



## **Impacto de la deficiencia de nitrógeno en la expresión y síntesis de clorofillas en tomate**

Juan Pablo Ledesma-Valladolid<sup>1\*</sup>

Mayra Isabel Niño-González<sup>1</sup>

Guadalupe Xóchitl Malda-Barrera<sup>2</sup>

Juan Ramiro Pacheco-Aguilar<sup>1</sup>

Gerardo Manuel Nava-Morales<sup>1\*</sup>

Edmundo Mateo Mercado-Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

\*Autores para correspondencia: [jpledesma95@gmail.com](mailto:jpledesma95@gmail.com), [gerardomnava@gmail.com](mailto:gerardomnava@gmail.com), [mercado501120@gmail.com](mailto:mercado501120@gmail.com)

## **Resumen**



La síntesis de clorofillas 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 clorofillas 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 clorofillas. El objetivo de este estudio fue identificar los genes de la ruta de síntesis de clorofillas 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 clorofillas 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*.

## **Nitrogen deficiency impact on chlorophyll gene expression pathway and chlorophyll synthesis in tomato**

**Abstract.**

**Key words:** Comparative genomic, bioinformatics, *Solanum lycopersicum*.

**Fecha de recibido:** Abril 21, 2025

**Fecha de aceptado:** Octubre 31, 2025

## **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 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 ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) principalmente, y en menor proporción como aminoácidos y péptidos de cadena corta (Zayed et al., 2023). Una vez ingresados al sistema radicular, estos compuestos ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) 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  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  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 translations+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 ( $\geq 80\%$ ), % de cobertura ( $\geq 90\%$ ) 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 clorofillas 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;  $\text{NO}_3^-$  (17.54



mmol),  $\text{NH}_4^+$  (1.91 mmol),  $\text{H}_2\text{PO}_4$  (3.79 mmol),  $\text{SO}_4^{2-}$  (4.2 mmol),  $\text{K}^+$  (9.65 mmol),  $\text{Ca}^{2+}$  (8.41 mmol),  $\text{Mg}^{2+}$  (2.3 mmol),  $\text{B}^{3+}$  (148.01 mmol),  $\text{Cl}^-$  (10.2 mmol),  $\text{Cu}^{2+}$  (1.58 mmol),  $\text{Fe}^{2+}$  (55.34 mmol),  $\text{Mn}^{4+}$  (13.29 mmol) y  $\text{Zn}^+$  (12.54 mmol). Para TBN también se utilizó un sistema de irrigación por goteo con solución Hoagland con la siguiente composición;  $\text{NO}_3^-$  (12.3 mmol),  $\text{NH}_4^+$  (0.96 mmol),  $\text{H}_2\text{PO}_4$  (1.34 mmol),  $\text{SO}_4^{2-}$  (3.2 mmol),  $\text{K}^+$  (7.57 mmol),  $\text{Ca}^{2+}$  (3.87 mmol),  $\text{Mg}^{2+}$  (1.69 mmol),  $\text{B}^{3+}$  (83.26 mmol),  $\text{Cl}^-$  (4.6 mmol),  $\text{Cu}^{2+}$  (1.1 mmol),  $\text{Fe}^{2+}$  (43.34 mmol),  $\text{Mn}^{4+}$  (9.1 mmol) y  $\text{Zn}^+$  (8.41 mmol). La conductividad eléctrica y el pH de la solución Hoagland del CT fue de  $4.35 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  y 5.62, respectivamente, mientras que para TBN la conductividad eléctrica y el pH fueron de  $2.54 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  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  $4^\circ\text{C}$ , posteriormente, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-81^\circ\text{C}$ .

## 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  $4^\circ\text{C}$ . Se



recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 663 y 645 nm. El contenido de clorofila total se expresó como  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  PF. Se utilizó la siguiente fórmula para su cálculo:

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

## 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 el estroma (Cuadro 1).



**Cuadro 1.** Identificación de genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y sus características fisicoquímicas.

Especie	Nombre del gen	Proteína GenBank ID	Gen GenBank ID	Longitud de proteína (aa)	Peso molecular de proteína (kDa)	Punto isoelectrónico	Longitud CDS (pb)	Número de exones	Localización cromosomal	Localización subcelular	
										Cell-PLoc 2.0	WoLF PSORT
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMA1</i>	NP_176125.1	NM_104609.4	543	59,515	7.95	1,631	3	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMA2</i>	NP_172465.1	NM_100868.3	530	58,292	8.82	1,592	3	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMA3</i>	NP_180683.1	NM_128681.3	524	58,691	8.78	1,574	3	2	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtGSA1</i>	NP_201162.1	NM_125752.4	474	50,370	6.42	1,424	3	5	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtGSA2</i>	NP_190442.1	NM_114732.5	472	50,142	7.01	1,418	4	3	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMB1</i>	NP_177132.1	NM_105642.4	430	46,690	6.96	1,292	13	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMB2</i>	NP_175085.1	NM_103545.2	406	44,878	8.39	1,221	10	1	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMC</i>	NP_196445.1	NM_120911.4	382	41,043	8.75	1,148	5	5	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMD</i>	NP_565625.1	NM_128211.4	321	34,225	7.81	965	9	2	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEME1</i>	NP_850587.1	NM_180256.2	418	46,254	6.64	1,256	6	3	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEME2</i>	NP_181581.1	NM_129611.5	394	43,580	8.29	1,184	6	2	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMF</i>	NP_171847.4	NM_100230.7	386	43,796	6.24	1,160	8	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtHEMG1</i>	NP_192078.1	NM_116399.4	537	57,695	9.13	1,613	9	4	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCHLH</i>	NP_196867.1	NM_121366.4	1381	153,574	5.8	4,145	5	5	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCHLD</i>	NP_563821.2	NM_100725.4	760	83,284	5.26	2,282	15	1	Cloroplasto	Estroma
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCHLII</i>	NP_193583.1	NM_117962.3	424	46,270	6.08	1,274	3	4	Cloroplasto	Estroma
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCHLII2</i>	NP_199405.2	NM_123961.4	418	46,098	5.36	1,256	3	5	Cloroplasto	Estroma
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCHLM</i>	NP_194238.1	NM_118640.3	312	33,796	7.68	938	3	4	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCRDI</i>	NP_191253.1	NM_115553.4	409	47,631	8.55	1,229	5	3	Cloroplasto	Membrana tilacoidal
<i>A. thaliana</i>	<i>AtDVR</i>	NP_197367.1	NM_121871.3	417	45,893	7.47	1,253	1	5	Cloroplasto	Membrana tilacoidal/Estroma
<i>A. thaliana</i>	<i>AtPORA</i>	NP_200230.1	NM_124799.4	405	43,863	9.42	1,217	4	5	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtPORB</i>	NP_194474.1	NM_118879.4	401	43,359	9.23	1,205	5	4	Cloroplasto	Cloroplasto



<i>A. thaliana</i>	<i>AtPORC</i>	NP_171860.1	NM_100243.4	401	43,883	9.18	1,205	5	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCAO</i>	NP_175088.1	NM_103548.5	536	60,331	7.96	1,610	8	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtNOL</i>	NP_568145.1	NM_120572.3	348	38,149	9.49	1,046	13	5	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCHLG</i>	NP_190750.1	NM_115041.4	387	41,881	8.52	1,163	14	3	Cloroplasto	Estroma
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIHEMA1</i>	XP_004238036.1	XM_004237988.4	544	59,342	8.37	1,634	3	4	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIGSA</i>	NP_001234690.2	NM_001247761.2	482	51,500	6.53	1,448	3	4	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIHEMB</i>	XP_004245301.1	XM_004245253.4	430	46,836	6.36	1,292	14	8	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIHEMD</i>	XP_010320354.1	XM_010322053.4	302	32,359	8.19	908	10	4	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIHEME</i>	XP_010327114.1	XM_010328812.4	420	45,984	6.47	1,262	6	10	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIHEMF</i>	XP_004248412.2	XM_004248364.5	399	44,717	5.8	1,199	8	10	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIHEMG1</i>	NP_001335308.1	NM_001348379.1	558	60,446	8.98	1,676	8	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICHLH</i>	XP_004236610.1	XM_004236562.5	1381	153,688	5.93	4,145	5	4	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICHLD</i>	XP_004236627.1	XM_004236579.5	766	83,918	5.28	2,300	15	4	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICHLI</i>	XP_004248139.1	XM_004248091.5	427	46,434	6.07	1,283	3	10	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICHLM</i>	XP_004235845.2	XM_004235797.5	327	35,532	6.96	983	2	3	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICRD1</i>	NP_001332768.1	NM_001345839.1	404	47,185	8.99	1,214	5	10	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIDVR</i>	XP_010321210.1	XM_010322908.4	420	46,086	6.41	1,262	2	1	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIPORA</i>	XP_004251852.1	XM_004251804.5	397	42,812	9.19	1,193	5	12	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIPORB</i>	NP_001304903.1	NM_001317974.1	395	42,611	9.42	1,187	5	10	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIPORC</i>	NP_001296970.1	NM_001310041.1	399	43,199	9.27	1,199	5	7	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICAO</i>	XP_004250311.1	XM_004250263.5	535	60,237	7.54	1,607	9	11	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SINOL</i>	XP_010321272.1	XM_010322970.4	346	37,925	9.22	1,040	13	5	Cloroplasto	Cloroplasto
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SICHLG</i>	XP_004246318.1	XM_004246270.4	369	40,038	8.26	1,109	15	9	Cloroplasto	Cloroplasto

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

3



4

5

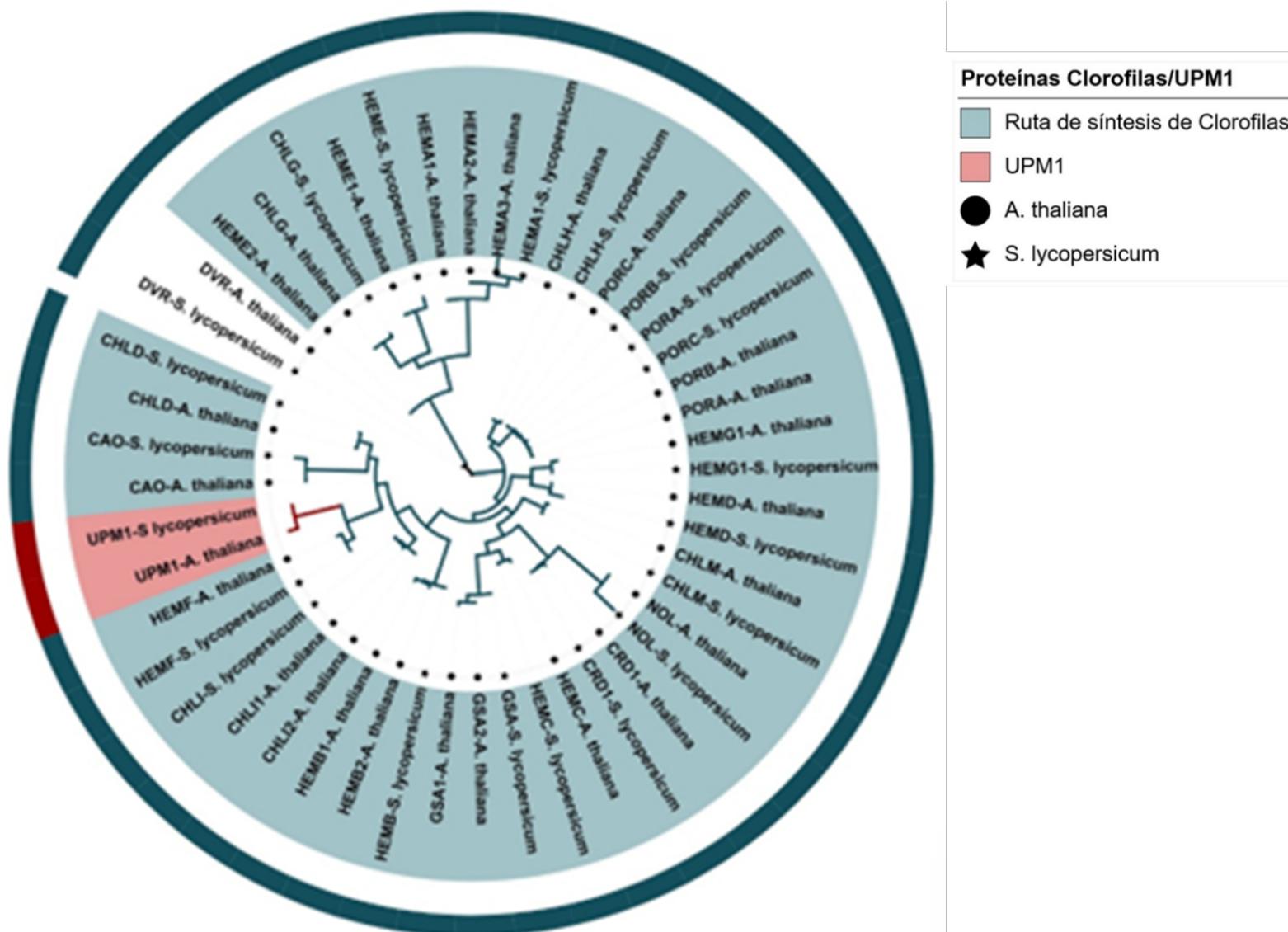
## 6      Análisis de alineamiento múltiple y análisis filogenético de secuencias de 7      aminoácidos

8

9

10 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  
11 identificadas en ambas especies ([Figura 1](#)). Este análisis mostró el agrupamiento de las proteínas  
12 homólogas de tomate y *A. thaliana* en un mismo clado. Asimismo, el UPM1 de ambos modelos  
13 biológicos se agrupó satisfactoriamente en un solo clado. Las secuencias identificadas en tomate  
14 mostraron una alta homología con respecto a las proteínas identificadas en *A. thaliana*. El análisis  
15 de alineamiento múltiple mostró en promedio alrededor de 78 % de homología entre las proteínas  
16 de ambos modelos biológicos. La menor homología la obtuvo HEMD con 63.97 % mientras que,  
17 la mayor homología fue para CHLH con 86.19 % de ambos modelos. La alta homología que se  
18 obtuvo entre ambos modelos biológicos demostró la generación de genes ortólogos con  
19 funcionalidad conservada, los cuáles se derivan de eventos de especiación a lo largo de la historia  
20 evolutiva de tomate y *A. thaliana* (Liu et al., 2023; Mao et al., 2022; Xi et al., 2022; Xia et al.,  
21 2023). En el caso particular de *A. thaliana*, el análisis de alineamiento múltiple permitió la  
22 identificación de dos o tres isoformas para HEMA, GSA, HEMB, HEME y CHLI. Para HEMA  
23 (HEMA1, HEME2 y HEMA3) como se observa en el [Cuadro 1](#) y la Figura 1. El análisis de  
24 alineamiento muestra una alta homología entre las tres isoformas identificadas (68-81 %). Los  
25 grupos de isoformas para GSA (GSA1 y GSA2), HEMB (HEMB1 y HEMB2), HEME (HEME1 y  
26 HEME2) y CHLI (CHLI1 y CHLI2) obtuvieron una homología de 90, 65, 51 y 83 %  
27 respectivamente. Mientras que, la familia de proteínas POR (PORA, PORB y PORC) obtuvo una  
28 alta homología entre sí (77-87 %). Lo anterior sugiere que han existido eventos de duplicación  
29 genética a lo largo de la historia evolutiva de *A. thaliana*, dando lugar a la generación de genes  
30 parálogos con funcionalidad conservada (Liu et al., 2023; Mao et al., 2022; Xi et al., 2022; Xia  
31 et al., 2023). Por último, las secuencias de aminoácidos de UPM1 también obtuvieron una alta  
32 homología (75 %).

34



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

40

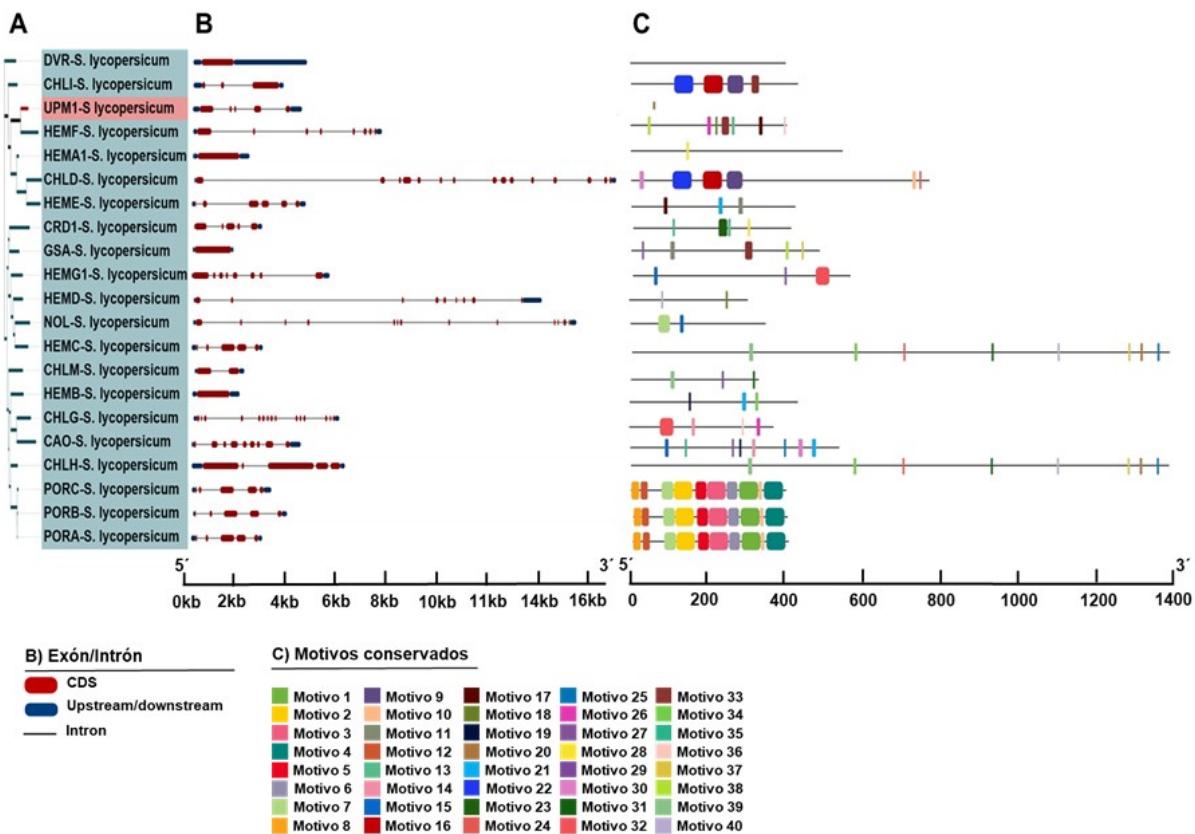
41

## 42 Análisis estructural de genes y proteínas de la ruta de síntesis de clorofillas y 43 UPM1



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

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



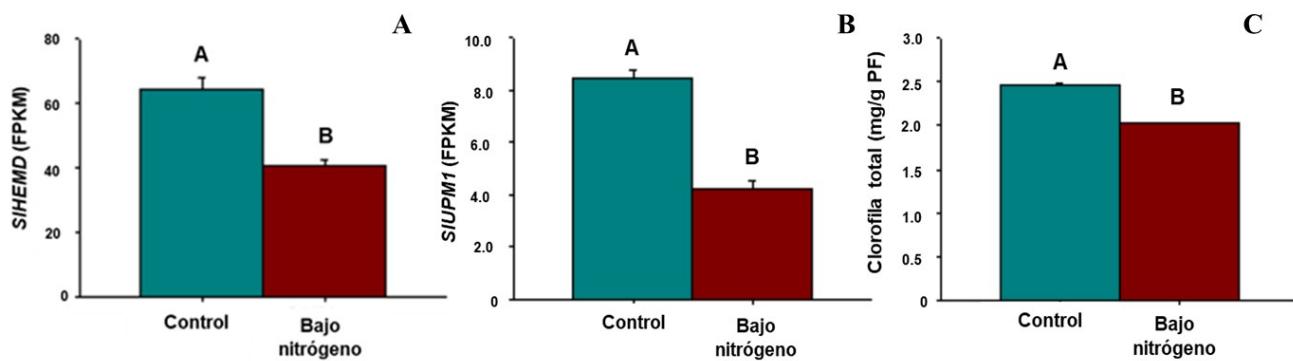
## 67 Niveles de expresión *in silico* de *SIHEMD*, *SIUPM1* y contenido de clorofila total

70 Se analizó el nivel de expresión *in silico* de los genes *SIHEMD* y *SIUPM1* bajo condiciones de  
 71 TBN y CT. Los resultados obtenidos mostraron una reducción de 36 % aproximadamente en los  
 72 niveles de transcritos de *SIHEMD* en condiciones del TBN (Figura 3A). Respecto a *SIUPM1*, los  
 73 resultados también mostraron una reducción en los niveles de transcritos de  $\approx 49$  % para el TBN  
 74 (Figura 3B). El contenido de clorofila total (CCT) bajo condiciones del TBN se observó una  
 75 reducción del 20 % (Figura 3C). El UPM1 es un componente esencial en el óptimo funcionamiento  
 76 de la ruta de asimilación intracelular de nitrógeno (Garai & Tripathy, 2018). También promueve la  
 77 síntesis del grupo prostético Sirohemo, el cual forma parte de la estructura de nitrito reductasa  
 78 (Garai & Tripathy, 2018). Lo anterior, sugiere que la reducción en los niveles de los transcritos de

79 *SIUPM1* promueve una menor eficiencia en el metabolismo intracelular de nitrógeno; y una menor  
80 tasa metabólica del nitrógeno intracelular se asocia a una menor capacidad en la síntesis de  
81 metabolitos intermediarios como el ácido glutámico, el cual, al ser el principal precursor de la  
82 síntesis de clorofilas propicia la caída en el nivel de transcritos de *SIHEMD*, así como de la propia  
83 síntesis de clorofila total. Diversas investigaciones han evidenciado el impacto en condiciones de  
84 deficiencia de nitrógeno sobre el nivel de expresión de las enzimas de la ruta de síntesis de  
85 clorofilas. Choi et al., (2016); Wen et al., (2019) y Yoneda et al., (2016) observaron una reducción  
86 en el nivel de expresión de *MdHEMA1*, *MdHEMA2*, *MdHEMB1*, *MdHEMD*, *SechlL* y *SechlN*.  
87 Estos resultados se asociaron con la caída en la síntesis de metabolitos intermediarios de la ruta de  
88 síntesis de clorofilas como ácido 5-amino levulínico y Uroporfirinógeno III. Wen et al., (2019)  
89 obtuvieron una reducción en los niveles de *MdNiR*. Por último, la sobre expresión de *AtUPM1* se  
90 asoció con el incremento en el nivel de expresión de *AtNII* y *AtNIA2* (291 y 280 %,  
91 respectivamente). Estos resultados se asociaron con el incremento en el nivel de expresión de  
92 *AtUROD*, *AtCHLH*, *AtPORC*, así como del contenido de clorofila total de 50, 97, 79 y 25 %,  
93 respectivamente.

94 **Figura 3. (A y B)** Comparación de los niveles de expresión de *SIHEMD* y *SIUPM1*. **(c)**  
95 Comparación de la síntesis de clorofila total en hoja.

96



97  
98 \* Los datos de expresión genómica se obtuvieron de la base de datos NCBI-GEO y expresados como FPKM (Fragmentos por  
99 kilobase de transcripción por millón de lecturas mapeadas).

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

103

104

105



106

## Conclusiones

107

108

109 Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas de la ruta de síntesis de clorofilas y su  
110 funcionalidad están conservadas en la planta de tomate. Asimismo, se evidencia un severo impacto  
111 en condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, provocando la reducción de la expresión de  
112 *SIHED1* y *SIUPM1* y la capacidad de síntesis de clorofilas. Se demuestra el importante papel de  
113 *UPM1* bajo dichas condiciones en la regulación de la síntesis de clorofilas.

114

115

## Referencias

116

117

118

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

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

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

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



- 134 Choi, S. Y., Park, B., Choi, I.-G., Sim, S. J., Lee, S.-M., Um, Y., & Woo, H. M. (2016).  
135 Transcriptome landscape of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for nitrogen starvation responses  
136 using RNA-seq. *Scientific Reports*, 6(1), 30584. <https://doi.org/10.1038/srep30584>
- 137 Croce, R., & van Amerongen, H. (2013). Light-harvesting in photosystem I. *Photosynthesis*  
138 *Research*, 116(2-3), 153-166. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9838-x>
- 139 Ferreira, V. S., Pinto, R. F., & Sant'Anna, C. (2016). Low light intensity and nitrogen starvation  
140 modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*,  
141 120(3), 661-670. <https://doi.org/10.1111/jam.13007>
- 142 Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., & Feng, Y. (2018). Structure and Function of the Photosystem  
143 Supercomplexes. *Frontiers in Plant Science*, 9, 357. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00357>
- 144 Garai, S., & Tripathy, B. C. (2018). Alleviation of Nitrogen and Sulfur Deficiency and  
145 Enhancement of Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by Overexpression of Uroporphyrinogen  
146 III Methyltransferase (UPM1). *Frontiers in Plant Science*, 8, 2265.  
147 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02265>
- 148 Garai S., Joshi N. C., & Tripathy B.C. (2016). Phylogenetic analysis and photoregulation of  
149 siroheme biosynthesis genes: uroporphyrinogen III methyltransferase and sirohydrochlorin  
150 ferrochelatase of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Biol Plants* 22(3):351-359.  
151 <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0363-1>
- 152 Gilad G., Sapir O., Hipsch M., Waiger D., Ben-Ari J., Zeev BB, Zait Y., Lampl N., & Rosenwasser  
153 S. (2025). Nitrogen Assimilation Plays a Role in Balancing the Chloroplastic Glutathione Redox  
154 Potential Under High Light Conditions. *Plant Cell Environ.* 48(5):3559-3572.  
155 <https://doi.org/10.1111/pce.15368>
- 156 Guo S., Zhou Y., Shen Q., & Zhang F. (2007). Effect of ammonium and nitrate nutrition on some  
157 physiological processes in higher plants - growth, photosynthesis, photorespiration, and water  
158 relations. *Plant Biol* 9(1):21-9. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924541>
- 159 Krapp A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing  
160 pieces. *Curr Opin Plant Biol.* 25:115-22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.010>



- 161 Lan, Y., Song, Y., Zhao, F., Cao, Y., Luo, D., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. (2022). Phylogenetic,  
162 Structural and Functional Evolution of the LHC Gene Family in Plant Species. International  
163 Journal of Molecular Sciences, 24(1), 488. <https://doi.org/10.3390/ijms24010488>
- 164 Liu, J., Wang, C., Peng, J., Ju, J., Li, Y., Li, C., & Su, J. (2023). Genome-wide investigation and  
165 expression profiles of the NPF gene family provide insight into the abiotic stress resistance of  
166 *Gossypium hirsutum*. Frontiers in Plant Science, 14, 1103340.  
167 <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1103340>
- 168 Lu, L., Zhang, Y., Li, L., Yi, N., Liu, Y., Qaseem, M. F., Li, H., & Wu, A. M. (2021). Physiological  
169 and Transcriptomic Responses to Nitrogen Deficiency in *Neolamarckia cadamba*. Frontiers in  
170 Plant Science, 12, 747121. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.747121>
- 171 Makino, A., & Sage, R. F. (2007). Temperature Response of Photosynthesis in Transgenic Rice  
172 Transformed with 'Sense' or 'Antisense' *rbcS*. Plant and Cell Physiology, 48(10), 1472-1483.  
173 <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm118>
- 174 Mao, P., Run, Y., Wang, H., Han, C., Zhang, L., Zhan, K., Xu, H., & Cheng, X. (2022). Genome-  
175 Wide Identification and Functional Characterization of the Chloride Channel TaCLC Gene Family  
176 in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Frontiers in Genetics, 13, 846795.  
177 <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.846795>
- 178 Mao H. T., Pang X, Li T., Qin Y., Zhang Z. W., Yuan S., Yuan M., Brestic M., & Chen Y. E.  
179 (2025). Chlorophyll b is essential for the growth, photoprotection, and photosystem I assembly in  
180 wheat. Plant J.;123(4):e70442. <https://doi.org/10.1111/tpj.70442>
- 181 Nelson, N., & Yocom, C. F. (2006). Structure and function of photosystems i and ii. Annual Review  
182 of Plant Biology, 57(1), 521-565. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350>
- 183 Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D. A., Tikkannen, M., Boekema, E. J., Aro, E.-M., &  
184 Jansson, S. (2014). The Light-Harvesting Chlorophyll a/b Binding Proteins LhcB1 and LhcB2 Play  
185 Complementary Roles during State Transitions in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 26(9), 3646-3660.  
186 <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127373>
- 187 Roosta, H. R., Estaji, A., Khadivi, A., & Shams M. (2025). Balanced ammonium–nitrate nutrition  
188 enhances photosynthetic efficiency, micronutrient homeostasis, and antioxidant networks via ROS



- 189 signaling in *Glycyrrhiza glabra* across soil and soilless systems. *Sci Rep* 15, 25404 .  
190 <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11181-w>
- 191 Shimizu, R., Dempo, Y., Nakayama, Y., Nakamura, S., Bamba, T., Fukusaki, E., & Fukui, T.  
192 (2015). New Insight into the Role of the Calvin Cycle: Reutilization of CO<sub>2</sub> Emitted through Sugar  
193 Degradation. *Scientific Reports*, 5(1), 11617. <https://doi.org/10.1038/srep11617>
- 194 Slattery, R. A., VanLoocke, A., Bernacchi, C. J., Zhu, X.-G., & Ort, D. R. (2017). Photosynthesis,  
195 Light Use Efficiency, and Yield of Reduced-Chlorophyll Soybean Mutants in Field Conditions.  
196 *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00549>
- 197 Smith, K., Strand, D. D. & Walker, B. J. (2024) Evaluating the contribution of plant metabolic  
198 pathways in the light to the ATP: NADPH demand using a meta-analysis of isotopically non-  
199 stationary metabolic flux analyses. *Photosynth Res* 161, 177–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-024-01106-5>
- 200
- 201 Tanaka R., Kobayashi K., & Masuda T. (2011). Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*.  
202 *The Arabidopsis Book* (9). <https://doi.org/10.1199/tab.0145>
- 203 van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis*  
204 *Research*, 116(2-3), 251-263. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9824-3>
- 205 Wen, B., Li, C., Fu, X., Li, D., Li, L., Chen, X., Wu, H., Cui, X., Zhang, X., Shen, H., Zhang, W.,  
206 Xiao, W., & Gao, D. (2019a). Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll  
207 synthesis of detached apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 363-371.  
208 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.007>
- 209 Wu, Y., Li, Q., Jin, R., Chen, W., Liu, X., Kong, F., Ke, Y., Shi, H., & Yuan, J. (2019). Effect of  
210 low-nitrogen stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of maize  
211 cultivars with different low-nitrogen tolerances. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(6), 1246-  
212 1256. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62030-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62030-1)
- 213 Wu, Y., Liao, W., Dawuda, M.M., Hu, I., & Yu, J. (2019). 5-Aminolevulinic acid (ALA)  
214 biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. *Plant Growth Regul* 87,  
215 357–374 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0463-8>



- 216 Xi, Y., Hu, W., Zhou, Y., Liu, X., & Qian, Y. (2022). Genome-Wide Identification and Functional  
217 Analysis of Polyamine Oxidase Genes in Maize Reveal Essential Roles in Abiotic Stress Tolerance.  
218 Frontiers in Plant Science, 13, 950064. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.950064>
- 219 Xi, Y., Yin, L., Chi, Z. & Luo, G. (2021). Characterization and RNA-seq transcriptomic analysis  
220 of a *Scenedesmus obliquus* mutant with enhanced photosynthesis efficiency and lipid productivity.  
221 *Scientific Reports*, 11(1), 11795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88954-6>
- 222 Xia, J., Wang, Y., Zhang, T., Pan, C., Ji, Y., Zhou, Y., & Jiang, X. (2023). Genome-wide  
223 identification, expression profiling, and functional analysis of ammonium transporter 2 (AMT2)  
224 gene family in cassava (*Manihot esculenta* crantz). *Frontiers in Genetics*, 14, 1145735.  
225 <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1145735>
- 226 Yoneda, A., Wittmann, B. J., King, J. D., Blankenship, R. E., & Dantas, G. (2016). Transcriptomic  
227 analysis illuminates genes involved in chlorophyll synthesis after nitrogen starvation in  
228 *Acaryochloris* sp. CCME 5410. *Photosynthesis Research*, 129(2), 171-182.  
229 <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0279-1>
- 230 Zayed O, Hewedy O. A, Abdelmoteleb A, Ali M, Youssef M. S, Roumia A. F, Seymour D, & Yuan  
231 Z. C. (2023). Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and  
232 Microbe Interaction. *Biomolecules* 13(10):1443. <https://doi.org/10.3390/biom13101443>
- 233 Zhong, C., Cao, X., Hu, J., Zhu, L., Zhang, J., Huang, J., & Jin, Q. (2017). Nitrogen Metabolism  
234 in Adaptation of Photosynthesis to Water Stress in Rice Grown under Different Nitrogen Levels.  
235 *Frontiers in Plant Science*, 8, 1079. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01079>
- 236