1	XM_004236562.5	1381	153,688	5.93	4,145	5	4	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCHLD*	XP_004236627.1	XM_004236579.5	766	83,918	5.28	2,300	15	4	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCHLI*	XP_004248139.1	XM_004248091.5	427	46,434	6.07	1,283	3	10	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCHLM*	XP_004235845.2	XM_004235797.5	327	35,532	6.96	983	2	3	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCRD1*	NP_001332768.1	NM_001345839.1	404	47,185	8.99	1,214	5	10	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlDVR*	XP_010321210.1	XM_010322908.4	420	46,086	6.41	1,262	2	1	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlPORA*	XP_004251852.1	XM_004251804.5	397	42,812	9.19	1,193	5	12	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlPORB*	NP_001304903.1	NM_001317974.1	395	42,611	9.42	1,187	5	10	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlPORC*	NP_001296970.1	NM_001310041.1	399	43,199	9.27	1,199	5	7	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCAO*	XP_004250311.1	XM_004250263.5	535	60,237	7.54	1,607	9	11	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlNOL*	XP_010321272.1	XM_010322970.4	346	37,925	9.22	1,040	13	5	Cloroplasto	Cloroplasto
S. lycopersicum	*SlCHLG*	XP_004246318.1	XM_004246270.4	369	40,038	8.26	1,109	15	9	Cloroplasto	Cloroplasto

* pb; pares de bases, kDa; kilo daltons, aa; amino ácidos

biológicos se agrupó satisfactoriamente en un solo clado. Las secuencias identificadas en tomate mostraron una alta homología con respecto a las proteínas identificadas en *A. thaliana*. El análisis de alineamiento múltiple mostró en promedio alrededor de 78 % de homología entre las proteínas de ambos modelos biológicos. La menor homología la obtuvo HEMD con 63.97 % mientras que, la mayor homología fue para CHLH con 86.19 % de ambos modelos. La alta homología que se obtuvo entre ambos modelos biológicos demostró la generación de genes ortólogos con funcionalidad conservada, los cuáles se derivan de eventos de especiación a lo largo de la historia evolutiva de tomate y *A. thaliana* (Liu et al., 2023; Mao et al., 2022; Xi et al., 2022; Xia et al., 2023). En el caso particular de *A. thaliana*, el análisis de alineamiento múltiple permitió la identificación de dos o tres isoformas para HEMA, GSA, HEMB, HEME y CHLI. Para HEMA (HEMA1, HEME2 y HEMA3) como se observa en el Cuadro 1 y la Figura 1. El análisis de alineamiento muestra una alta homología entre las tres isoformas identificadas (68-81 %). Los grupos de isoformas para GSA (GSA1 y GSA2), HEMB (HEMB1 y HEMB2), HEME (HEME1 y HEME2) y CHLI (CHLI1 y CHLI2) obtuvieron una homología de 90, 65, 51 y 83 % respectivamente. Mientras que, la familia de proteínas POR (PORA, PORB y PORC) obtuvo una alta homología entre sí (77-87 %). Lo anterior sugiere que han existido eventos de duplicación genética a lo largo de la historia evolutiva de *A. thaliana*, dando lugar a la generación de



* El árbol filogenético fue generado usando el método neighbor joining tree (1000 réplicas bootstrap), y ajustado al modelo Jones-Taylor Thorton.

Figura 1. Análisis filogenético de secuencias de aminoácidos identificadas en tomate y *Arabidopsis thaliana*.

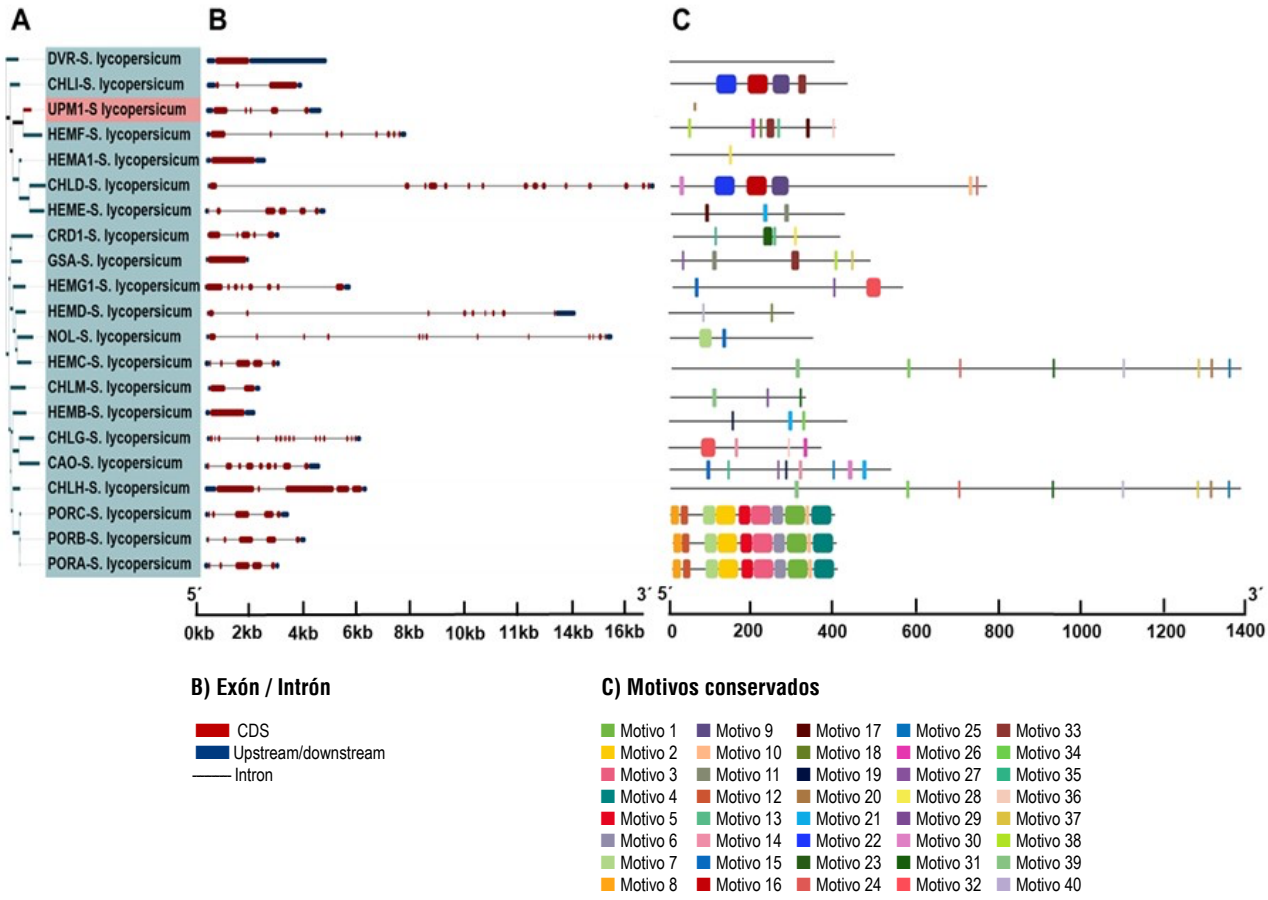
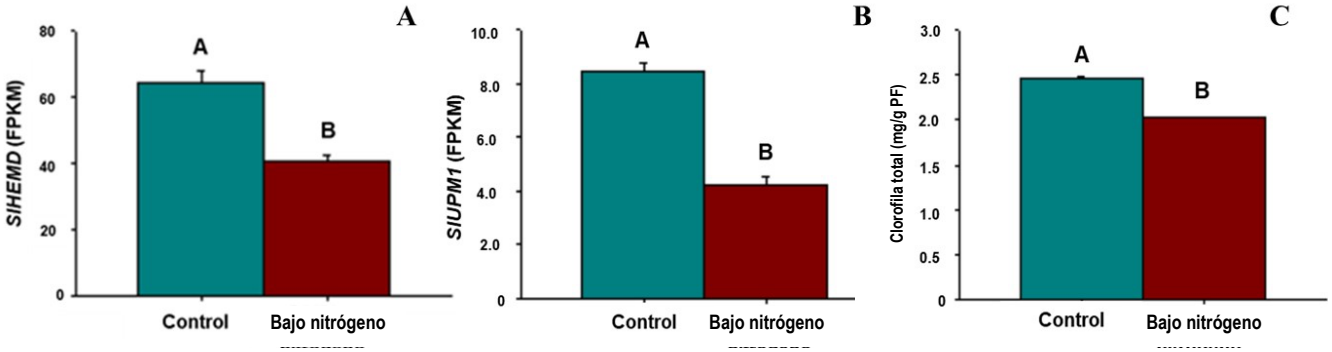


Figura 2. Análisis filogenético generado por el método "Neighbor-joining tree" de secuencias identificadas en tomate. (B) El análisis genómico estructural de las secuencias CDS y UTR representadas por cajas rojas y azules, respectivamente, intrones (representados por líneas negras continuas). (C) Análisis de motivos proteicos conservados de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1 en tomate.



* Los datos de expresión genómica se obtuvieron de la base de datos NCBI-GEO y expresados como FPKM (Fragmentos por kilobase de transcripción por millón de lecturas mapeadas).

** Los datos se refieren a la media ± error estándar (n=15). Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey. Los tratamientos "Control" y "Bajo nitrógeno" se representan por barras verdes y rojas, respectivamente. Las gráficas se realizaron con el uso del software SigmaPlot 11.

Figura 3. (A y B) Comparación de los niveles de expresión de *SlHEMD* y *SlUPM1*. (c) Comparación de la síntesis de clorofila total en hoja.

genes parálogos con funcionalidad conservada (Liu et al., 2023; Mao et al., 2022; Xi et al., 2022; Xia et al., 2023). Por último, las secuencias de aminoácidos de UPM1 también obtuvieron una alta homología (75 %).

Análisis estructural de genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y UPM1

Se analizaron las características estructurales de los genes y proteínas identificados en tomate. El análisis estructural de exones (CDS)/Intrones mostró una gran divergencia entre los genes identificados (Cuadro 1 y Figura 2B). Con los resultados obtenidos en el presente estudio se obtuvieron de 2 exones (*SlDVR* y *SlCHLM*) a 15 exones (*SlCHLD* y *SlCHLG*). Estos resultados sugieren que existieron eventos de inserción y pérdida de intrones a lo largo de la historia evolutiva del tomate. Estos cambios estructurales también se pueden asociar a cambios en la funcionalidad de la proteína derivada de los genes identificados (Liu et al., 2023). En el análisis estructural de las proteínas identificadas y la estructura de las secuencias genómicas, se obtuvo una gran divergencia estructural; ya que en esta investigación se obtuvieron hasta 40 motivos proteicos conservados en la secuencia de aminoácidos. Por otro lado, la secuencia de la proteína UPM1 solo mostró un motivo conservado en su estructura (Figura 2C). El gran número de motivos conservados se puede asociar a la gran variabilidad, al igual, se observó en el número de intrones y exones de las secuencias genómicas (Figura 2 B).

Niveles de expresión *in silico* de *SlHEMD*, *SlUPM1* y contenido de clorofila total

Se analizó el nivel de expresión *in silico* de los genes *SlHEMD* y *SlUPM1* bajo condiciones de TBN y CT. Los resultados obtenidos mostraron una reducción de 36 % aproximadamente en los niveles de transcritos de *SlHEMD* en condiciones del TBN (Figura 3A). Respecto a *SlUPM1*, los resultados también mostraron una reducción en los niveles de transcritos de ≈49 % para el TBN (Figura 3B). El contenido de clorofila total (CCT) bajo condiciones del TBN se observó una reducción del 20 % (Figura 3C). El UPM1 es un componente esencial en el óptimo funcionamiento de la ruta de asimilación intracelular de nitrógeno (Garai & Tripathy, 2018).También promueve la síntesis del grupo prostético Sirohemo, el cual forma parte de la estructura de nitrito reductasa (Garai & Tripathy, 2018). Lo anterior, sugiere que la reducción en los niveles de los transcritos de *SlUPM1* promueve una menor eficiencia en el metabolismo intracelular de nitrógeno; y una menor tasa metabólica del nitrógeno intracelular se asocia a una menor capacidad en la síntesis de metabolitos intermediarios como el ácido glutámico, el cual, al ser el principal precursor de la síntesis de clorofilas propicia la caída en el nivel de transcritos de *SlHEMD*, así como de la propia síntesis de clorofila total. Diversas investigaciones han evidenciado el impacto en condiciones de deficiencia de nitrógeno sobre el nivel de expresión de las enzimas de la ruta de síntesis de clorofilas. Choi et al., (2016); Wen et al., (2019) y Yoneda et al., (2016) observaron una reducción en el nivel de expresión de *MdHEMA1, MdHEMA2, MdHEMB1, MdHEMD, SechlL* y *SechlN*. Estos resultados se asociaron con la caída en la síntesis de metabolitos intermediarios de la ruta de síntesis de clorofilas como ácido 5-amino levulínico y Uroporfirinógeno III. Wen et al., (2019) obtuvieron una reducción en los niveles de *MdNiR*. Por último, la sobre expresión de *AtUPM1* se asoció con el incremento en el nivel de expresión de *AtNII* y *AtNIA2* (291 y 280 %, respectivamente). Estos resultados se asociaron con el incremento en el nivel de expresión de *AtUROD, AtCHLH, AtPORC*, así como del contenido de clorofila total de 50, 97, 79 y 25 %, respectivamente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y su funcionalidad están conservadas en la planta de tomate. Asimismo, se

evidencia un severo impacto en condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, provocando la reducción de la expresión de *SlHEMD* y *SlUPM1* y la capacidad de síntesis de clorofilas. Se demuestra el importante papel de UPM1 bajo dichas condiciones en la regulación de la síntesis de clorofilas.

Referencias

Bag, P., Chukhutsina, V., Zhang, Z., Paul, S., Ivanov, A. G., Shutova, T., Croce, R., Holzwarth, A. R., & Jansson, S. (2020). Direct energy transfer from photosystem II to photosystem I confers winter sustainability in Scots Pine. *Nature Communications*, *11*(1), 6388. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20137-9

Cetner, M. D., Kalaji, H. M., Goltsev, V., Aleksandrov, V., Kowalczyk, K., Borucki, W., & Jajoo, A. (2017). Effects of nitrogen-deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. *Plant Physiology and Biochemistry*, *119*, 81-92. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.016

Chatterjee, A., & Kundu, S. (2015). Revisiting the chlorophyll biosynthesis pathway using genome scale metabolic model of Oryza sativa japonica. *Scientific Reports*, *5*(1), 14975. https://doi.org/10.1038/srep14975

Chen, L., Yang, W., Liu, S., Meng, Y., Zhu, Z., Liang, R., Cao, K., Xie, Y., & Li, X. (2023). Genome-wide analysis and identification of light-harvesting chlorophyll *a*/b binding (LHC) gene family and BSMV-VIGS silencing *TaLHC86* reduced salt tolerance in wheat. *International Journal of Biological Macromolecules*, *242*, 124930. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124930

Choi, S. Y., Park, B., Choi, I.-G., Sim, S. J., Lee, S.-M., Um, Y., & Woo, H. M. (2016). Transcriptome landscape of Synechococcus elongatus PCC 7942 for nitrogen starvation responses using RNA-seq. *Scientific Reports*, *6*(1), 30584. https://doi.org/10.1038/srep30584

Croce, R., & van Amerongen, H. (2013). Light-harvesting in photosystem I. *Photosynthesis Research*, *116*(2-3), 153-166. https://doi.org/10.1007/s11120-013-9838-x

Ferreira, V. S., Pinto, R. F., & Sant'Anna, C. (2016). Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(3), 661-670. https://doi.org/10.1111/jam.13007

Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., & Feng, Y. (2018). Structure and Function of the Photosystem Supercomplexes. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 357. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00357

Garai, S., & Tripathy, B. C. (2018). Alleviation of Nitrogen and Sulfur Deficiency and Enhancement of Photosynthesis in Arabidopsis thaliana by Overexpression of Uroporphyrinogen III Methyltransferase (UPM1). *Frontiers in Plant Science*, *8*, 2265. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02265

Garai S., Joshi N. C., & Tripathy B.C. (2016). Phylogenetic analysis and photoregulation of siroheme biosynthesis genes: uroporphyrinogen III methyltransferase and sirohydrochlorin ferrochelatase of Arabidopsis thaliana. *Physiol Mol Biol Plants* 22(3):351-359. https://doi.org/10.1007/s12298-016-0363-1

Gilad G., Sapir O., Hipsch M., Waiger D., Ben-Ari J., Zeev BB, Zait Y., Lampl N., & Rosenwasser S. (2025). Nitrogen Assimilation Plays a Role in Balancing the Chloroplastic Glutathione Redox Potential Under High Light Conditions. *Plant Cell Environ*. 48(5):3559-3572. https://doi.org/10.1111/pce.15368

Guo S., Zhou Y., Shen Q., & Zhang F. (2007). Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants - growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. *Plant Biol* 9(1):21-9. https://doi.org/10.1055/s-2006-924541

Krapp A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. Curr Opin *Plant Biol*. 25:115-22. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.010

Lan, Y., Song, Y., Zhao, F., Cao, Y., Luo, D., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. (2022). Phylogenetic, Structural and Functional Evolution of the LHC Gene Family in Plant Species. International Journal of Molecular Sciences, 24(1), 488. https://doi.org/10.3390/ijms24010488

Liu, J., Wang, C., Peng, J., Ju, J., Li, Y., Li, C., & Su, J. (2023). Genome-wide investigation and expression profiles of the NPF gene family provide insight into the abiotic stress resistance of Gossypium hirsutum. Frontiers in Plant Science, 14, 1103340. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1103340

Lu, L., Zhang, Y., Li, L., Yi, N., Liu, Y., Qaseem, M. F., Li, H., & Wu, A. M. (2021). Physiological and Transcriptomic Responses to Nitrogen Deficiency in Neolamarckia cadamba. Frontiers in Plant Science, 12, 747121. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.747121

Makino, A., & Sage, R. F. (2007). Temperature Response of Photosynthesis in Transgenic Rice Transformed with 'Sense' or 'Antisense' rbcS. Plant and Cell Physiology, 48(10), 1472-1483. https://doi.org/10.1093/pcp/pcm118

Mao, P., Run, Y., Wang, H., Han, C., Zhang, L., Zhan, K., Xu, H., & Cheng, X. (2022). Genome-Wide Identification and Functional Characterization of the Chloride Channel TaCLC Gene Family in Wheat (Triticum aestivum L.). Frontiers in Genetics, 13, 846795. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.846795

Mao H. T., Pang X, Li T., Qin Y., Zhang Z. W., Yuan S., Yuan M., Brestic M., & Chen Y. E. (2025). Chlorophyll b is essential for the growth, photoprotection, and photosystem I assembly in wheat. Plant J.;123(4):e70442. https://doi.org/10.1111/tpj.70442

Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems i and ii. Annual Review of Plant Biology, 57(1), 521-565. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350

Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D. A., Tikkanen, M., Boekema, E. J., Aro, E.-M., & Jansson, S. (2014). The Light-Harvesting Chlorophyll a/b Binding Proteins Lhcb1 and Lhcb2 Play Complementary Roles during State Transitions in Arabidopsis. The Plant Cell, 26(9), 3646-3660. https://doi.org/10.1105/tpc.114.127373

Roosta, H. R., Estaji, A., Khadivi, A., & Shams M. (2025). Balanced ammonium–nitrate nutrition enhances photosynthetic efficiency, micronutrient homeostasis, and antioxidant networks via ROS signaling in Glycyrrhiza glabra across soil and soilless systems. Sci Rep 15, 25404 . https://doi.org/10.1038/s41598-025-11181-w

Shimizu, R., Dempo, Y., Nakayama, Y., Nakamura, S., Bamba, T., Fukusaki, E., & Fukui, T. (2015). New Insight into the Role of the Calvin Cycle: Reutilization of CO2 Emitted through Sugar Degradation. Scientific Reports, 5(1), 11617. https://doi.org/10.1038/srep11617

Slattery, R. A., VanLoocke, A., Bernacchi, C. J., Zhu, X.-G., & Ort, D. R. (2017). Photosynthesis, Light Use Efficiency, and Yield of Reduced-Chlorophyll Soybean Mutants in Field Conditions. Frontiers in Plant Science, 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00549

Smith, K., Strand, D. D. & Walker, B. J. (2024) Evaluating the contribution of plant metabolic pathways in the light to the ATP: NADPH demand using a meta-analysis of isotopically non-stationary metabolic flux analyses. Photosynth Res 161, 177–189. https://doi.org/10.1007/s11120-024-01106-5

Tanaka R., Kobayashi K., & Masuda T. (2011). Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Book* (9). https://doi.org/10.1199/tab.0145

van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). Light harvesting in photosystem II. Photosynthesis Research, 116(2-3), 251-263. https://doi.org/10.1007/s11120-013-9824-3

Wen, B., Li, C., Fu, X., Li, D., Li, L., Chen, X., Wu, H., Cui, X., Zhang, X., Shen, H., Zhang, W., Xiao, W., & Gao, D. (2019a). Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll synthesis of detached apple leaves. Plant Physiology and Biochemistry, 142, 363-371. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.007

Wu, Y., Li, Q., Jin, R., Chen, W., Liu, X., Kong, F., Ke, Y., Shi, H., & Yuan, J. (2019). Effect of low-nitrogen stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of maize cultivars with different low-nitrogen tolerances. Journal of Integrative Agriculture, 18(6), 1246-1256. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62030-1

Wu, Y., Liao, W., Dawuda, M.M., Hu, l., & Yu, J. (2019). 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. Plant Growth Regul 87, 357–374 (2019). https://doi.org/10.1007/s10725-018-0463-8

Xi, Y., Hu, W., Zhou, Y., Liu, X., & Qian, Y. (2022). Genome-Wide Identification and Functional Analysis of Polyamine Oxidase Genes in Maize Reveal Essential Roles in Abiotic Stress Tolerance. Frontiers in Plant Science, 13, 950064. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.950064

Xi, Y., Yin, L., Chi, Z. & Luo, G. (2021). Characterization and RNA-seq transcriptomic analysis of a Scenedesmus obliqnus mutant with enhanced photosynthesis efficiency and lipid productivity. Scientific Reports, 11(1), 11795. https://doi.org/10.1038/s41598-021-88954-6

Xia, J., Wang, Y., Zhang, T., Pan, C., Ji, Y., Zhou, Y., & Jiang, X. (2023). Genome-wide identification, expression profiling, and functional analysis of ammonium transporter 2 (AMT2) gene family in cassava (Manihot esculenta crantz). Frontiers in Genetics, 14, 1145735. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1145735

Yoneda, A., Wittmann, B. J., King, J. D., Blankenship, R. E., & Dantas, G. (2016). Transcriptomic analysis illuminates genes involved in chlorophyll synthesis after nitrogen starvation in Acaryochloris sp. CCMEE 5410. Photosynthesis Research, 129(2), 171-182. https://doi.org/10.1007/s11120-016-0279-1

Zayed O, Hewedy O. A, Abdelmoteleb A, Ali M, Youssef M. S, Roumia A. F, Seymour D, & Yuan Z. C. (2023). Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction. Biomolecules 13(10):1443. https://doi.org/10.3390/biom13101443

Zhong, C., Cao, X., Hu, J., Zhu, L., Zhang, J., Huang, J., & Jin, Q. (2017). Nitrogen Metabolism in Adaptation of Photosynthesis to Water Stress in Rice Grown under Different Nitrogen Levels. Frontiers in Plant Science, 8, 1079. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01079