



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

EFFECTO DEL NITRÓGENO EN LA RESISTENCIA A LA SEQUÍA EN LA PLANTA *SOLANUM
LYCOPERSICUM L.*

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniera en
Biotecnología.

Director: Dr. José Miguel Álvarez H.
Centro de Biotecnología Vegetal, Genome Regulation Laboratory.
(Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello).

CATALINA ISABEL COFRÉ ESPINOZA

SANTIAGO, CHILE.
ENERO, 2024.



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**“EFECTO DEL NITRÓGENO EN LA RESISTENCIA A LA SEQUÍA EN LA PLANTA
SOLANUM LYCOPERSICUM L.”**

CATALINA ISABEL COFRÉ ESPINOZA

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del director de Memoria de Título, el Dr. José Miguel Álvarez Herrera, en el Laboratorio “Genome Regulation Laboratory”, en dependencias del Centro de Biotecnología Vegetal (CBV) de la Universidad Andrés Bello.

Dr. José Miguel Álvarez H.

Director de Memoria de Título

Dr. Paulo Canessa Á.

Comisión Evaluadora

Dra. Susana Sáez A.

Comisión Evaluadora

Dr. Juan Antonio Valdés M.

Director de la carrera Ingeniería en Biotecnología

Santiago, Chile.

Enero, 2024.

DEDICATORIA

Esta tesis no solo representa el fruto de mi conocimiento académico alcanzado, sino que también es un símbolo de mi esfuerzo y perseverancia. Por eso, con gratitud y admiración hacia esa versión fortalecida de mí misma, que surgió en los momentos más difíciles, dedico este logro.

“Per aspera ad astra”, Séneca.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi tutor, José Miguel, cuya sabiduría y paciencia han sido invaluable en este viaje académico. Gracias por no solo guiarme en mi investigación, sino también por brindarme la oportunidad de explorar nuevas ideas, de poder desenvolverme en este emocionante campo de la ciencia y quién siempre creyó en mis capacidades.

En esta instancia me gustaría agradecer sincera y profundamente a cada uno de los integrantes que conforman el laboratorio “Genome Regulation Laboratory” haciendo de este espacio un lugar acogedor, en donde pude desempañarme y dar mis primeros pasos como futura profesional. La experiencia que he adquirido ha sido invaluable, y no puedo expresar con palabras mi gratitud hacia cada uno de ellos, quienes me han apoyado y guiado a lo largo de mi tiempo en esta travesía. Cada uno de ustedes ha desempeñado un papel fundamental en mi desarrollo como profesional y en mi crecimiento personal.

Adicionalmente, quisiera expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Tomás Moyano y al Dr. Sebastián Contreras por su gigantesca disposición y gentileza de guiarme de manera excepcional en los aspectos bioinformáticos de mi proyecto, gracias a su experiencia y paciencia porque fueron esenciales para mi entendimiento en el tema. Al mismo quisiera dar gracias al Bt. Camilo Osorio, cuya ayuda fue verdaderamente invaluable en mi trayectoria profesional. No solo me guio a través de los aspectos fundamentales del área, sino que también invirtió tiempo significativo enseñándome las complejidades más avanzadas del trabajo de laboratorio. Además, agradezco la confianza que depositó en mí, brindándome la oportunidad de aprender y crecer bajo su mentoría. Su impacto positivo ha sido fundamental en mi desarrollo profesional, y estoy agradecida por haber contado con su guía y apoyo a lo largo de esta travesía.

Asimismo, aprecio profundamente tanto al Dr. Mario Agurto como al Dr. Jorge Pérez por la paciencia y generosidad al compartir sus conocimientos sobre el cultivo y tratamiento de las plantas de tomates, que han sido fundamental para el desarrollo de mi proyecto.

Debo reconocer del apoyo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) por su colaboración fundamental para llevar a cabo mi proyecto de investigación, la disposición de la institución para apoyar iniciativas científicas como la mía, demuestra su compromiso con el avance de la investigación y desarrollo. De igual manera, agradecer a la invaluable iniciativa “Concurso APP 2023” brindada por la misma Universidad Andrés Bello para los estudiantes para el desarrollo de los proyectos, es por esta razón que estoy profundamente agradecido/a por la confianza depositada en mí y por la oportunidad. Y por añadidura agradecer a los fondos otorgados por Fondecyt regular #1210389 y el apoyo a iBIO para la realización de este trabajo.

Y, por último, pero no menos importante, quiero reconocer profundamente el apoyo indiscutible de mi familia. Gracias por creer en mí y totalmente agradecida por tener una familia alentadora a mi lado.

ÍNDICE

ABREVIACIONES	8
RESUMEN	8
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
OE 1. Determinar el efecto de dosis contrastantes del nitrógeno en la respuesta fisiológica durante estadios tempranos de <i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Moneymaker frente a sequía en el tiempo.	20
1.1. <i>Ensayo en placas con suplementación de nitrógeno.</i>	20
1.2. <i>Ensayo de sequía:nitrógeno en sustrato.</i>	21
1.3. <i>Evaluación del contenido volumétrico de agua.</i>	23
1.4. <i>Mediciones de parámetros fisiológicos.</i>	24
1.5. <i>Medición estomática de tejido foliar.</i>	26
1.6. <i>Mediciones del contenido relativo de agua.</i>	27
1.7. <i>Tasa de sobrevivencia.</i>	28
1.8. <i>Cuantificación de biomasa.</i>	29
1.9. <i>Análisis estadístico.</i>	29
OE 2. Evaluar el efecto de la dosis de nitrógeno en la expresión de genes marcadores de respuesta a estrés hídrico en <i>Solanum lycopersicum</i> L cv. Moneymaker.	30
2.1. <i>Extracción de tejido.</i>	30
2.2. <i>Procesamiento de muestras.</i>	30
2.3. <i>Procesamiento de datos de expresión génica.</i>	32

OE 3. Identificar cambios en la expresión genética global y procesos biológicos involucrados en la adaptación a la sequía de <i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Moneymaker frente a dosis contrastantes de nitrógeno.	34
3.1. <i>Búsqueda de cambios en los patrones de expresión génica.</i>	33
3.2. <i>Análisis de los datos transcriptómicos.</i>	34
RESULTADOS	35
1.1. <i>Cuantificación de biomasa en placas.</i>	35
1.2. <i>Divergencia fenotípica entre tratamientos.</i>	37
1.3. <i>Cuantificación de biomasa.</i>	40
1.4. <i>Evaluación de intensidad hídrica.</i>	41
1.5. <i>Respuesta fisiológica de las plantas.</i>	42
1.6. <i>Respuesta estomática según los tratamientos.</i>	47
1.7. <i>Contenido relativo de agua en los folíolos.</i>	49
1.8. <i>Tasa de sobrevivencia.</i>	51
2.1. <i>Perfil de las muestras de RNA.</i>	53
2.2. <i>Expresión diferencial de genes.</i>	54
3.1. <i>Análisis global de expresión.</i>	¡Error! Marcador no definido.
3.2. <i>Búsqueda de funciones biológicas.</i>	¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	69
REFERENCIAS	70

ABREVIACIONES

A

ABA

Ácido abscísico., 16, 53, 54, 68

ABF2

Nombre proveniente del inglés, hace referencia al gen abscisic acid responsive elements-binding factor 2., 53

AREB1

Nombre proveniente del inglés, hace referencia al gen ABA-response element binding factor AREB1., 53

ATP

Adenosín trifosfato., 14

Ch

CH₄

Fórmula química para representar al metano., 12

C

CO₂

Fórmula química para representar al Dióxido de carbono., 12, 13, 25, 68

D

D

Proviene del inglés, corresponde a la palabra drought., 19, 20, 22, 35, 37, 53, 66, 67, 68, 69, 71, 72

D:HN

Corresponde a la abreviación drought:high nitrate, un tratamiento aplicado.

D:LN

Corresponde a la abreviación de drought:low nitrate, un tratamiento aplicado.

DE

Densidad estomática., 26

DGE

Proveniente del inglés, differential gene expression.

E

E

Tasa de respiración., 6, 7, 24, 35, 38, 67, 68, 69, 70, 71, 72

F

Fold change

Proveniente del inglés, significa tasa de cambio., 57

G

GO terms

Proveniente del inglés, *Gene Ontology*., 33

g_s

Conductancia estomática., 24

H

H₂O

Fórmula química para representar al agua., 25

HR

Humedad relativa., 20
HS gel
Proveniente del inglés, High Sensitive Gel., 31

I

IRGA
Analizador de gases infrarrojo., 23, 24

K

KNO₃
Compuesto químico, nitrato de potasio.,
19, 20, 21, 22, 25, 34, 35, 36, 38, 45, 62

M

MES
Compuesto químico, ácido 2-(N-morfolino)
etanosulfónico., 19, 20

MS
Murashige and Skoog, medio
comúnmente empleado para el
crecimiento de plantas., 19, 20

N

N
Hace referencia al tratamiento con
nitrógeno en las plantas.

N₂O
Fórmula química para representar al óxido
nitroso., 12, 14

NIA1
Nombre proveniente del inglés, hace
referencia al gen nitrate reductase 1.,
53, 54

NIR1

Nombre proveniente del inglés, hace
referencia al gen nitrite reductase 1., 53,
54

P

PAR
Proveniente del inglés, *Photosynthetically
Active Radiation.*, 20, 25

PC1
Componente principal uno., 52

PC2
Componente principal dos., 52

PCA
Proveniente del inglés, *Principal
Components Analysis.*, 52

Phi2
Proveniente del inglés, quantum efficiency
of photosystem II (PSII)., 45, 62

PhiNO
Proveniente del inglés, non-photochemical
quantum efficiency., 45

PhiNPQ
Proveniente del inglés, photochemical
quantum efficiency regulated by non-
photochemistry., 24, 45

ppm
significa partes por millón., 25

PSII
Proveniente del inglés, *Photosystem II*
haciendo alusión al fotosistema II., 63

p-value
Proveniente del inglés, significa valor de
p., 29

R

RNA

Proveniente del inglés, significa ácido ribonucleico., 7, 30, 31, 32, 33, 51, 67, 69, 71

RNA-seq

Del inglés, secuenciación del transcriptoma entero para clonación al azar., 32, 33, 67, 69, 71

ROS

Proveniente del inglés, Reactive Oxygen Species.

RQN

Proveniente del inglés, RNA Quality Number, 31, 51

RWC

Proveniente del inglés, *Relative Water Content.*, 27, 47, 48

S

SPAD

Proviene del inglés, Soil Plant Analysis Development. Corresponde a una

medida de la intensidad de la luz reflejada por la clorofila de las hojas., 24, 43, 62

SS gel

Proveniente del inglés, Standard Sensitive Gel., 31

W

WW

Proviene del inglés, corresponde a la palabra well-water.

WW:HN

Hace referencia al tratamiento de riego constante y alto nitrato (10 mM)., 52

WW:LN

Hace referencia al tratamiento de riego constante y bajo nitrato (1 mM)., 52
Proviene del inglés, well-water., 22, 52

B

β-ME

compuesto químico 2-mercaptoetanol., 31

RESUMEN

El nitrógeno y el agua constituyen dos de los recursos esenciales para la sobrevivencia de las plantas y en conjunto representan un costo significativo en el ámbito agrícola. Aunque se ha estudiado de manera aislada los mecanismos que emplean las plantas para señalar el estatus en ambos aspectos, se desconoce la manera en que estas perciben y responden a la combinación simultánea de la sequía y niveles nitrógeno. Este aspecto cobra especial relevancia en diversas regiones del mundo, al considerar las predicciones sobre las variaciones simultáneas en los niveles de excesivos de aplicación de fertilizantes nitrogenados y la escasez de agua potable disponible para el sector agronómico como resultado del cambio climático.

Si bien se han reportado indicios de interacción entre las vías de señalización de nitrógeno y sequía en *Arabidopsis thaliana*, una planta modelo de estudio, aún persisten espacios vacíos de este fenómeno en cultivos de interés agronómico como lo es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Este fruto ampliamente cultivado en Chile desempeña un papel esencial en la industria alimentaria debido a su versatilidad y de alta demanda para su consumo.

En este trabajo se propuso evaluar el impacto de dos tratamientos contrastantes de nitrógeno en las plantas frente a la condición de sequía. Durante los 16 días de exposición al déficit hídrico los experimentos estuvieron enfocados en evaluar aspectos fisiológicos, cambios de expresión génica y procesos biológicos mediante un análisis transcriptómico. Los resultados revelan que ambas dosis de nitrógeno impactan de formas diferentes en el crecimiento y rendimiento de las plantas en déficit hídrico, donde las plantas tratadas con una dosis baja de nitrógeno muestran un aumento en la tolerancia a la sequía. A nivel molecular, los genes *NIR1* y *NIA1* consistentemente responden a las dosis de nitrógeno, mientras *ABRE1* y *ABF2* responden a ambos tratamientos. Se detectó un mayor número de genes comunes como propios de la respuesta a nitrógeno, del total de genes un 37,8 % se encuentran diferencialmente expresados independientemente de la condición hídrica. El análisis transcriptómico destaca la inducción de genes relacionados con la fotosíntesis y la activación de vías como la biosíntesis de ácido abscísico en las distintas condiciones en respuesta a la sequía. Estos resultados posicionan a la fitohormona ABA como un participante clave en respuesta a la sequía y nitrato.

ABSTRACT

Nitrogen and water are two of the essential resources for plant survival and together represent a significant cost in agriculture. Although the mechanisms used by plants to signal the status of both have been studied in isolation, it is not known how plants perceive and respond to the simultaneous combination of drought and nitrogen levels. This is of relevance in several regions of the world, considering predictions of simultaneous variations in the levels of excess nitrogen fertiliser application and the scarcity of fresh water available to the agricultural sector as a result of climate change.

Although indications of interaction between nitrogen signalling pathways and drought have been reported in *Arabidopsis thaliana*, a model plant of study, there are still gaps in this phenomenon in crops of agronomic interest such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Tomatoes are widely cultivated in Chile, plays an essential role in the food industry due to its versatility and high demand for consumption.

In this work we proposed to evaluate the impact of two contrasting nitrogen treatments on plant adaptation to drought. During the 16 days of exposure to water deficit, the experiments were focused on evaluating physiological aspects, gene expression changes and biological processes by means of transcriptomic analysis. The results reveal that both doses of nitrogen impact in different ways on the growth and yield of plants in water deficit, where plants treated with a low dose of nitrogen show an increase in drought tolerance. At the molecular level, *NIR1* and *NIA1* genes consistently respond to nitrogen doses, while *ABRE1* and *ABF2* respond to both treatments. A higher number of common genes were detected as nitrogen-responsive, 37.8% of the total number of genes were differentially expressed regardless of water condition. The transcriptomic analysis highlights the induction of genes related to photosynthesis and the activation of pathways such as abscisic acid biosynthesis in the different conditions in response to drought. These results position the phytohormone ABA as a key player in response to drought and nitrate.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático afecta la productividad agrícola.

La actividad humana en las últimas décadas ha provocado un aumento considerable de la temperatura media global. Este fenómeno, conocido como cambio climático, se manifiesta en una variación significativa de los patrones de comportamiento meteorológicos, como también en el aumento de la frecuencia e intensidad de las sequías, las olas de calor, las inundaciones, la salinidad y las heladas (Intergovernmental Panel On Climate Change, 2023).

El constante aumento de la emisión de gases de efecto invernadero, como lo son el dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O), han provocado un incremento de la temperatura media de la superficie de la Tierra, y se espera que supere el promedio entre 1,4 y 5,8 °C para finales de este siglo (Bista et al., 2018). A nivel mundial se han cuantificado los niveles de emisión de N_2O en toneladas equivalentes de dióxido de carbono desde 2001 hasta el año 2023, en donde se observa un comportamiento completamente exponencial de la cantidad de gas en la atmósfera alcanzando niveles históricos (Our World In Data, 2021).

Conforme la temperatura en el planeta Tierra experimenta un incremento, los riesgos asociados con la disponibilidad de agua dulce también se intensifican (Valverde et al., 2023). La insuficiencia de precipitaciones conlleva a la disminución de los niveles de agua en fuentes superficiales y subterráneas, lo que, a su vez, provoca la reducción de la humedad del suelo, limitando la capacidad de los organismos como las plantas de poder satisfacer sus necesidades hídricas (Seleiman et al., 2021). Se proyecta que la demanda de agua en el sector agronómico se duplicará para el año 2050, y simultáneamente se prevé que su disponibilidad disminuirá en un 50 % debido al cambio climático (Gupta et al., 2020).

La sequía ha sido señalada como uno de los principales factores causantes de las disminuciones en el rendimiento agrícola a nivel mundial, jugando un papel fundamental en la seguridad alimentaria de la población (Fàbregas et al., 2018). Se estima que en la actualidad, este escenario provoca la disminución de alrededor del 40 % de la producción mundial de productos agronómicos, mientras que a futuro, las proyecciones indican que a causa de la sequía se podría experimentar pérdidas en el rendimiento de la producción de hasta un 32 % para el año 2100, debido a los efectos combinados de la temperatura y la precipitación (Fàbregas et al., 2018; IPCC, 2023; Zandalinas et al., 2021).

Es importante señalar que tanto la sequía, el estrés térmico y la elevada concentración de CO_2 tienden a reducir la concentración de la mayoría de los nutrientes en los tejidos vegetales

como los disueltos en los suelos (Hao et al., 2018; Zandalinas et al., 2021). Recientemente, se ha documentado que el estrés causado por la sequía afecta la capacidad del mismo organismo de absorber, acumular y distribuir los nutrientes a los órganos vitales debido a que la falta de agua afecta el crecimiento de las raíces y movilidad de los nutrientes en el suelo y en los tejidos de las plantas (Bista et al., 2018; S. Li et al., 2023).

Ante este estrés hídrico, las plantas tienen la capacidad de detectar la carencia de agua y en consecuencia, desencadenar una serie de modificaciones adaptativas tanto a nivel metabólico como de expresión génica en los distintos tejidos vegetales, esto con la finalidad de sobrellevar y mitigar los efectos negativos del estrés. Aunque estos signos dependen en gran medida de si estos organismos han sido sometidos previamente a estrés o si han lidiado simultáneamente con otro tipo de estímulo abiótico (Seleiman et al., 2021). Se ha reportado que el estrés por sequía afecta negativamente a muchos procesos fisiológicos de las plantas, como la fotosíntesis y el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Iqbal et al., 2020). Una de las estrategias para optimizar los recursos hídricos disponibles es regular la apertura y cierre de los estomas, que son válvulas epidérmicas celulares en plantas fundamentalmente para el intercambio de gases (Bergmann & Sack, 2007). Este cierre estomático es mediado por la hormona ácido abscísico (ABA), lo que permite evitar los procesos de transpiración de las plantas. Como consecuencia de este proceso se observa una modificación de la conductancia estomática (g_s), alteración de la distribución de estomas y la regulación del espesor de la cera de las hojas (M. Liu et al., 2023; Seleiman et al., 2021).

Aunque la respuesta temprana del movimiento de estomas frente a la sequía puede ser conveniente para la supervivencia de las plantas en virtud de mantener un alto contenido relativo de agua (RWC, del inglés Relative Water Content) en las hojas (Z. Bian et al., 2021), esto produce una disminución de los procesos que ocurren en la fotosíntesis, limitando la absorción de CO_2 y en consecuencia, la cantidad de metabolitos sintetizados para el desarrollo de la plantas lo que puede ocasionar la muerte de la esta misma (Kaur & Asthir, 2017; Nemeskéri et al., 2019). Junto con la disminución del proceso de fotosíntesis en las plantas, también ocurre un decrecimiento tanto del área foliar como de la tasa fotosintética por unidad de área de tejido, donde la alteración de ambos parámetros se atribuye principalmente al cierre de los estomas o al deterioro metabólico (Basu et al., 2016).

Adicionalmente, los factores de estrés abiótico cambian la reflectancia de las hojas en las longitudes de onda visibles, lo que resulta en un cambio en el contenido de la clorofila de las hojas, por lo que, la actividad fotosintética se puede cuantificar indirectamente midiendo la eficiencia de los fotosistemas (PS, del inglés Photosystem) I y II mediante fluorescencia, y de la

misma forma para pigmentos fotosintéticos en las hojas. En este sentido, una de las evaluaciones más extendidas para evaluar el estado de las plantas es la eficiencia cuántica máxima de PSII (F_v'/F_m') la cual cambia según el genotipo o variedad (Ceacero et al., 2012; Nemeskéri et al., 2019; Yang et al., 2022).

Por otro lado, se ha investigado la manera en que las plantas se enfrentan a la escasez de agua, mediante la identificación de genes cuya expresión cambia en estas condiciones de déficit hídrico utilizando herramientas como la tecnología de microarreglos o el análisis de secuenciación de ácido ribonucleico (RNA-seq), permitiendo la identificación de vías del mecanismo molecular y genes clave de la respuesta de las plantas. En el caso de la planta *Arabidopsis thaliana* se han integrado la secuenciación del transcriptoma y los análisis de redes para explorar las interacciones entre las vías dependientes e independientes de ABA que responden al estrés por sequía (Cerdeira & Álvarez, 2023; Osakabe et al., 2014) y se ha documentado que la familia AREB/ABF participa en esta respuesta, principalmente AREB1, AREB2 y ABF3, han sido reportados que se encuentran regulados positivamente por ABA y el estrés hídrico (Yoshida et al., 2010).

El exceso de fertilización por nitrógeno es un problema ambiental.

La relación entre la dinámica poblacional y el cambio climático se fundamenta en la interdependencia entre el crecimiento demográfico y la demanda de recursos naturales de esta misma (Jenouvrier et al., 2022). Un incremento en la población no solo implica una mayor necesidad de alimentos, agua y energía, sino que también conlleva a un aumento en la producción industrial y agrícola, lo que a su vez contribuye a un aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero (Gupta et al., 2020). Las aproximaciones que se han realizado para las próximas décadas y finales de siglo, indican que será necesario un aumento significativo de la productividad agrícola para satisfacer las necesidades alimentarias para una cantidad aproximada de 9 mil millones de personas para el año 2050 (Giordano et al., 2021), cifra que ha seguido creciendo a un ritmo alarmante, junto con la disminución de las tierras disponibles para cultivos y la condición de sequía que enfrentan muchas zonas (Anwar et al., 2021).

En la época actual, el uso de fertilizantes en la agricultura ha experimentado un aumento notable, superando los registros históricos (Our World In Data, 2021). Estos compuestos desempeñan un papel esencial en la mejora de la productividad y rendimiento de diversos cultivos de importancia agronómica (Bian et al., 2023; Machado et al., 2021). Como consecuencia directa, se evidencia un impacto significativo tanto en la eficiencia de la actividad productiva como en la

garantía de la seguridad alimentaria para la población. Dentro de los diferentes fertilizantes contemporáneos altamente empleados, el nitrógeno es un macronutriente que compone un alto porcentaje de estos productos (Machado et al., 2023).

El nitrógeno es esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas, puesto que, este macronutriente es parte estructural para el desarrollo de procesos biológicos como la producción de biomasa, generación de aminoácidos, ácidos nucleicos, ATP, clorofila y fitohormonas (Anas et al., 2020). En ese sentido, las plantas son capaces de adquirir el nitrógeno desde el suelo principalmente en su forma inorgánica, como nitrato (NO_3), nitrito (NO_2) y amonio (NH_4).

Además de ser un nutriente, también actúa como una señal local y sistémica que regula la expresión genética, teniendo incidencia directa en la regulación fisiológica como la expansión de las hojas, morfología de las raíces, dormancia de las semillas e inducción de la floración, entre otros procesos (Hachiya & Sakakibara, 2017; X. Y. Liu et al., 2014), afectando positivamente a la fotosíntesis, el contenido de pigmentos y el tamaño, número y composición de los cloroplastos (Bassi et al., 2018). Al mismo tiempo, se ha documentado que una cantidad insuficiente de nitrógeno en las plantas puede obstaculizar la producción de los procesos descritos anteriormente (Anas et al., 2020; Luo et al., 2020; M. Wang et al., 2014). Algunos de los síntomas descritos por el déficit de nitrógeno son resultado de un metabolismo alterado, provocando una senescencia prematura y una disminución del crecimiento y, por ende, del rendimiento del cultivo vegetal (Juenger & Verslues, 2023).

A pesar de sus potenciales beneficios en el rendimiento agronómico, su utilización representa un alto costo para el medio ambiente, dado que, la fertilización excesiva es capaz de causar la lixiviación de nitratos. Esta problemática es un asunto de preocupación pública y económica, debido a su potencial de aumentar la eutrofización en los ecosistemas de agua dulce, como también ocasionar la acidificación de los suelos agrícolas e impactar en las emisiones de gases de efecto invernadero (Machado et al., 2023). El nitrógeno adicionado a los suelos fertilizados con facilidad se fuga en forma gaseosa, liberándose al medio como amoníaco y óxido nitroso. La volatilización del amoníaco influye en la formación de lluvia ácida, partículas ácidas y olores malolientes, también está indirectamente relacionada con el óxido nitroso y el calentamiento global. Asimismo, el N_2O es un potente gas de efecto invernadero y contribuye al agotamiento de la capa de ozono (Alfaro et al., 2018).

Con respecto a la eutrofización, esta es causada por compuestos nitrogenados que pueden ser arrastrados con el tiempo desde los campos agrícolas hacia cursos de agua dulce o producto de la filtración a aguas subterráneas. Este suceso aumenta la probabilidad de que los altos niveles de nitrógeno causen un crecimiento excesivo de plantas y algas en las fuentes

naturales de agua, y en consecuencia, desencadenar la muerte de animales acuáticos, contaminar fuentes de agua potable como también a los alimentos producidos (Akinshaw, 2023).

Por otro lado, la acidificación del suelo ocurre cuando el pH del suelo disminuye considerablemente, esto es consecuencia de una serie de factores como la lluvia ácida, disposición de partículas acidificantes en la atmósfera como el dióxido de azufre, amoníaco y óxido nítrico (Giordano et al., 2021). Sin embargo, las causas principales de la acidificación es la aplicación de fertilizantes a bases de nitrógeno, como el amonio y urea. Este hecho impacta en la productividad del sector agrícola, debido a la reducción de los nutrientes disponibles para estos organismos sésiles (Goulding, 2016).

A nivel molecular, estudios han reportado que las variaciones en la disponibilidad de las distintas fuentes de nitrógeno producen cambios importantes en la expresión de genes como *NIR*, *NRT* y *NIA*, lo que afecta la asimilación de aminoácidos, procesos de la fotosíntesis, fotorrespiración, desarrollo de raíces, y síntesis de proteínas (Araus et al., 2020; Machado et al., 2023). En *Arabidopsis thaliana* se ha determinado que genes de la vía de señalización y asimilación del nitrógeno participan en la resistencia a la sequía, lo que sugiere que los cambios en los niveles de nitrógeno podrían afectar la capacidad de las plantas para resistir el déficit hídrico (Osakabe et al., 2014). Por lo tanto, entender cómo las plantas perciben y responden a las variaciones en los niveles y formas de nitrógeno es crucial para comprender su adaptación a situaciones de estrés hídrico, mejorar la productividad y la resistencia de los cultivos de interés agronómico en condiciones de cambio climático como es el tomate.

El tomate es un cultivo de interés agronómico.

La familia *Solanaceae* comprende entre 1.000 y 2.000 especies que muestran una amplia variabilidad morfológica, incluyendo una serie de cultivos de hortalizas, frutales, tubérculos e incluso plantas ornamentales (Aoki et al., 2010). El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es miembro de esta familia y es considerado como uno de los cultivos de mayor relevancia económica tanto a nivel mundial como en Chile. Debido a su alto consumo, se estima que la producción mundial de tomate fresco alcanza los 182.2 millones de toneladas al año, es decir, tres veces más que la cosecha de papas y seis veces más que el arroz (Machado et al., 2021). Según la base de datos FAOSTAT, en el año 2020 se cosecharon alrededor de 251.687.023 toneladas de tomates en 6.163.463 hectáreas en todo el mundo, con un rendimiento promedio de 40,84 toneladas/ha (Roşca et al., 2023). El alto nivel de demanda es atribuible al fruto, puesto que, posee tanto en su forma fresca como procesada un valor nutricional que puede variar dependiendo de la variedad

y grado de madurez, pero en su conjunto se caracteriza por un alto contenido de las vitaminas A y C, como compuestos antioxidantes como el licopeno y carotenoides (Nasir et al., 2015).

La producción de los tomates modernos requiere de grandes cantidades de agua, ya que, se trata de un cultivo sensible al déficit (Pirone et al., 2023). Estudios han evaluado los efectos de la sequía en diferentes etapas de desarrollo de esta planta, desde la germinación hasta la reproducción, utilizando enfoques convencionales y moleculares, y se ha observado que frente a este estrés, se ven afectados los procesos como la germinación de las semillas, el desarrollo y el rendimiento de la planta (Ruggiero et al., 2022).

Adicionalmente, se han analizado las respuestas del cultivo frente a diversas estrategias de riego, textura del suelo y manejo de la aplicación de nitrógeno, colocando especial atención en el rendimiento de los frutos y se reporta que al disminuir el aporte de nitrógeno, a la vez baja el desperdicio del fertilizante aunque el rendimiento y calidad del tomate decrece, en comparación con la aplicación tradicional de nitrógeno (Cheng et al., 2021).

Interacción de las señales de nitrógeno y sequía.

A pesar de la existencia de documentación que respalda la noción de que la sequía y el déficit de nitrógeno son dos de los factores más limitantes del crecimiento de los cultivos, sólo unos pocos estudios han explorado cómo la disponibilidad de nitrógeno influye en la respuesta de las plantas frente a un estrés hídrico, en un cultivo relevante para la economía de Chile y el mundo como lo es el tomate (Machado et al., 2021, 2023).

Como se ha expuesto con anterioridad el agua, al igual que el nitrógeno es muy importante para el crecimiento y la productividad de las plantas. Generalmente, el estrés por sequía afecta la absorción y el transporte de nitrógeno a las partes aéreas de la planta porque disminuye la tasa de transpiración y la permeabilidad de la membrana (Iqbal et al., 2020; Z. Z. Xu & Zhou, 2006). Otra razón de la limitación del transporte y metabolismo del nitrógeno es que tanto el nitrato como el amonio necesitan agua para ser absorbidos y translocados a las partes aéreas de la planta para su metabolismo (Xiong et al., 2018). La regulación del metabolismo del nitrógeno es muy importante para la tolerancia al estrés de las plantas, ya que la mayoría de los procesos fisiológicos de las plantas están asociados con ella (Lawlor, 2001).

Hasta el momento se ha reportado que genes asociados con el transporte, reducción y asimilación de nitrato están regulados de manera positiva por el nitrato, mientras que, estos mismos se encuentran regulados negativamente en respuesta a la sequía (Cerdeira & Álvarez, 2023).

HIPÓTESIS

Cambios en la disponibilidad de nitrógeno afectan la resistencia de *Solanum lycopersicum* L. frente a la condición de sequía mediante variaciones en la expresión de genes en el tejido aéreo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de niveles contrastantes de nitrógeno en la expresión de genes y la respuesta fenotípica en el tejido aéreo de *Solanum lycopersicum* L. frente a la condición de sequía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de dosis contrastantes del nitrógeno en la respuesta fisiológica de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker frente a sequía en el tiempo.
2. Evaluar el efecto de la dosis de nitrógeno en la expresión de genes marcadores de respuesta al estrés hídrico en *Solanum lycopersicum* L cv. Moneymaker.
3. Identificar cambios en la expresión genética global y los procesos biológicos involucrados en la adaptación a la sequía de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker frente a dosis contrastantes de nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

OE 1. Determinar el efecto de dosis contrastantes del nitrógeno en la respuesta fisiológica durante estadios tempranos de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker frente a sequía en el tiempo.

1.1. Ensayo en placas con suplementación de nitrógeno.

Con el propósito de evaluar el impacto de la concentración de nitrógeno en términos de biomasa del tejido aéreo en las plantas de tomate, se realizaron cuatro réplicas técnicas del ensayo. Utilizando placas Petri cuadradas con dimensiones 120 x 120 mm y un medio suplementado con una fuente de nitrógeno en un formato biodisponible para las plantas como el nitrato de potasio. Para esto, se propuso evaluar seis concentraciones diferentes para observar y establecer el efecto en la biomasa, empleando el compuesto químico KNO_3 como la fuente de nitrógeno, a continuación, se detallan las concentraciones empleadas: 0 mM, 0,5 mM; 1 mM, 5 mM; 10 mM y 20 mM. Estas concentraciones fueron escogidas según lo reportado con anterioridad (Bian et al., 2023; Li et al., 2023; Machado et al., 2023; Vega et al., 2015).

Para la esterilización de las semillas de tomate cv. Moneymaker se siguió el protocolo establecido por el laboratorio, en donde se requirió de la preparación de una solución constituida por hipoclorito de sodio diluido al 2,5 % (Clorinda, Cloro Concentrado al 5 %) y la solución detergente, Triton X-100 (Bio-Rad Laboratories Inc., #1610407) al 10 %. El total de semillas a utilizar fueron sometidas durante 20 minutos a esta preparación, seguido de tres lavados con agua estéril.

Paralelamente a la esterilización de las semillas, fue necesaria la preparación de medios de germinación constituidos por una versión modificada del medio Murashige & Skoog (MS) que carece de nitrógeno (PhytoTech Labs Inc., #M531). Se preparó un medio MS $\frac{1}{2}$ sin nitrógeno utilizando un 0,78 % (m/v) de este componente, junto con D-Sacarosa (PhytoTech Labs Inc., #S391) al 1 % (m/v), MES (PhytoTech Labs Inc., # M825) al 0,05 % (m/v) y Agar (Agar, Plant TC Micropropagation Grade, PhytoTech Labs Inc., #A296) al 0,5 % (m/v), con un pH ajustado a 5,8. Una vez preparado, este fue esterilizado mediante autoclave, y posteriormente, a cada placa de Petri se le añadió un volumen de 50 mL de medio de germinación y una porción de una solución stock de KNO_3 a 1 M hasta alcanzar las concentraciones establecidas: 0 mM, 0,5 mM; 1 mM, 5 mM; 10 mM y 20 mM.

Una vez finalizado lo anterior, se procedió a la siembra en las placas Petri mediante la utilización de pinzas metálicas estériles para transferir cuidadosamente cinco semillas a cada una de las placas, con un total de 15 réplicas biológicas por tratamiento.

Cada una de las réplicas técnicas ($n = 3$) realizadas en estas placas permanecieron verticalmente al interior de una cámara de crecimiento (Refrigerador 19, Pi Tecnología) con la finalidad de garantizar un entorno adecuado para el crecimiento de las plantas, además se mantuvo un fotoperíodo constante de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura promedio de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa (HR) del $60\% \pm 10\%$ y con una intensidad lumínica (PAR) de $100\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s} \pm 20\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ durante por lo menos 14 días (Leiva-Ampuero et al., 2020; Vega et al., 2015).

Al concluir el tiempo establecido, se procedió a determinar el peso de cada uno de los brotes en función del tratamiento de KNO_3 aplicado, descartando por completo las raíces de las plantas. La cuantificación de la biomasa se realizó utilizando una balanza analítica (grado de sensibilidad igual a 0,0001 g). En primer lugar, se separó los brotes de la raíz y se registró rápidamente el peso fresco de cada uno, a continuación, estos fueron almacenados por 7 días dentro de una estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se evaluó y se registró el peso seco resultante de cada uno de los brotes en base a su respectiva concentración de nitrato.

1.2. *Ensayo de sequía:nitrógeno en sustrato.*

Las semillas de tomate cv. Moneymaker fueron sometidas a un proceso de esterilización y posteriormente fueron sembradas en placas utilizando el medio detallado en la sección anterior. Pasados los 10 días, las plántulas fueron transferidas a maceteros (vasos plásticos de 250 mL) los cuales en su interior contenían 200 g de sustrato inerte, compuesto por arena de Lampa y arcilla de Catemú (Humus Chile) en una proporción de 4:1, en donde permanecieron durante 21 días adicionales hasta alcanzar el desarrollo del tercer par de hojas verdaderas. Este sustrato fue utilizado ya que ambos componentes, tanto la arena como la arcilla, son sustratos empleados para el cultivo de plantas que tienen la capacidad de retener agua, además de ser químicamente inertes lo que favorece la observación específica de la respuesta de las plantas minimizando las influencias externas en el experimento (Juenger & Verslues, 2023; Wahb-Allah et al., 2011).

Como se observa en la **Figura 1**, de manera paralela al proceso de transferencia de las plantas, la mezcla de sustrato fue tratado con 50 mL de un medio líquido compuesto por MS $\frac{1}{2}$ modificado sin nitrógeno; 0,25 % de D-Sacarosa; MES al 0,05 %, con un pH igual a 5,8 y una

concentración de 1 mM de nitrato. Además, se registró el peso inicial y final de cada uno de los maceteros, considerando todos los componentes por separado.

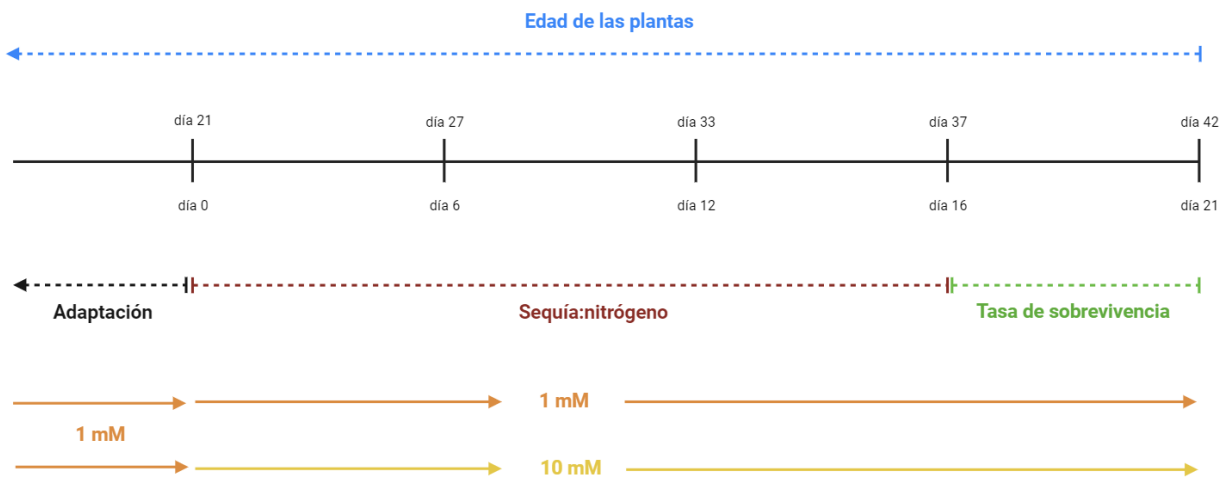


Figura 1. Diseño experimental para la evaluación del desarrollo de plantas de tomate bajo diferentes condiciones. La línea segmentada de color azul representa la progresión en días de la edad de las plantas, mientras que, la línea discontinua de color rojo corresponde a la cronología del ensayo de sequía y las evaluaciones correspondientes.

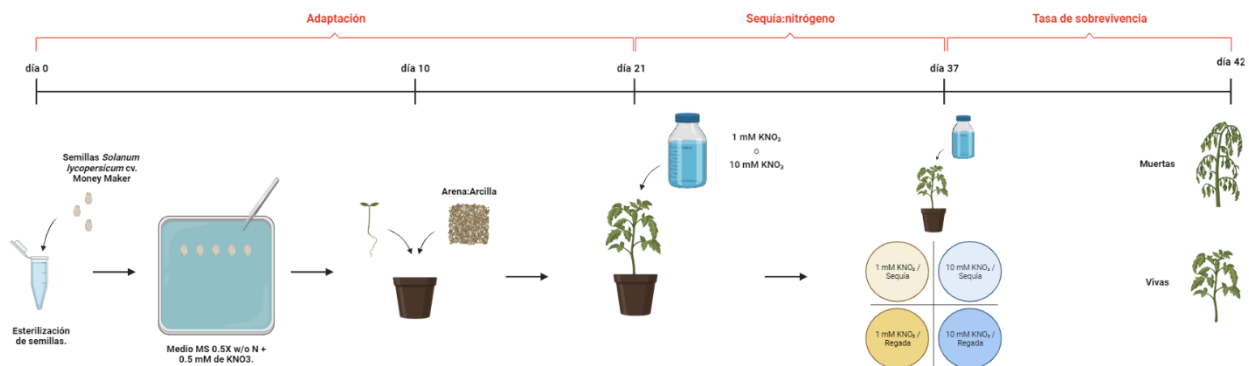


Figura 2. Metodología desarrollada para la ejecución del ensayo sequía:nitrógeno El proceso comprende de la preparación del sustrato de cultivo, esterilización de materiales, siembra de las semillas y el seguimiento del crecimiento de las plantas hasta los intervalos de tiempo específicos.

A lo largo de los 21 días de esta fase de adaptación, los cuales precedieron a la implementación del período de sequía, las plantas permanecieron aisladas en carpas *indoor* y al interior de bandejas de germinación planas con cúpulas altas con luces LED de tipo *full spectrum*

con una intensidad lumínica igual a $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s} \pm 20 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$, una temperatura controlada de $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $50 \% \pm 10 \%$. Al mismo tiempo, se mantuvieron con un régimen de riego exclusivamente con agua destilada teniendo como límite el peso final registrado de cada uno de los maceteros, lo que permitió que las plantas continuaran con su crecimiento.

Transcurrido este tiempo, se les administró a algunas plantas una nueva dosis de KNO_3 con el propósito de ajustar la concentración de nitrato a 10 mM de KNO_3 , mientras que, el otro grupo de plantas que se encuentran a 1 mM solo les añade agua destilada. Una vez que se dispone de ambas concentraciones contrastantes antes de iniciar la sequía, ya que, se busca evaluar el efecto inmediato del nitrógeno en las plantas frente a la sequía.

Cada uno de los ensayos realizados, cuatro réplicas técnicas, que combinó la sequía con ambos niveles de nitrógeno. El tratamiento de sequía consistió en limitar el riego por completo por 16 días, mientras que, el tratamiento considerado como control las plantas fueron constantemente regadas durante el desarrollo del experimento, tal y como se ilustra en la **Figura 2**.

El propósito de este proceso experimental es comprender cómo las plantas responden a la sequía en función de las concentraciones de nitrato en el sustrato, específicamente en el tejido aéreo, lo que puede proporcionar información valiosa sobre la adaptación y la respuesta de las plantas a condiciones de estrés hídrico que es una señal negativa y una condición nutricional variable.

Adicionalmente, con el objetivo de mejorar y facilitar la comprensión de la información subsecuente, nos referiremos a la dosis de 1 mM KNO_3 como la condición bajo nitrato o en su forma abreviada LN, proveniente de la frase en inglés Low Nitrate. Por otro lado, la dosis de 10 mM KNO_3 será designada como la condición de alto nitrato, abreviada en ocasiones como HN que proviene del inglés High Nitrate. Del mismo modo, aquellas plantas sometidas a una condición de déficit hídrico serán denominadas como Drought o en su forma abreviada D, mientras que, frente a una condición de riego constante se utilizará en momentos la palabra en inglés Well-water o su abreviación WW. De igual forma, para referirse a la condición de suplementación de nitrógeno, sin importar la dosis se utilizará la abreviación N.

1.3. Evaluación del contenido volumétrico de agua.

Para todas las combinaciones de tratamientos aplicados a las plantas de tomate cv. Moneymaker, se mantuvo un constante monitoreo del contenido volumétrico del suelo durante la extensión de todo el experimento. Este seguimiento se llevó a cabo a través de un registro diario

del peso de los maceteros que albergaban a las plantas en cada condición, aquellas plantas en condición de sequía o Drought solo se registró el peso, mientras que, bajo la condición de regado o Well-water se mantuvo un régimen de riego constante. Esto brinda información para comprender la disponibilidad hídrica a la que estuvieron expuestas las plantas, al mismo tiempo, establecer los niveles de intensidad del déficit de agua inducido por el tratamiento de sequía (Edwards et al., 2016; Fàbregas et al., 2018; Viger et al., 2016; Yan et al., 2023).

1.4. Mediciones de parámetros fisiológicos.

En el caso de las mediciones fisiológicas, el equipo MultispeQ v2.0 (PhotosynQ Inc., <http://www.photosynq.org>) despliega una serie de parámetros que permiten evaluar el estado fisiológico de las plantas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parámetros medidos por el dispositivo MultispeQ para la caracterización fisiológica de las plantas, información adquirida directamente de Kramer et al., 2003.

Parámetro	Función
Fv/Fm'	Medición de la eficiencia cuántica potencial del fotosistema II.
SPAD	Evaluar el contenido relativo de clorofila.
Phi2	Estimar el rendimiento cuántico del fotosistema II, corresponde al porcentaje de luz entrante que ingresa al fotosistema.
PhiNO	Relación de la luz entrante que se pierde mediante procesos no regulados cuyos subproductos pueden inhibir la fotosíntesis o ser perjudiciales para la planta.
PhiNPQ	Relación de la luz entrante que es regulada en forma de calor, reduciendo los daños en las plantas.
Leaf Temperature	Registro de la temperatura específica de las hojas.

Paralelamente, se realizaron evaluaciones complementarias con la finalidad de determinar el estado de las plantas utilizando el equipo especializado denominado analizador de gases infrarrojo (IRGA CI-340 portátil, CID Bio-Science Inc.).

Tabla 2. Descripción de los parámetros fisiológicos asociados a la fotosíntesis y respiración de las plantas mediante la utilización del equipo IRGA. Información recopilada directamente de (Edwards et al., 2016)

Parámetro	Función
gs	Tasa de la conductancia estomática.
E	Tasa de transpiración.

1.4.1. Utilización de equipos.

En el marco de los criterios establecidos para la evaluación de la condición de estrés de las plantas, se determinaron parámetros cruciales (**Tabla 1**) y al mismo tiempo, se evaluó la conductancia estomática (g_s) y tasa de transpiración (E) de los folíolos de los tratamientos aplicados (**Tabla 2**). Además, se definió como estrategia la medición de tres folíolos independientes de las hojas intermedias por cada planta y tratamiento. Con el objetivo de realizar una evaluación representativa y confiable utilizando ambos dispositivos, fue necesario disponer de tejido foliar de las plantas de tomate cv. Moneymaker de un tamaño mínimo de 1 cm² aproximadamente (PhotosynQ).

Los parámetros como SPAD, temperatura de las hojas y F_v'/F_m' fueron evaluados utilizando un dispositivo portátil que integra las funciones de un fluorómetro y espectrofotómetro, MultispeQ que se encuentra ligado a la plataforma web PhotosynQ, en donde se descargaron los datos para su posterior análisis (**Figura 3**). Para estas mediciones se tomó en consideración el criterio de selección de los folíolos y las mediciones se llevaron a cabo a las 10 a.m. todos los días a partir del inicio del proceso de sequía en las plantas, cabe señalar que se evaluaron los distintos tratamientos existentes (Baker, 2008; Ben-Jabeur et al., 2021; Fernández-Calleja et al., 2020; Jia et al., 2019; Kalaji et al., 2016; Kanazawa et al., 2021; Kramer et al., 2003; Kuhlert et al., 2016; Yang et al., 2022).

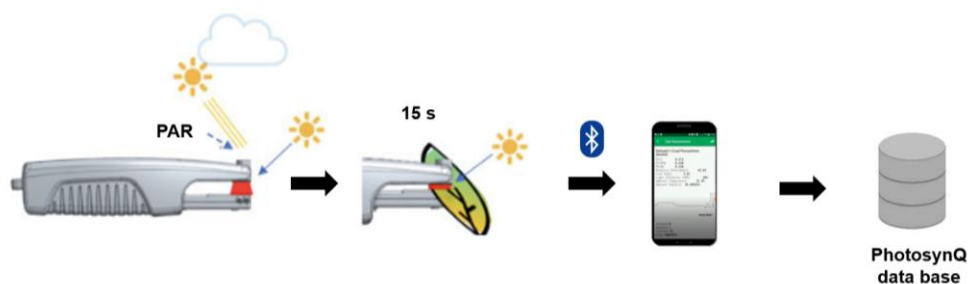


Figura 1. Método experimental empleado para la medición y captura de los datos. Se detalla la manipulación del dispositivo durante las mediciones para la determinación del estado fisiológico de las plantas. Figura modificada de Kanazawa et al., 2021 y Fernández-Calleja et al., 2020.

Por otro lado, tanto para la medición de la conductancia estomática como la tasa de transpiración fueron realizadas mediante la utilización de un instrumento que basado en espectroscopia infrarroja, mide las concentraciones de CO₂ y H₂O al interior de una cámara de intercambio gaseoso en donde localiza la hoja o folíolo a evaluar, manteniendo una atmósfera controlada durante las mediciones (Edwards et al., 2016; Jia et al., 2019; Jiménez-Arias et al., 2023; Mihalache et al., 2020; Useche-Carrillo et al., 2022). Para simular una condición ambiental convencional en relación con la concentración de CO₂ disponible en la atmósfera se utilizó una cantidad de 400 ppm en cada medición realizada, un PAR 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s} \pm 20 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ y un tiempo de medición de 15 s por cada folíolo analizado. Por cada folíolo se repitió la medición al menos cinco veces, con la finalidad de reducir el error entre cada medición.

1.5. *Medición estomática de tejido foliar.*

Para la determinación del índice y densidad estomática de las hojas de las plantas de tomate bajo los distintos tratamientos contrastantes de KNO₃, se recolectaron tres folíolos de hojas independientes por cada una de las plantas. Para realizar las impresiones de la zona abaxial de los folíolos fue necesaria la utilización de una resina dental de secado rápido (3M™, #7301) para crear una impresión negativa (Geisler et al., 2000), que a su vez fue utilizado como molde para luego aplicar una capa delgada del esmalte de uñas transparente por encima de este, dejándose secar por 15 minutos (Delgado et al., 2011; Hasanagić et al., 2020; Morales-Navarro et al., 2018), con el objetivo de obtener una copia lo más parecida del envés del folíolo. Apenas el esmalte se encontraba seco, se cubrió con cinta adhesiva transparente para retirar la capa y así poder pegarla sobre un portaobjeto para facilitar la visualización mediante la utilización de un microscopio óptico (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems), empleándose un aumento objetivo igual a 40X y uno ocular de 10X para la captura de las imágenes y posterior evaluación.

En cuanto al análisis de la densidad estomática (DE) se utilizó la misma capa de esmalte y se estableció como criterio la revisión de seis campos ópticos capturados por folíolo utilizando el software LAS EZ (Leica Microsystems), procurando que por cada campo existiera una cantidad considerable de estomas para su cuantificación. Para contabilizar el número de estomas por campo se empleó el software ImageJ (González, 2018), en donde se utilizó el plugin *Analyze Particules* para identificar y cuantificar estomas en cada campo óptico, se estableció un umbral de tamaño mínimo para los estomas y de manera simultánea se empleó la herramienta *Multi-point* para contar manualmente (González, 2018; Sakoda et al., 2020). Una vez realizado lo

anterior, se midió el diámetro en milímetros del campo óptico a 40X, con el propósito de calcular el área mediante la aplicación de la **Fórmula 1** y, junto con la ayuda de una cámara de Neubauer.

$$(1) \text{Área (cuadrado)} = a^2$$

$$(2) \text{Densidad estomática} = \frac{\text{número de estomas por campo óptico}}{\text{área del campo óptico}}$$

Luego, el número de estomas por campo óptico de cada muestra se dividió por el área del campo óptico (**Fórmula 2**) para obtener la densidad en estomas por milímetro cuadrado (estomas/mm²). Los resultados por cada uno de los tratamientos fueron registrados, para cada uno de los días establecidos previamente para la realización de las evaluaciones.

Con respecto a las mediciones del índice estomático se utilizaron las mismas fotografías capturadas previamente de las capas de esmalte transparente, y mediante la utilización de la herramienta ImageJ. Para establecer la escala de medición se capturó una fotografía mediante la utilización del mismo microscopio óptico a una cámara de Neubauer empleando un lente objetivo de 40X. Con la finalidad de tener una cantidad representativa de cada captura se evaluaron cinco estomas escogidos de forma aleatoria por cada fotografía, registrando los valores del alto y ancho de cada una de las células de guarda.

1.6. Mediciones del contenido relativo de agua.

La medición del contenido relativo de agua (RWC) en hojas es un procedimiento que permite evaluar la condición hídrica de las plantas sometidas principalmente a condiciones de sequía, dado que, ilustra la cantidad de agua en una hoja en el momento del muestreo en relación con el agua máxima que puede retener (Fàbregas et al., 2018; Salinas-Cornejo et al., 2021).

El criterio de selección para las evaluaciones se basó en la elección de hojas intermedias, específicamente, se optó por los folíolos centrales con el propósito de asegurar una evaluación del tejido de manera uniforme en términos de fisiología. Se recolectaron dos folíolos por cada hoja y se registró inmediatamente el peso fresco de cada uno de los folíolos mediante la utilización de una balanza analítica, luego se sumergieron en agua destilada durante dos horas para que alcancen su máxima hidratación y nuevamente, se registró su masa como el peso de turgencia. Posteriormente, cada folíolo fue sometido a un proceso de secado dentro de una estufa a una temperatura del 80 °C ± 5 °C por siete días continuos. Completo lo anterior, se utilizó la **Fórmula**

3 para la obtención del contenido relativo de agua de las hojas de los distintos tratamientos (Fàbregas et al., 2018; M. Liu et al., 2023; Pirona et al., 2023; Ruggiero et al., 2022).

$$(3) RWC (\%) = \left[\frac{(Peso Fresco - Peso Seco)}{(Peso Turgencia - Peso Seco)} \right] \times 100$$

1.7. Tasa de sobrevivencia.

Con el propósito de evidenciar cuál tratamiento con nitrato propiciaba a una mayor tasa de supervivencia de las plantas sometidas a este período de escasez hídrica, se procedió a la cuantificación del número de plantas que permanecían con vida y aquellas que habían sucumbido frente al estrés hídrico al día 16 (**Fórmula 4**).

$$(4) Tasa de sobrevivencia (\%) = \left(\frac{Número de plantas vivas}{Número total de plantas} \right) \times 100$$

Una vez registrado el número de sobrevivientes, se procedió a restablecer el volumen de agua inicial de cada macetero y en todos los tratamientos. Transcurridos 5 días, se cuantificó nuevamente la tasa de sobrevivencia de las plantas (Fàbregas et al., 2018). Para ambos días, tanto el día 16 como el día 21 fueron graficados para luego comparar la tasa de sobrevivencia absoluta (**Figura 4**).

Como criterio de selección se estableció que la pérdida de turgencia de la planta no era suficiente evidencia para establecer la muerte de la planta, por lo que, además se consideró otros signos morfológicos como el grado de marchitez de las hojas, flacidez, enrollamiento de los folíolos, clorosis y limitación de la expansión foliar (Anjum et al., 2011; Florido Bacallao & Bao Fundadora, 2014; Seleiman et al., 2021).

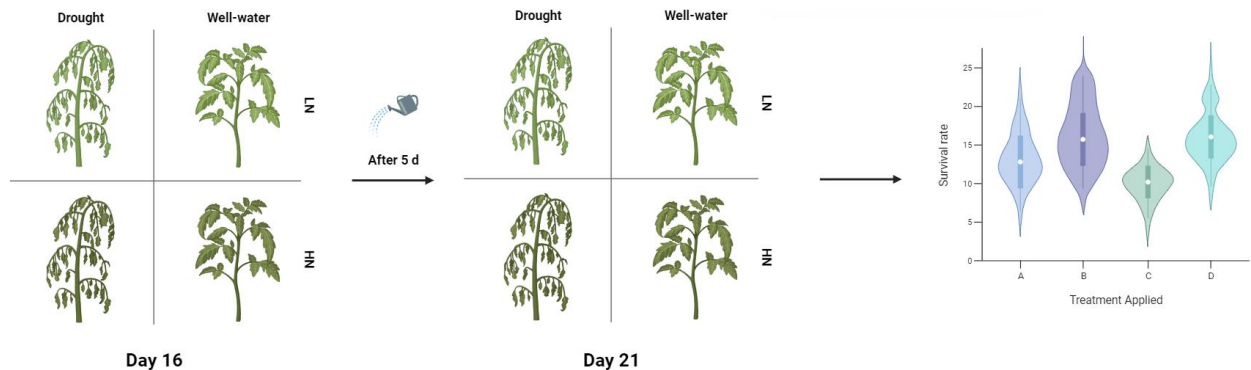


Figura 4. Diseño experimental representativo de la evaluación de la tasa de supervivencia de las plantas bajo los distintos tratamientos. Se evaluó el número total de plantas sobrevivientes al déficit crítico de agua en el día 16, luego del proceso de rehidratación se contabilizó nuevamente.

1.8. *Cuantificación de biomasa.*

Con la finalidad de evaluar el impacto de ambas variables en el tamaño y en el crecimiento de las plantas de tomate, se estableció la medición del peso del tejido aéreo de las plantas en las diferentes etapas del experimento mediante la utilización de una balanza analítica, desde el inicio del período de sequía utilizando el mismo intervalo de días establecidos para las demás mediciones. Esto proporciona información relevante sobre cómo las plantas dependiendo de sus tratamientos responden a la combinación de suplementación con nitrato y la disponibilidad de agua, ofreciendo información para comprender los mecanismos de respuesta a nivel fisiológico (Yan et al., 2023).

1.9. *Análisis estadístico.*

Con la finalidad de evaluar las posibles diferencias significativas entre los distintos tratamientos en relación con los parámetros fisiológicos, se escogió la prueba *t-Student* que es útil para comparar las medias de dos grupos independientes y asume la normalidad en la distribución de los datos. La obtención de un p-value se ajustaron mediante el método Bonferroni, el cual controla el nivel de confianza simultáneo para testeos múltiples, la obtención de valores menores a 0,05 fue interpretado como la existencia de evidencia suficiente para considerar la diferencia estadística significativa entre las muestras comparadas.

OE 2. Evaluar el efecto de la dosis de nitrógeno en la expresión de genes marcadores de respuesta a estrés hídrico en *Solanum lycopersicum* L cv. Moneymaker.

2.1. Extracción de tejido.

Una vez iniciado el experimento que involucra de manera simultánea el déficit sostenido de agua y dosis contrastantes de nitrato, se estableció como estrategia la recolección de tejido foliar de los distintos tratamientos específicamente en el día 6. Esto con el propósito de efectuar extracciones de RNA y posteriormente, realizar un análisis de la expresión de genes.

Cabe destacar que se recolectaron tres folíolos de cada planta, provenientes de hojas diferentes de la zona media de estas mismas, como se ilustra en la **Figura 4**. Esta elección estuvo dada con el fin de asegurar una amplia representatividad de la condición de los tomates, y así comprender los efectos de los tratamientos aplicados en una población de organismos. Luego de la extracción de tejido, los folíolos fueron almacenados a una temperatura de - 80 °C, con la finalidad de garantizar su conservación hasta su utilización en fases posteriores del estudio.

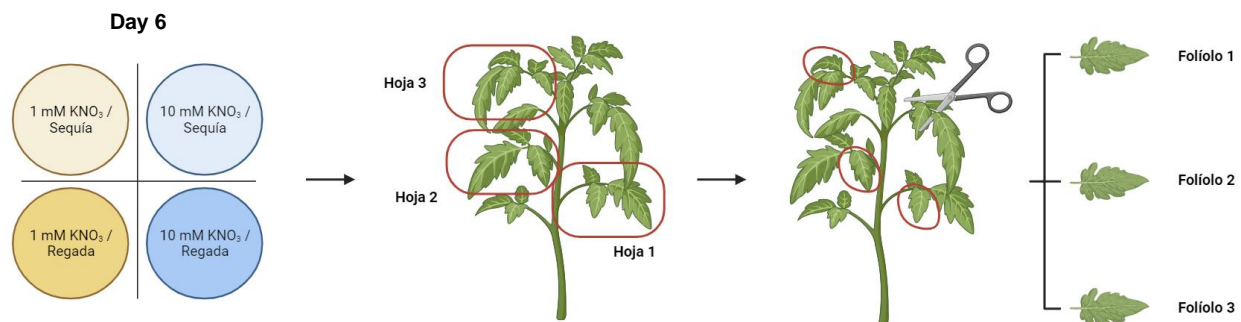


Figura 5. Diseño experimental establecido para la selección y extracción de tejido foliar proveniente de plantas de tomate bajo los diferentes tratamientos planteados.

2.2. Procesamiento de muestras.

Para llevar a cabo el proceso de extracción de RNA, en primera instancia, fue necesario disgregar el tejido foliar utilizando el equipo TissueLyser II (QIAGEN) mediante una agitación a alta velocidad en tubos Eppendorf de 1,5 mL con perlas de acero inoxidable en su interior a una frecuencia de 1/30 s durante 1 minuto, utilizando los adaptadores del equipo a una temperatura aproximada de - 80 °C.

Una vez completada la molienda del tejido, se procedió a realizar la extracción de RNA mediante la utilización del kit de extracción de RNA (PureLink™ RNA Mini Kit, Invitrogen, #15596018), siguiendo los procedimientos establecidos por el fabricante. Inicialmente, se preparó un Buffer de Lisis compuesto por 1 mL de Lysis Buffer y 10 µL de β-ME (Bio-Rad, #1610710), considerando la adición de 500 µL a cada muestra ya con el tejido lisado. Posteriormente, se realizó la incubación de 3 minutos a temperatura ambiente de este tejido en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL tras la utilización de un vórtex, seguido de una centrifugación de 2 minutos a 12.000 g de igual manera a temperatura ambiente.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf evitando el contacto con el pellet, se incorporaron 500 µL de etanol absoluto al 70 % (ThermoFisher Scientific, #A4094) a cada tubo por separado, seguida de una agitación mediante un vórtex para dispersar cualquier tipo de precipitado. El volumen se transfirió a una columna de Spin Cartridge proporcionada por el mismo kit, luego, se centrifugó descartando el sobrenadante y se volvió a insertar la columna en el mismo tubo de recolección.

Se añadieron 700 µL de Buffer Wash I y se centrifugó durante 15 segundos, descartando de igual manera el sobrenadante y se realizó el mismo procedimiento con el Buffer Wash II a diferencia que solo se añadieron 500 µL de este componente.

La etapa final de este protocolo culminó con una centrifugación durante 2 minutos a 12.000 g para secar la membrana que contiene el RNA, a continuación, se insertó la Spin Cartridge en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL sin tapa y se incorporó un volumen 20 µL de agua libre de nucleasas (Invitrogen, #AM9932) directamente al centro de la membrana. Tras una incubación de 1 minuto, se realizó una centrifugación de 2 minutos a 12.000 g para eluir completamente el RNA en el tubo, repitiendo este proceso una vez más con el objetivo de obtener un mayor rendimiento de RNA obtenido.

Para la evaluación de la concentración y nivel de pureza de las muestras obtenidas se utilizó el equipo NanoDrop (Thermo Scientific™, modelo NanoDrop™ 2000), como criterio se estimó que aquellas muestras que estuvieran dentro del rango óptimo entre a 1,8 hasta 2,1 de la razón A260/A280, serían aquellas muestras con una pureza adecuada.

Mientras que, la integridad se determinó mediante el uso del equipo Fragment Analyzer™ (Agilent Technologies) utilizando dos tipos de geles: SS gel y HS gel, dependiendo de la concentración de las muestras. En este caso, de la integridad de las muestras se estableció como parámetro de calidad el indicador RQN, teniendo como rango aceptable aquellas muestras dentro del rango de 7,0 a 10,0.

Validadas las distintas muestras por ambos procesos, se enviaron las muestras a la empresa Novogene (Novogene Co, Ltd.) en donde se prepararon las librerías para la realización de la secuenciación del RNA mensajero (RNA-seq).

2.3. Procesamiento de datos de expresión génica.

Una vez descargados los datos crudos, se empleó el programa *FastQC* (versión 0.12.0) descargado directamente del sitio web Babraham Bioinformatics (Andrews, 2010; Zhao et al., 2021). Una vez comprobado que los datos de secuenciación presentan una buena calidad, se procedió a quitar los adaptadores unidos a los extremos de las lecturas o *reads* secuenciados, lecturas demasiado cortas y bases con baja calidad mediante el software *TrimGalore* (versión 0.6.5) proveniente de igual manera de Babraham Bioinformatics (Krueger et al., 2023, Liao & Shi, 2020). Una vez procesados estos datos se llevó a cabo un pseudo alineamiento mediante la aplicación del programa *kallisto* (versión 0.46.1, <https://pachterlab.github.io>) una herramienta eficiente a nivel computacional (Bray et al., 2016), el cual cuantifica la abundancia de los transcritos contra el transcriptoma de referencia, en este caso se empleó SL3.0 cv. Heinz 1706 (EnsemblPlants, <https://plants.ensembl.org>) lo que resultó en una tabla con el número de lecturas para cada transcrito (Kim & Daadi, 2019; Y. Zhao et al., 2021). Finalmente, la abundancia de transcritos fue importada a R y se empleó paquete *tximport* (versión 3.18) que tiene como función sintetizar el nivel de abundancia de los transcritos a nivel de genes.



Figura 6. Flujo de trabajo para el análisis de los datos crudos de RNA-seq. Cada uno de los bloques representa los procedimientos realizados para el análisis, mientras que, en la parte inferior de los recuadros se detallan las herramientas empleadas para cumplir el objetivo.

2.4. Búsqueda de cambios en los patrones de expresión génica.

Sobre la base de la tabla de cuentas de transcritos por gen, se utilizó el paquete *DESeq2* (versión 1.43.1) en R, el cual permite la normalización y el análisis de la expresión diferencial de perfiles de expresión de RNA-seq considerando el número de replicas biológicas y utiliza la normalización por medianas. Se evaluaron los niveles de expresión de genes marcadores para las distintas condiciones experimentales, en primer lugar, frente a la respuesta de N (Cerdeira & Álvarez, 2023) y simultáneamente, se seleccionaron genes involucrados en las vías señalización del ácido abscísico (ABA), los cuales han sido registrados en la base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource) (García-Hernández et al., 2002; Rhee et al., 2003).

OE 3. Identificar cambios en la expresión genética global y procesos biológicos involucrados en la adaptación a la sequía de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker frente a dosis contrastantes de nitrógeno.

3.1. Análisis de los datos transcriptómicos.

Se realizó una comparación entre las condiciones experimentales mediante la utilización de *DESeq2* en R, para identificar los genes regulados. El paquete implementa una metodología estadística basada en la distribución binomial negativa para identificar genes significativamente regulados (Love et al., 2014). Se obtuvo así una lista de genes cuya expresión varía significativamente entre las diferentes condiciones experimentales planteadas (D vs. WW en LN, D vs. WW en HN, HN vs. LN en D y HN vs. LN en WW), empleando un p-adj de $< 0,05$ y un valor mínimo de fold change igual a 2 (\log_2 (Fold change) < 1).

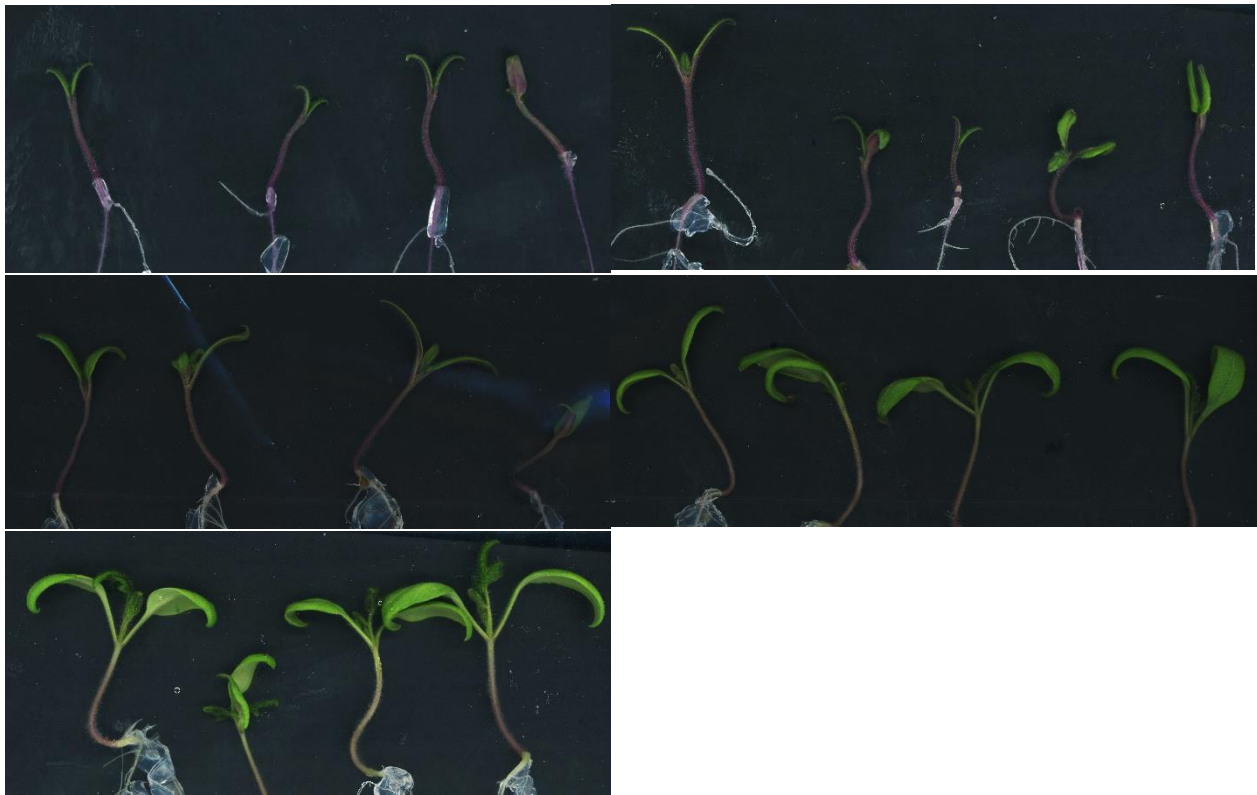
Estas listas fueron separadas en genes inducidos y reprimidos en las diferentes condiciones. A partir de los genes sobrerrepresentados según las listas y se utilizó el paquete *GOstats* (Bioconductor, versión 3.18) junto con la anotación de los términos GO provenientes de la base de datos AgriGO (AgriGO 981, versión 2.0) para *Solanum lycopersicum*, y se buscaron las funciones sobrerrepresentadas de cada lista, lo que proporcionó información a la función biológica de aquellos genes diferencialmente expresados en el organismo *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker bajo las distintas condiciones (Tian et al., 2017).

RESULTADOS

OE 1. Determinar el efecto de dosis contrastantes del nitrógeno en la respuesta fisiológica durante estadios tempranos de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker frente a sequía en el tiempo.

1.1. El desarrollo de biomasa depende de la dosis de nitrógeno aplicada.

A partir de la utilización de las diferentes concentraciones de KNO_3 se aprecia una relación entre el tamaño de la biomasa de los brotes y las dosis aplicadas (**Figura 6A, 6B, 6C, 6D y 6E**). Las plantas fueron sometidas durante 14 días en este tratamiento, desde la germinación hasta su desarrollo y aparición de los cotiledones al interior de placas Petri.



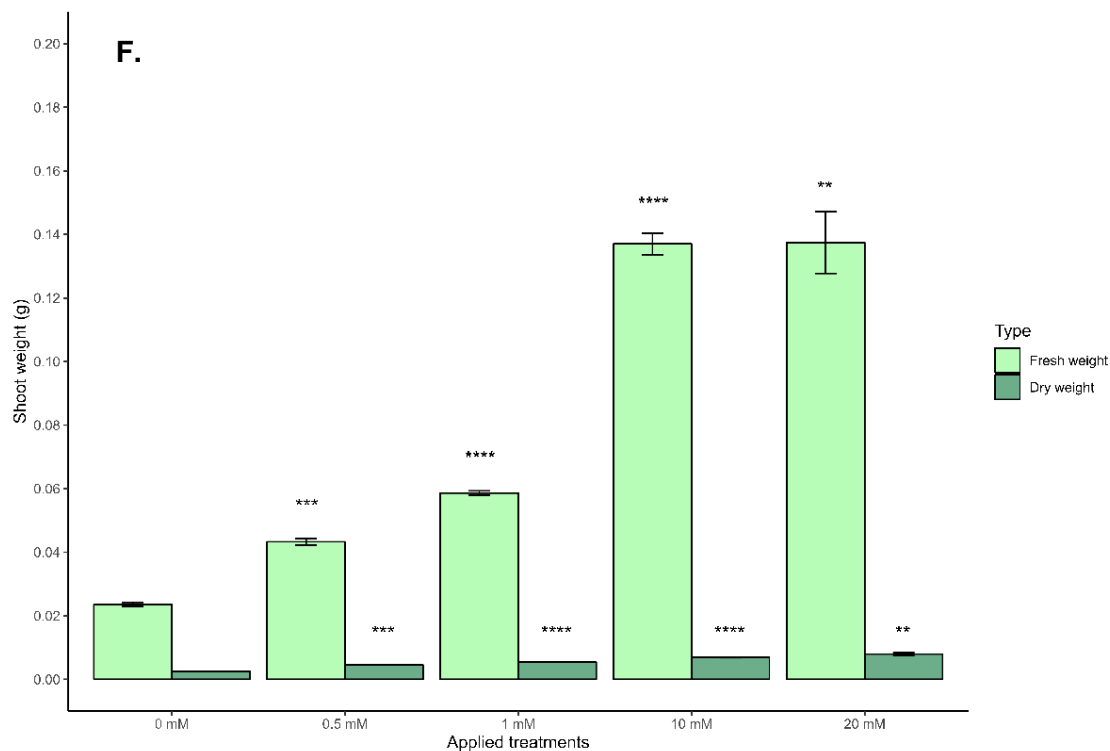


Figura 7. El incremento de la concentración de nitrógeno aplicada aumenta el desarrollo del tejido aéreo. Las dosis empleadas corresponden: **A.** 0 mM. **B.** 0,5 mM. **C.** 1 mM. **D.** 10 mM. **E.** 20 mM. **F.** Cuantificación del peso fresco y seco proveniente del tejido aéreo luego de 14 días, las barras graficadas ilustran el promedio de las réplicas biológicas, mientras que, las barras de error corresponden al error estándar obtenido. Para el análisis estadístico se comparó el control con los demás tratamientos y se aplicó la prueba *t-Student*, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

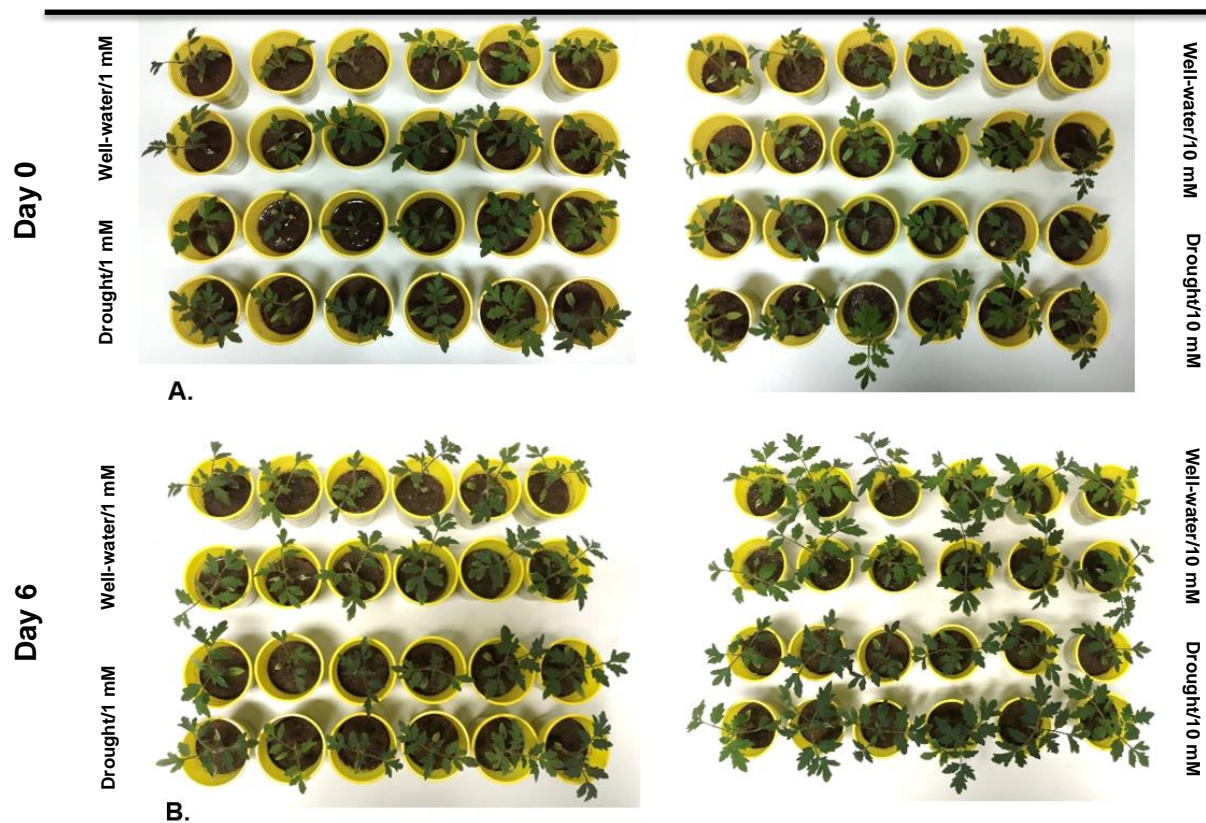
En la **Figura 7A** se observa el crecimiento de los tomates en el tratamiento control. Bajo esta condición que carece totalmente de una fuente de nitrógeno, las plantas presentan una baja tasa de crecimiento y desarrollo del brote, con cotiledones de pequeño tamaño y una coloración violácea por la zona abaxial. En el caso de la **Figura 7B**, se observa un mayor desarrollo del tejido aéreo.

La correlación entre concentración aplicada y biomasa se mantiene, dado que, a medida que la cantidad de KNO_3 aumenta también ocurre con el desarrollo del tejido aéreo de las plantas (**Figura 7C** y **Figura 7D**). Incluso, aquellos brotes bajo el tratamiento de 20 mM (**Figura 7E**) se advierten cotiledones de mayor tamaño y la aparición incipiente del primer par de hojas verdaderas de en todas plantas.

Considerando las variaciones de tamaño según la concentración aplicada de nitrato, se procedió registrar del peso fresco y seco de cada brote, para luego, determinar el contenido de agua disponible en el tejido y la biomasa desarrollada por las plantas. En la **Figura 7F** se destaca la divergencia de peso entre las condiciones de 1 mM y 10 mM KNO_3 , ya sea, en lo registrado como tejido fresco como seco. Adicionalmente, se evidencia en la **Figura 7F** que no hay un aumento en la biomasa fresca y seca entre las dosis de 20 mM y 10 mM KNO_3 .

1.2. *El déficit hídrico ocasiona cambios en la morfología de las plantas.*

A partir de lo obtenido con anterioridad, se determinó que las concentraciones a emplear en el ensayo de sequía junto con las dosis contrastantes de N corresponderían a 1 mM y 10 mM de KNO_3 (**Figura 7F**).



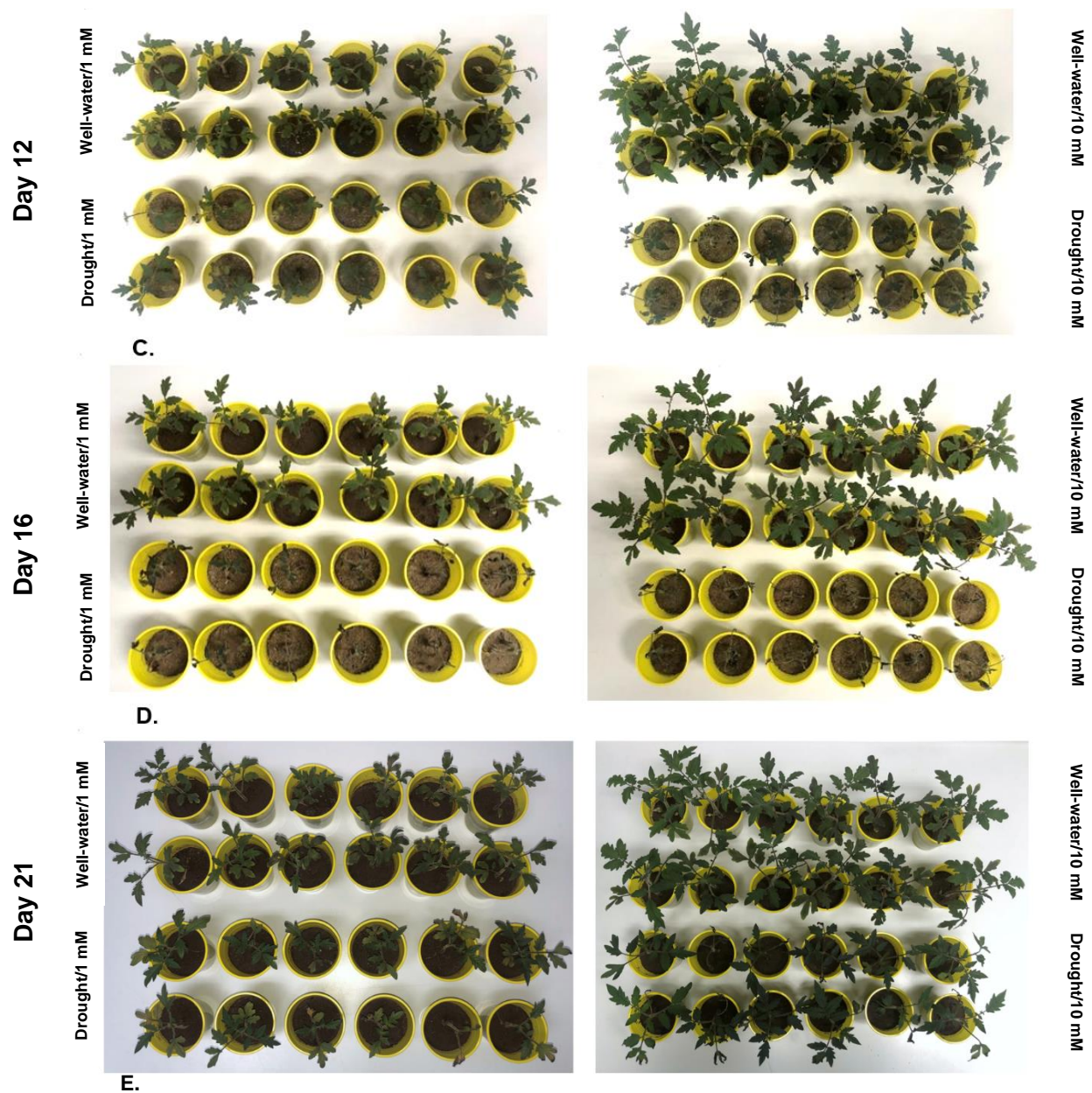


Figura 8. Cambios en la morfología y desarrollo de las plantas de tomate según la intensidad hídrica. Las plantas estuvieron bajo condiciones controladas por 31 días desde su germinación y posterior traspaso, para luego dar inicio al déficit de agua hasta cumplir los 42 días de edad. Registro fotográfico de las plantas: **A.** Corresponde al día 0. **B.** Imagen capturada del inicio de los distintos tratamientos. **D.** Plantas luego de cursar dieciséis días bajo las condiciones experimentales. **E.** Evaluación de la tasa de sobrevivencia de las plantas.

La **Figura 8** expone el registro cronológico correspondiente al ensayo de sequía e implementación de las dosis contrastantes, exponiendo las diferencias morfológicas de las plantas. En el caso del día 0 (**Figura 8A**) todos los tratamientos (D:HN, D:LN, WW:HN y WW:LN) se encuentran en la misma condición hídrica y bajo ambas dosis contrastantes de nitrato. Se exhiben plantas en buen estado de salud, con un completo desarrollo de los cotiledones y del segundo par de hojas verdaderas.

En la **Figura 8B** se contemplan diferencias entre las plantas según la concentración aplicada de nitrato. Se advierte un aumento en el desarrollo de tejido aéreo en aquellas que han sido tratadas con una mayor concentración de KNO_3 , no obstante, en función de la disponibilidad de agua no se aprecia un fenotipo claro entre las plantas.

Transcurridos doce días del inicio de los tratamientos (**Figura 8C**) se observan cambios en las principales estructuras de las plantas y se hacen visibles los cuatro fenotipos. Las mayores diferencias se reportan en aquellas sometidas a sequía y alto nitrato, en gran parte de las plantas se observan signos de marchitamiento, abscisión y enrollamiento de los folíolos, además de una disminución del crecimiento y desarrollo del tejido aéreo. Al tiempo que, algunas de las plantas tratadas con una menor concentración se aprecian indicios de clorosis en las hojas más maduras, pero no se evidencian lesiones avanzadas en las hojas.

En el día 16 día (**Figura 8D**), las plantas tratadas con un régimen restrictivo de agua presentan cambios en la morfología que son atribuibles al desecamiento, no obstante, existen variaciones en el nivel de daño del tejido foliar influenciado por la dosis de nitrato. Puesto que, las plantas en HN presentan un aceleramiento en el proceso de deterioro y muerte.

Finalmente, se evidencia en la **Figura 8E** que las plantas D:HN como D:LN poseen la capacidad de soportar el estrés hídrico. A pesar de presentar signos evidentes de senescencia en su estructura frente un nivel crítico de déficit hídrico, al momento de disponer nuevamente de agua, se restaura la turgencia. A pesar de esta condición aparente de tolerancia, ésta no se encuentra exenta de problemas, debido que a costa de la condición se observa una disminución en el crecimiento y un daño irreversible en las hojas de las plantas.

1.3. La sequía afecta al crecimiento y desarrollo del tejido aéreo de las plantas.

Se consideró relevante registrar la variación del peso de los brotes de las plantas durante el proceso de sequía, con el objetivo de evaluar diferencias a nivel de desarrollo y crecimiento.

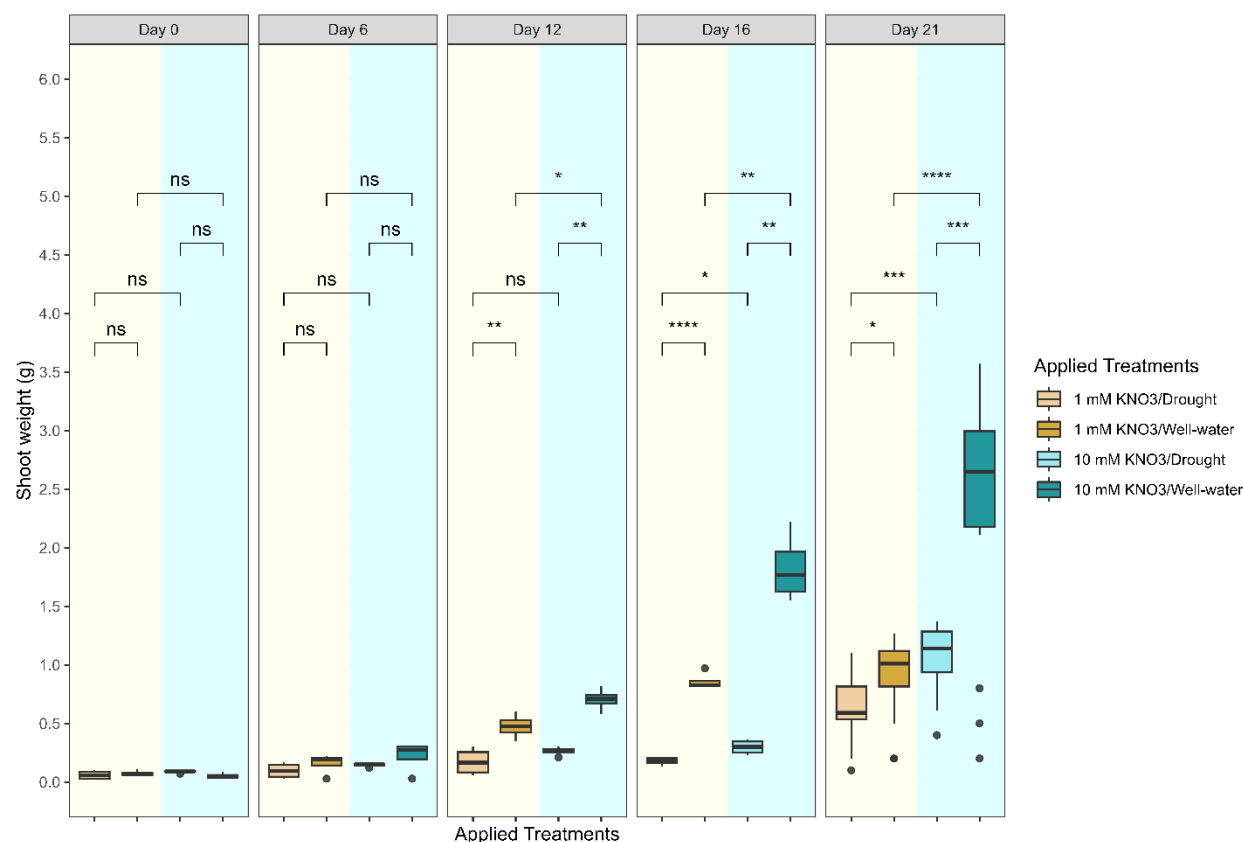


Figura 9. El incremento de la generación tejido aéreo se ve truncado por el déficit hídrico. Se presenta el peso fresco en gramos (g) de los brotes de las plantas, considerando el día de sobrevivencia como punto de referencia. El análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba *t-Student*, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

Desde el inicio del experimento, se mantuvo un registro del peso fresco de los brotes de las plantas, abarcando los días cruciales que reflejan los grados de intensidad hídrica que enfrentan las plantas de tomate (**Figura 9**).

Consecuentemente con lo reportado por la **Figura 7** y **8**, aquellas bajo el tratamiento de WW presentan un mayor grado de desarrollo de biomasa dependiendo de la concentración de N aplicada en las plantas. Sin embargo, al evaluar el peso fresco de D:HN y D:LN no se evidencia

un aumento significativo en el tiempo de la biomasa. Aunque esto cambia circunstancialmente, en el día 21 luego de someter a las plantas en tratadas en D a la rehidratación con agua. Es en este punto que se observa un incremento del peso fresco registrado en las plantas D:HN y D:LN, lo cual se atribuye a una respuesta de las plantas al momento de disponer nuevamente de agua.

1.4. Seguimiento de la pérdida de agua en las plantas.

Dentro de las variables a considerar, se estableció la medición diaria de la humedad del sustrato. Esto con la finalidad de establecer el grado de intensidad de desecamiento que se encuentran las plantas de tomate a lo largo del experimento.

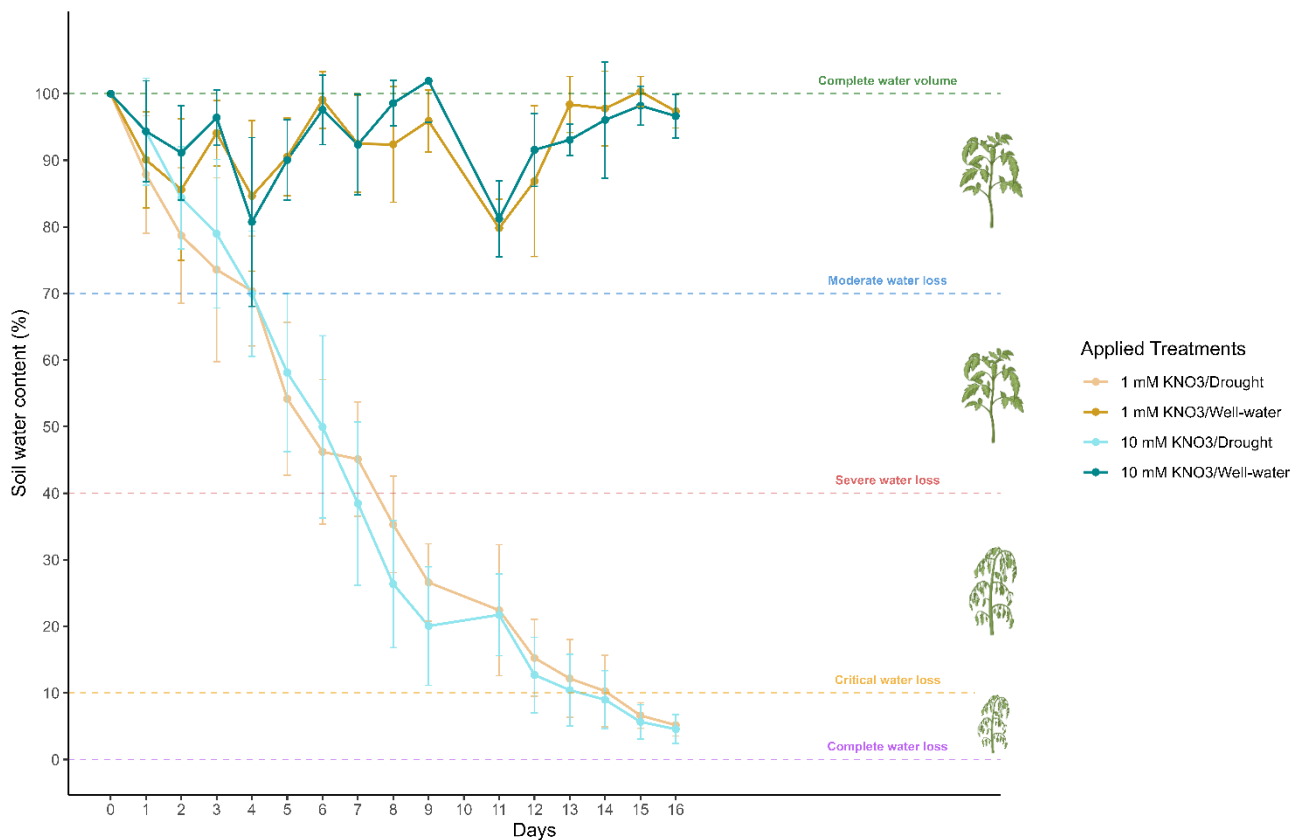


Figura 10. Pérdida del volumen total ocurre en un período de 16 días. Las líneas segmentadas proporcionan una representación visual del contenido de agua en el sustrato y los colores facilitan la interpretación de los niveles de humedad en diferentes momentos del experimento. Los puntos

graficados ilustran el promedio de las réplicas biológicas ($n = 12$), mientras que, las barras de error corresponden al error estándar obtenido.

En el inicio del experimento (**Figura 10**), todas las plantas se encuentran bajo la misma condición hídrica por lo que el sustrato dispone por completo del volumen inicial lo cuál se explica por la línea segmentada de color verde en la misma figura. En este punto, las plantas se encuentran saludables y sin signos de estrés hídrico (**Figura 8A**).

A medida que transcurren los días, la cantidad de agua disponible disminuye progresivamente hasta el día 6 y se ubica dentro de un rango que se consideró como una pérdida moderada de volumen, delimitada por la línea azul. En el momento que la pérdida de volumen traspasa el 40 % del volumen inicial es considerado como una disminución crítica de líquido y en este punto, se observan características asociadas al estrés hídrico en la morfología de las hojas como se puede observar en la **Figura 8C**. En el día 16 del experimento se da término al proceso de sequía, donde el volumen disponible en el sustrato es inferior al 10 %, por lo que, en las plantas disponen de 5 mL en promedio de agua, lo que es considerado como un estado de déficit crítico mostrando signos evidentes de estrés (**Figura 8D**).

A partir de esto, se observa que la pérdida de agua en ambos tratamientos en D es similar sin haber diferencias atribuibles a las dosis de N.

1.5. Cambios en la dosis de nitrato y disponibilidad de agua afectan la fisiología de las plantas.

A partir de la utilización del equipo portátil MultispeQ se dispuso de una amplia diversidad de parámetros asociados a la caracterización del estado de salud de las plantas durante el lapso que significó el experimento de sequía junto con las dosis contrastantes de N.

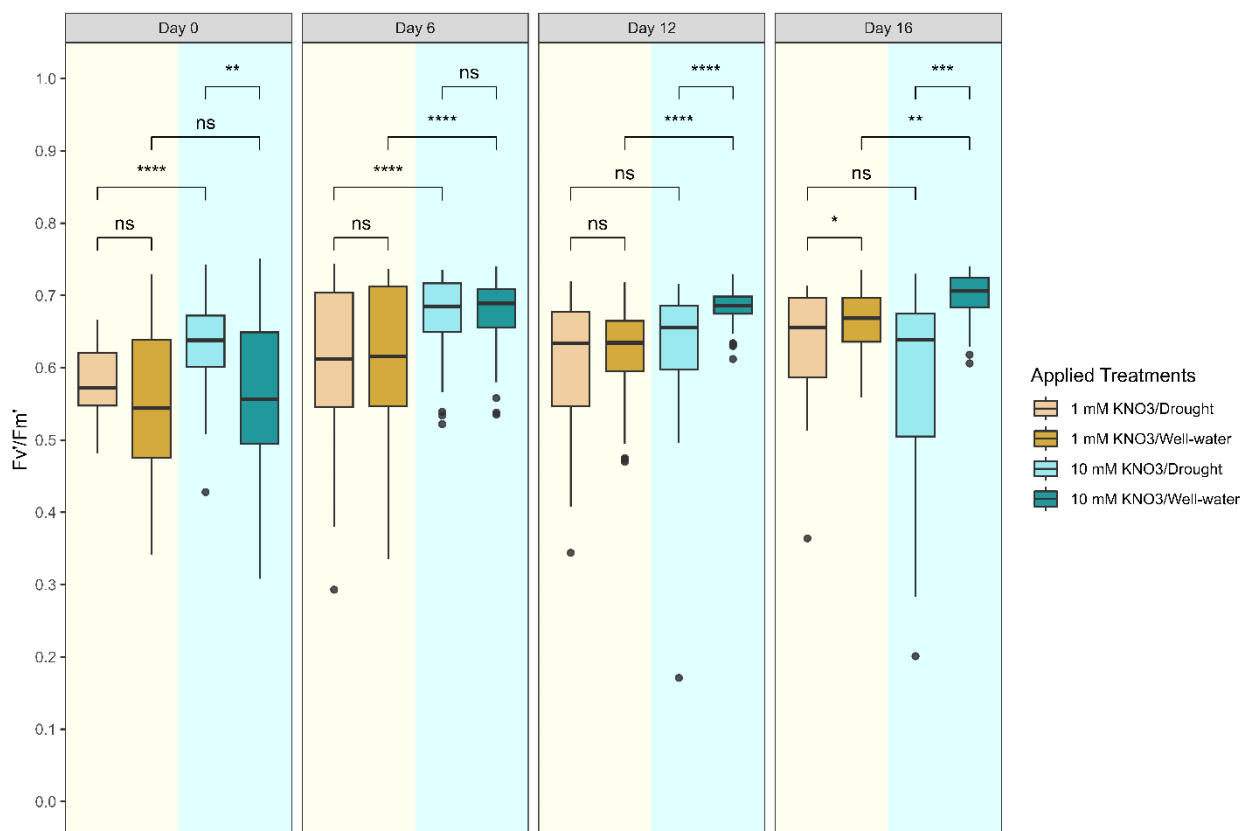


Figura 11. Influencia positiva de la dosis de nitrato en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II. Para el análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba *t-Student*, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

Según la **Figura 11**, al contemplar los valores promedios de la eficiencia cuántica máxima diurna del fotosistema II (F_v/F_m') de los tratamientos WW se advierte que el cultivar Moneymaker registra valores dentro del rango 0,5 y 0,7 lo cual puede ser interpretado como un porcentaje, es decir, entre un 50 % y un 70 % del total de centros de reacción del fotosistema II se encuentran activos para efectuar procesos biológicos en estas condiciones. Asimismo al analizar las plantas tratadas con riego constante (WW:LN vs. WW:HN) se comprueba que el parámetro F_v/F_m' es dosis dependiente.

Ahora bien, al examinar la condición D:LN no se evidencia una disminución de F_v/F_m' a medida que la disponibilidad de agua decrece. Mientras que, esto sí sucede permanentemente en el tratamiento HN, donde la eficiencia de WW:HN es superior a D:HN en la mayoría de los días. Adicionalmente, en la medida que la disponibilidad de agua supera el 40 %, el comportamiento entre D:LN y D:HN presenta diferencias significativas, aunque una vez que la

intensidad de la sequía progresa y el volumen disminuye, la eficiencia entre ambos tratamientos se equipara.

Por lo que, se puede dilucidar que las dosis de N influncian el comportamiento de F_v'/F_m' , aunque en la medida que la disponibilidad de agua en el tratamiento D disminuye, el efecto inducido por N decrece.

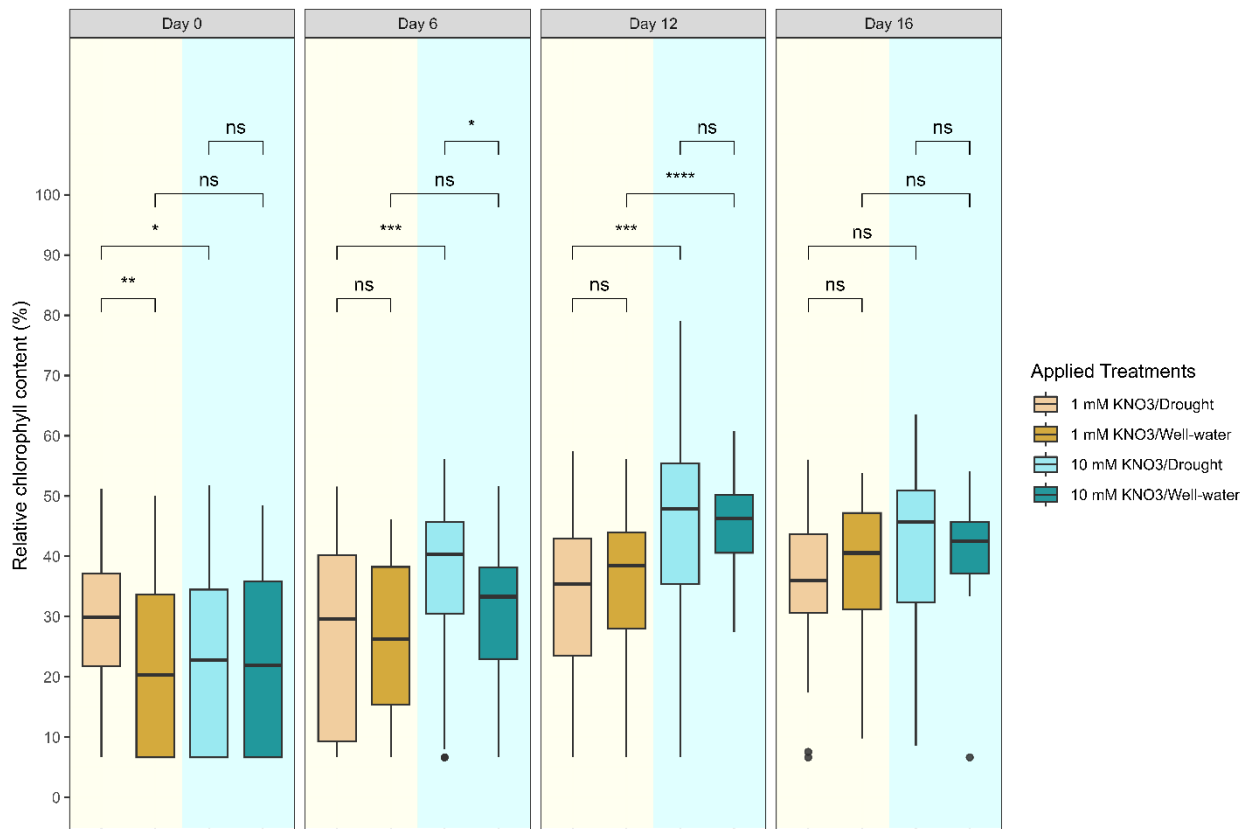


Figura 12. Producción de clorofila responde directamente a la concentración de nitrato disponible. Para el análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba *t-Student*, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

El contenido de clorofila (SPAD) aumenta en la medida que transcurren los días, lo que se relaciona con la captura y asimilación de N dispuesto en el sustrato (**Figura 12**). Aunque al evaluar los valores de SPAD en la condición WW no se evidencian diferencias entre ambas dosis de N.

Por otro lado, el comportamiento registrado por las plantas tratadas con LN es similar a lo largo del ensayo, sin percibirse diferencias a partir de la disponibilidad de líquido. Este comportamiento se comparte entre las condiciones WW:HN y D:HN.

Ahora bien, las plantas tratadas en la condición D se aprecia que tanto HN como LN presentan continuamente diferencias significativas a lo largo del ensayo, donde D:HN reporta valores superiores de clorofila.

Lo expuesto anteriormente pone de manifiesto que la concentración de nitrógeno disponible influye en los niveles de clorofila en relación con la capacidad de las plantas para adaptarse a condiciones de sequía.

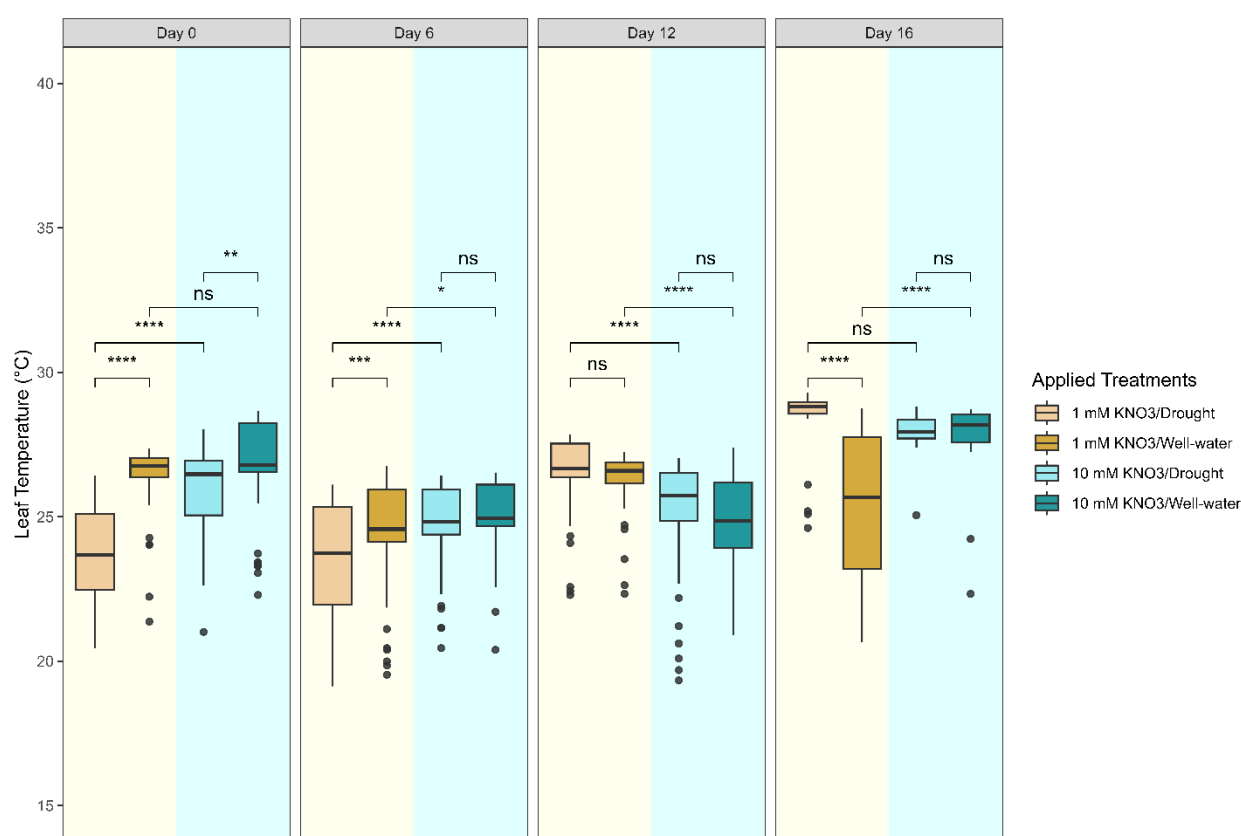


Figura 13. Incidencia de la dosis de nitrato y la disponibilidad de agua en la temperatura reportada. Para el análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba *t-Student*, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

Se ilustra en la **Figura 13** el patrón de comportamiento de la temperatura promedio de los folíolos entre los distintos tratamientos aplicados, la cual oscila entre los 20 °C y los 30 °C. Al analizar el comportamiento en las plantas con la misma dosis de N, se observa que los

tratamientos WW:LN vs. D:LN presentan diferencias en la temperatura registrada. Este aumento de los valores es atribuible a la disminución de la disponibilidad de agua y en consecuencia, al cierre estomático en los folíolos de las plantas (**Figura 15**). Aunque al realizar el mismo ejercicio con WW:HN vs. D:HN, no se aprecia el mismo comportamiento.

En el caso de las plantas tratadas en D se advierte que las temperaturas se diferencian en la medida que el volumen de agua disponible se encuentra por encima del 40 %. En el momento que restringe el volumen disponible es de un 10 %, la temperatura reportada entre las dosis de N se equipara.

Por ende, el aumento de la temperatura se atribuye principalmente al cierre de estomas como una medida de las plantas para disminuir la pérdida de agua por medio de la transpiración.

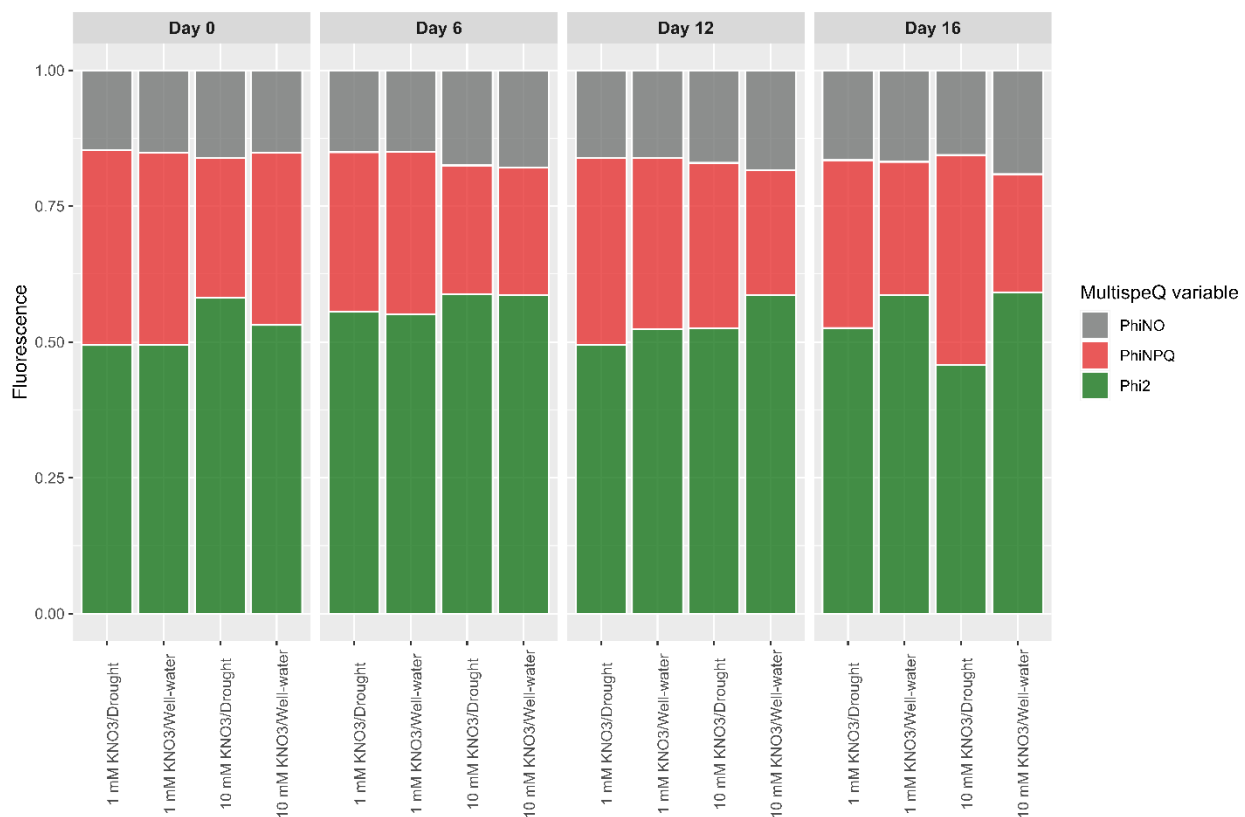


Figura 14. Proporción de los parámetros fisiológicos demuestran la incidencia de las condiciones experimentales. Dentro del gráfico, las barras de color verde representan al parámetro Phi2, de color rojo se ilustra PhiNPQ y de color gris ejemplifica el indicador PhiNO.

La **Figura 14** ilustra un conjunto de parámetros que evidencian la gestión de las plantas en función de la magnitud de la luz incidente. En los primeros días donde la disponibilidad de

agua se encuentra entre el 70 % del volumen inicial (**Figura 10**) se observa un comportamiento influenciado principalmente por la dosis de N, mientras que, en la medida que disminuye el volumen de agua disponible en el sustrato, la distribución de las actividades a nivel del fotosistema II varía evidenciándose diferencias en el comportamiento de los parámetros Phi2 y PhiNPQ que son atribuibles a pérdida de agua.

Esto se ejemplifica en los tratamientos D:LN y D:HN, si bien en el día 0 los valores se encuentran dados por la concentración de N, en el día 16 la actividad fotosintética (Phi2) disminuye y paralelamente, la cantidad de luz incidente liberada en forma de calor (PhiNPQ) es mayor.

1.6. Un déficit de agua severo provoca cambios en el número de estomas y en la tasa estomática.

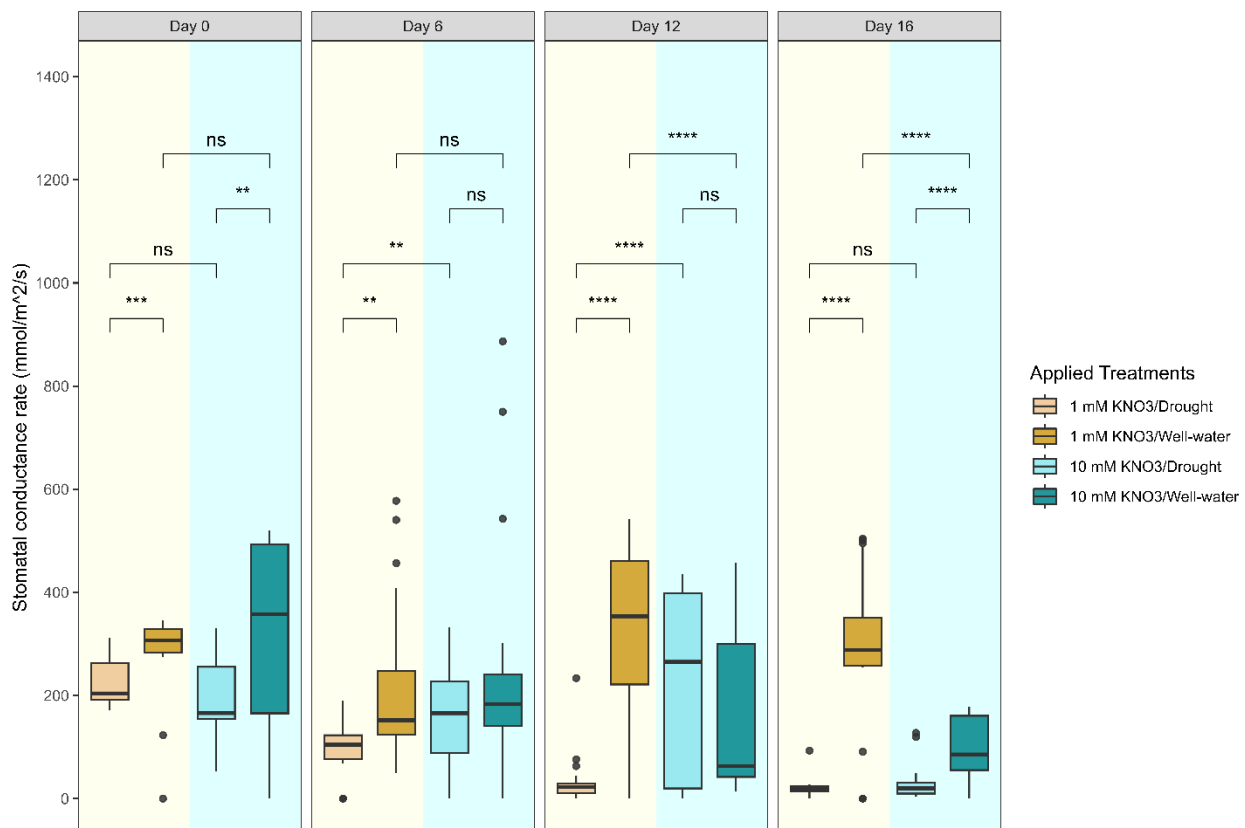


Figura 15. Sequía incide en la tasa de la conductancia estomática de las plantas. Para el análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba t-Student, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

El intercambio gaseoso (g_s) también fue incluido dentro de los parámetros que indican el estado fisiológico y rendimiento de las plantas.

Al comparar la condición WW en ambas concentraciones (WW:LN vs. WW:HN) se aprecia que la dosis de N influye en los valores registrados (**Figura 15**). Lo anterior es evidenciado en plantas tratadas con una dosis LN, se aprecia que los niveles de intercambio gaseoso se mantienen constantes en WW:LN, mientras que, en WW:HN se ilustra una disminución progresiva de g_s .

Bajo el mismo tratamiento de N, se aprecia que en LN existen diferencias según la disponibilidad de agua en el sustrato, lo cual no sucede al momento de comparar WW:HN y D:HN.

Por otro lado, la divergencia entre los tratamientos D:LN y D:HN es observable a partir del día 6. En este punto se demuestra una disminución de la tasa de conductancia estomática en la medida que la intensidad de la sequía progresa. Finalmente, un bajo intercambio gaseoso en las plantas tratadas con D es producto del cierre estomático.

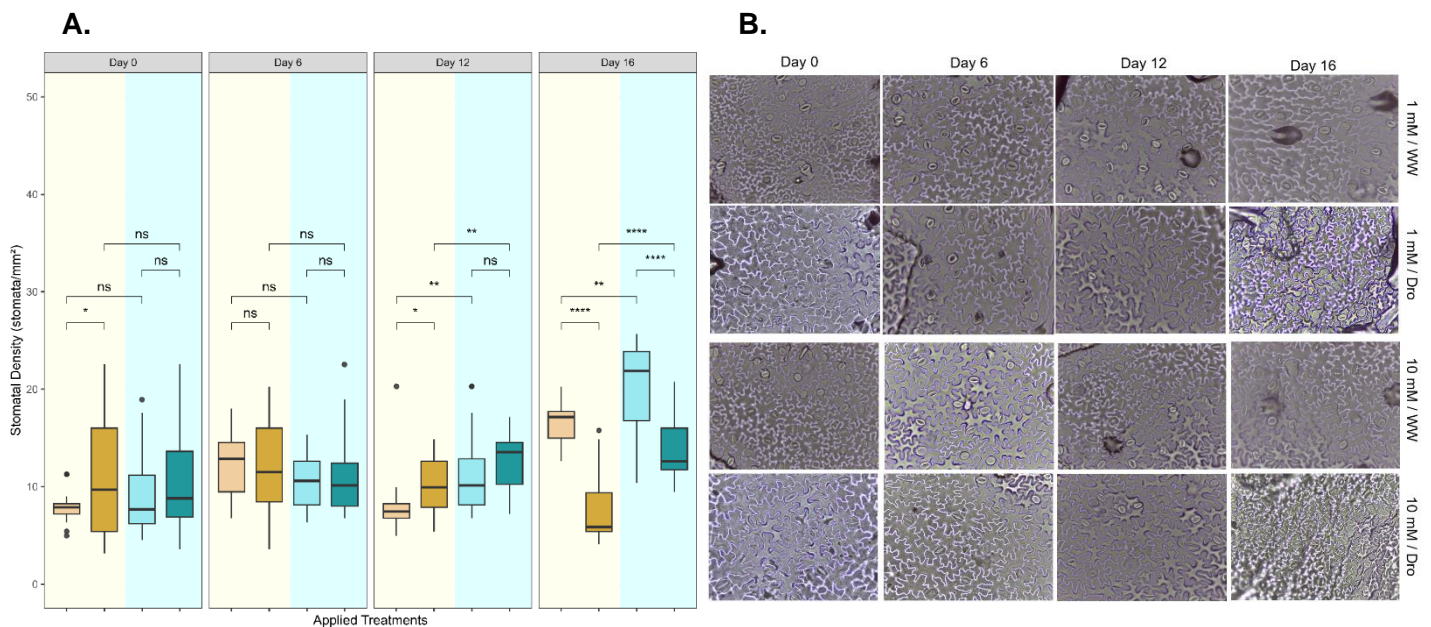


Figura 16. Intensidad crítica de déficit hídrico favorece la formación de nuevos estomas. **A.** Variación de la densidad estomática bajo las diferentes condiciones. Para el análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba t-Student, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$. **B.** Fotografías representativas de los campos escogidos.

Otra de las evaluaciones que complementan la caracterización fenotípica de las plantas frente a los distintos tratamientos corresponde a la densidad estomática (**Figura 16**).

Adicionalmente, al contrastar ambos controles considerando las dosis contrastante de N (WW:LN y WW:HN) se observa una diferencia significativa entre las condiciones, donde en HN las plantas han desarrollado un mayor número de estomas.

En el caso de las plantas en D, el número de estomas por área varía a partir del día 12 cuando la intensidad de la sequía ha progresado lo suficiente, y el sustrato dispone un volumen inferior al 40 %. De igual manera se observa que la dosis de N impacta en el número de estomas, puesto que, la densidad estomática es mayor en la condición D:HN que en D:LN.

La **Figura 16** evidencia que las plantas con déficit hídrico presentan una mayor densidad estomática que sus respectivos controles, por lo que llegado un punto la señal de déficit hídrico es más fuerte que la de N. Si bien el N juega un rol en el incremento de estomas, pasa a ser un papel secundario frente a la necesidad de la planta para sobrellevar y tolerar la sequía.

1.7. En condiciones de sequía una dosis mayor de nitrógeno causa una disminución de la turgencia en los folíolos.

Complementariamente a los parámetros expuestos, se postuló la realización de mediciones que analizan el contenido relativo de agua existente en los folíolos a lo largo del ensayo.

Durante el primer día de mediciones del parámetro RWC (**Figura 17**), se observa un comportamiento estable en los distintos tratamientos, lo cual se condice con volumen de agua disponible en el sustrato (**Figura 10**).

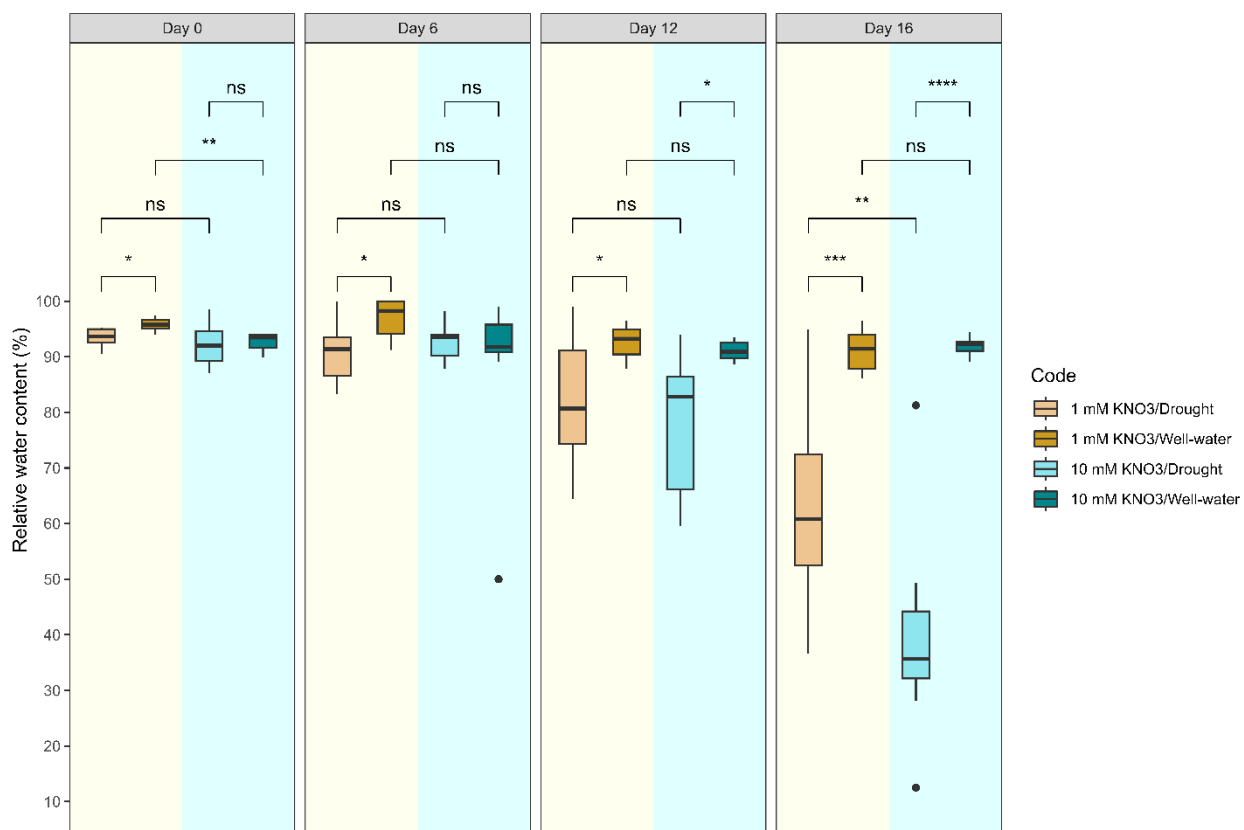


Figura 17. Nivel de turgencia es inferior en condiciones de déficit hídrico. Se observa la influencia de los tratamientos a partir de tejido foliar independiente, proveniente de plantas de tomate cv. Moneymaker. Para el análisis estadístico entre las muestras se empleó la prueba *t-Student*, (ns) = $p > 0,05$; (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$.

La pérdida de turgencia en el tejido foliar se evidencia a partir del día 12, donde al momento de analizar los tratamientos WW:LN vs. D:LN y simultáneamente, WW:HN vs. D:HN se observa que los folíolos adquiridos de plantas en D disminuyen el contenido de agua alojada en el tejido. Mientras que, aquellas plantas tratadas en WW se manifiesta un comportamiento estable a lo largo de las mediciones.

Si bien, en la **Figura 17** se expone que frente a una situación de sequía crítica es el factor prioritario que afecta la condición hídrica de los folíolos, la dosis empleada de N influye en el grado de pérdida de volumen, puesto que, frente a las plantas en LN presentan valores de turgencia superiores que las tratadas en HN.

1.8. La disponibilidad de nitrato influye en la supervivencia de las plantas.

De manera complementaria a las mediciones correspondientes a los parámetros fisiológicos se evaluó el grado de supervivencia luego de dieciséis días de encontrarse enfrentadas a una restricción total de agua. Esto con finalidad de cuantificar el número de organismos resistentes dentro del número total, según el tratamiento aplicado. Un alto valor en la tasa de supervivencia se interpreta como la capacidad que presentan estos organismos de resistir y sobreponerse al estrés causado.

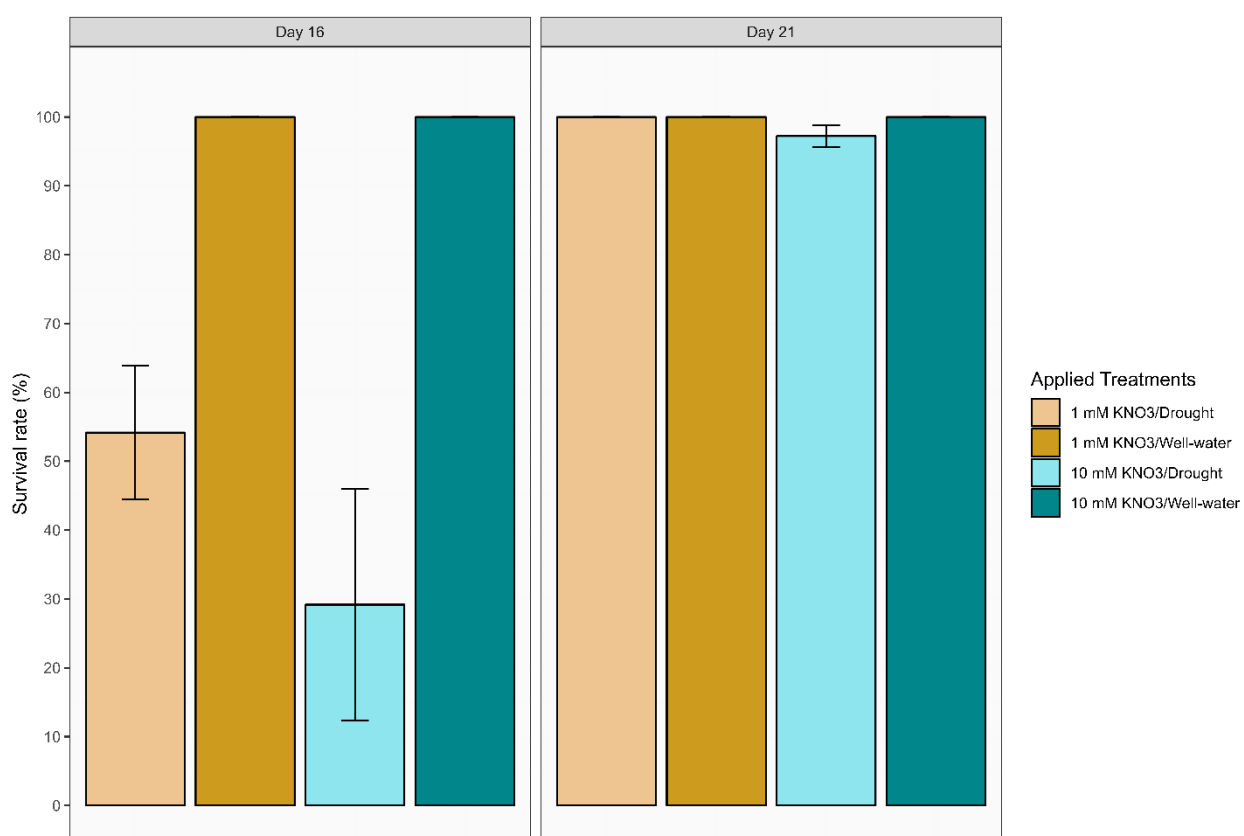


Figura 18. Concentración de nitrato define el grado de supervivencia a la sequía en las plantas de tomate. La figura ilustra la comparación el grado de supervivencia en el día 16 marca el final de la condición de sequía y el inicio del proceso de la restauración del volumen, luego de 5 días se procede a la cuantificación de la tasa de supervivencia como respuesta al estímulo hídrico.

En la **Figura 18**, se evidencia una disminución en el número de plantas sobrevivientes al final del proceso de restricción severa de agua (**Figura 10**), indicando la influencia negativa

existente en las plantas. En este mismo contexto de déficit, al comparar ambas concentraciones se destaca que existe una menor probabilidad de sobrellevar el estrés hídrico bajo una dosis mayor de nitrato.

Si bien este período de riego sirve para garantizar la muerte de las plantas y al mismo tiempo analizar la tasa real de sobrevivencia, esta evaluación demuestra que a pesar de presentar signos característicos de desecación (**Figura 8**) las plantas se reponen. En vista de que, luego del proceso de rehidratación se produce una total recuperación de las plantas en el día 21 (**Figura 18**). Por este motivo, es posible que sea un indicio de que los tomates del cultivar Moneymaker presentan un grado de adaptabilidad ante condiciones de déficit crítico del suministro de agua.

OE 2. Evaluar el efecto de la dosis de nitrógeno en la expresión de genes marcadores de respuesta a estrés hídrico en *Solanum lycopersicum* L cv. Moneymaker.

2.1. La calidad del RNA cumple con el criterio para su secuenciación.

A partir del tejido de hoja procesado de las plantas en el día 6, se obtuvieron moléculas de RNA sometidas inicialmente a un análisis de pureza mediante la utilización de la razón A260/A280 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras de RNA. Se entrega información sobre la concentración reportada por el equipo NanoDrop, nivel de pureza con el ratio A260/A280 y la integridad reportada por el equipo Fragment Analyzer mediante el indicador RQN. El ratio se emplea para evaluar la pureza de las muestras de RNA, puesto que, a una longitud de onda de 260 nm se evalúa la presencia de ácidos nucleicos y 280 nm se asocia a la presencia de proteínas. Una muestra puede considerarse pura en la medida que el resultado del ratio se encuentre dentro del rango 1,8 a 2,1.

Organismo	Tejido	Tipo de muestra	Muestra	Concentración (μL/ng)	A260/A280	RQN
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker	Tres folíolos independientes de hojas distintas	RNA	1 mM/Drought	9,80	1,98	9,8
			1 mM/Drought	256,53	2,19	8,1
			1 mM/Drought	36,30	2,12	9,1
			1 mM/Well-water	32,60	2,12	9,4
			1 mM/Well-water	70,70	2,13	8,8
			1 mM/Well-water	167,80	2,05	9,0
			10 mM/Drought	427,90	2,14	7,7
			10 mM/Drought	786,90	2,23	7,4
			10 mM/Drought	299,77	1,97	7,9
			10 mM/Well-water	667,47	1,92	8,1
			10 mM/Well-water	781,00	2,14	7,9
			10 mM/Well-water	854,13	1,97	7,6

Como se observa en la **Tabla 3**, la gran mayoría de los RNAs presentan una concentración suficiente según los estándares para la realización de la secuenciación. En relación con la pureza, las muestras se encuentran dentro del rango óptimo del ratio A260/A280, lo que indica un bajo nivel de contaminación. Esta contaminación puede deberse principalmente a la presencia de proteínas, compuestos fenólicos u otros contaminantes que absorben entre las longitudes de ondas evaluadas. Con respecto a la integridad del RNA, el indicador RQN detalla dependiendo del valor dentro del rango 1,0 hasta 10,0 en que se encuentre la muestra analizada es el grado de integridad. A partir de lo expuesto con anterioridad se logra apreciar que el RNA se encuentra en su gran mayoría intacto e íntegro, esto pues, el RQN promedio supera el valor de 7,0.

2.2. El análisis global de expresión génica respalda una conexión de genes entre la dosis de nitrógeno y la susceptibilidad al estrés por sequía.

Sobre la base de las muestras enviadas para su secuenciación, se realizó un análisis de componentes principales (del inglés, *Principal Component Analysis* o PCA) como parte del análisis exploratorio de los datos obtenidos según las variables: sequía y nitrato.

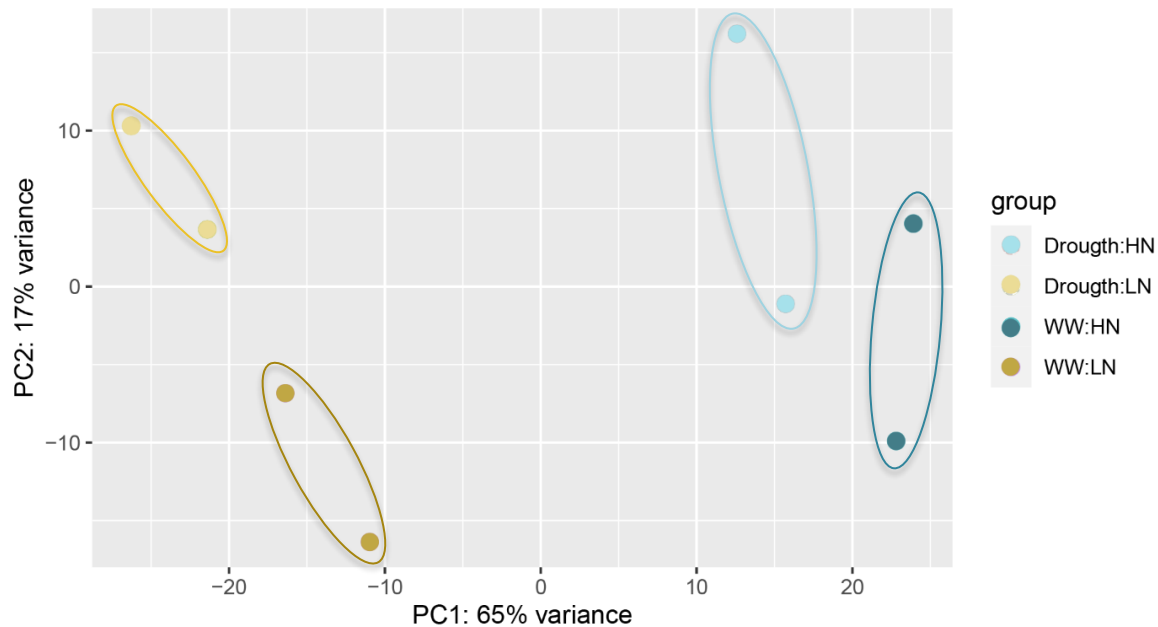


Figura 19. Análisis de componentes principales bidimensional que corresponde a los datos procesados y agrupados por dos variables, cada color representa el tratamiento. En la etiqueta se muestra: Drought:HN = Sequía/10 mM KNO₃, Drought:LN = Sequía/1 mM KNO₃, WW:HN = Regada/10 mM KNO₃, WW:LN = Regada/1 mM KNO₃.

En función de la **Figura 18**, este tipo de gráficos facilitan la visualización de la información a partir de los dos componentes principales en las cuales los datos varían en mayor medida y esta variación se expone a partir del porcentaje de la varianza, es decir, el grado de variabilidad del conjunto de datos.

A partir del gráfico de análisis de componentes principales, se observa el componente principal uno (PC1) que presenta un porcentaje de dispersión igual al 65 % de la variación total, segregando las muestras de los tratamientos según las dosis contrastantes de N, es decir, distinguiendo las concentraciones HN y LN independientemente de las condiciones hídricas. Paralelamente, el eje y se ajusta al componente principal dos (PC2) con un porcentaje igual al 17

% de dispersión y diferenciando de acuerdo con la condición hídrica de las plantas. Por lo que se aprecian los cuatro tratamientos dispersados en el plano bidimensional de la **Figura 19**.

Ahondando en la información obtenida con anterioridad, se realizó una evaluación de la expresión génica de un conjunto de genes marcadores específicos asociados a los tratamientos aplicados a las plantas de tomates. La cuantificación de la expresión proporcionó información sobre los procesos biológicos activos en este punto temporal clave que corresponde al día 6, donde las plantas se enfrentan a un déficit moderado de agua.

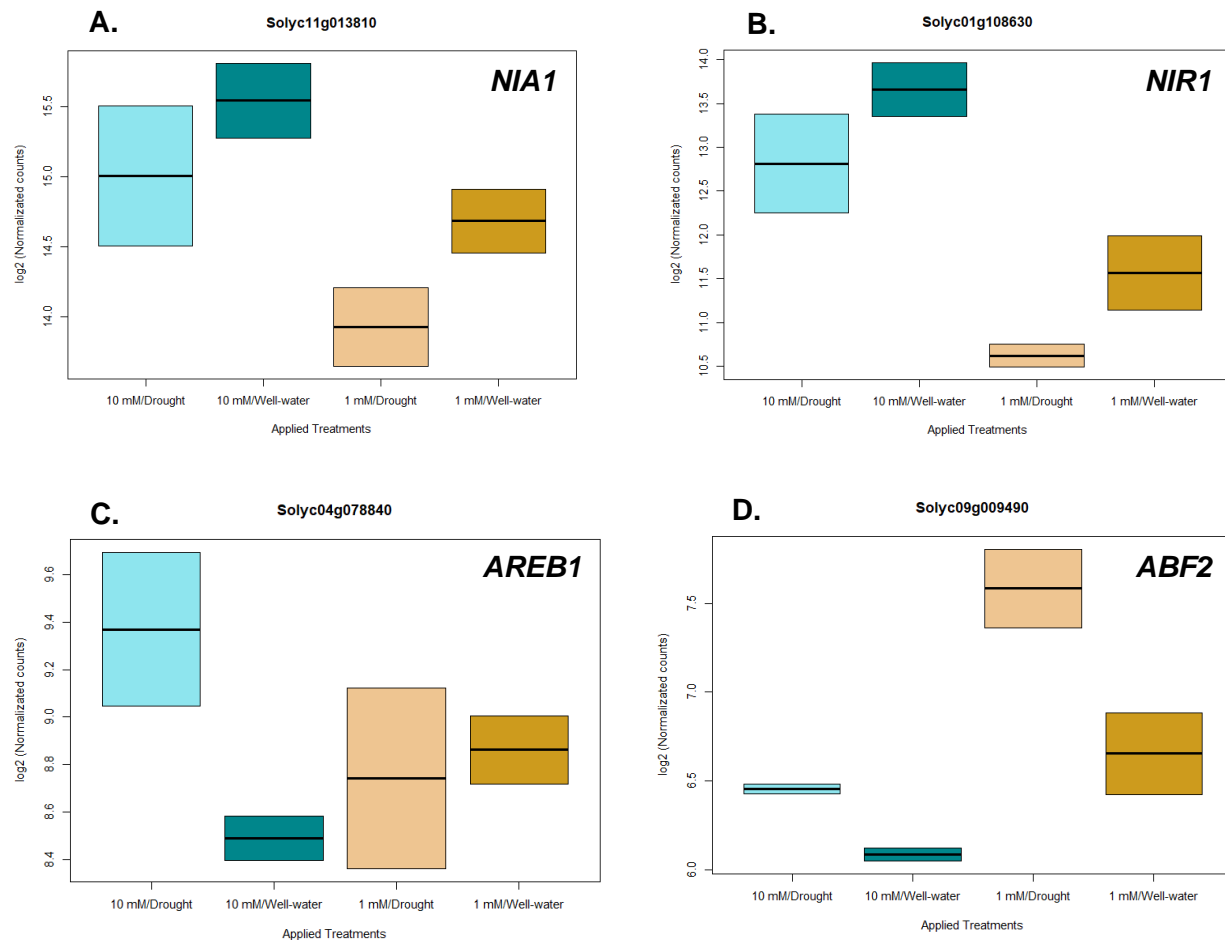


Figura 20. Análisis de expresión de genes marcadores asociados a la respuesta a nitrato y a sequía en plantas de tomate, identificados a partir de los ortólogos de *Arabidopsis thaliana*. **A.** Identificación del gen nitrato reductase 1 (*NIA1* o también *NR1*). **B.** Corresponde al gen nitrite reductase 1 (*NIR1*) en tomates. **C.** Expresión de genes marcadores de sequía, gen ABA-response element binding factor AREB1 (*AREB1*). **D.** Coincide con el gen abscisic acid responsive elements-binding factor 2 (*ABF2*).

A partir de la **Figura 20A** se puede observar la expresión del gen *NIA1* (Solyc11g013810) que corresponde a un gen marcador en respuesta a N. Al comparar WW:LN y WW:HN se reporta un valor de expresión mayor en el tratamiento que involucra la dosis HN.

Basado en la comparación entre dosis contrastante se observa que LN presenta valores de \log_2 (normalized counts) inferiores en una condición de HN. De igual manera, se aprecia que la expresión en la condición WW es superior para ambas concentraciones de nitrato. Por lo que, se puede determinar que la expresión de este gen se encuentra mediada fuertemente por la disponibilidad de N junto con la disponibilidad de agua.

En el caso del *NIR1* (Solyc01g108630) su comportamiento también obedece a la disponibilidad de N y agua (**Figura 20B**).

En el caso de los genes escogidos sobre la base de la vía de modulación del ABA, que responden a la disponibilidad hídrica se encuentran *AREB1* (Solyc04g078840) y *ABF2* (Solyc09g009490). En el primer caso, se aprecia un valor de expresión superior en la condición D:HN que en su contraparte constantemente regada. Con respecto, a la comparación D:LN y WW:LN se aprecia que los niveles de expresión son semejantes (**Figura 20C**). En el caso del segundo gen seleccionado se observa una diferencia en la expresión según el régimen de riego, del mismo modo, la mayor expresión se observa en la condición D:LN.

OE 3. Identificar cambios en la expresión genética global y procesos biológicos involucrados en la adaptación a la sequía de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker frente a dosis contrastantes de nitrógeno.

3.1. Los genes expresados diferencialmente en condiciones

Con la finalidad de comprender la manera en que la disponibilidad de nitrato impacta en la susceptibilidad de las plantas de tomate al enfrentarse a una condición de sequía, se llevó a cabo un análisis del perfil a nivel transcriptómico de las plantas.

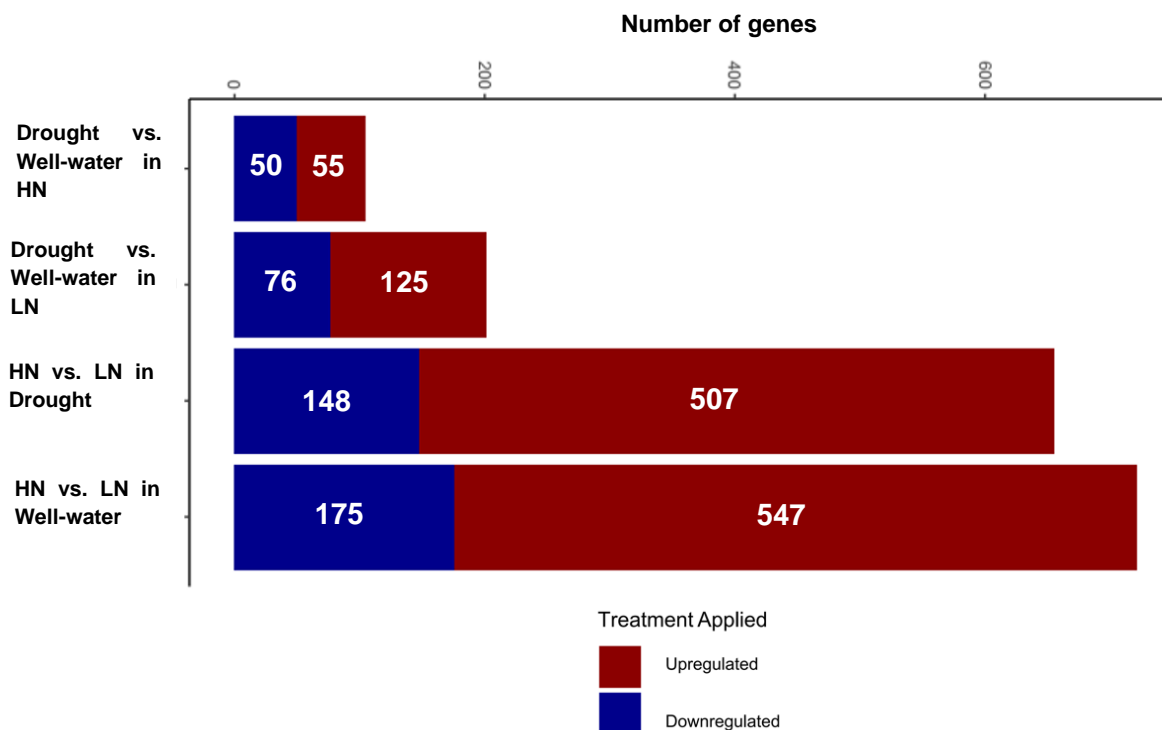


Figura 21. Recuento de los genes diferencialmente expresados entre las condiciones experimentales. La barra de color rojo representa a aquellos genes inducidos, mientras que, de color azul se muestran los genes reprimidos. El largo de la barra expone el número total de genes involucrados por cada comparación.

A partir de la **Figura 21** se muestra el número total de genes diferencialmente expresados (DEG) en base de las distintas comparaciones. En la primera barra se muestra los genes diferencialmente expresados en la comparación entre el control (Well-water) y el tratamiento (Drought) en una condición de HN agrupados de acuerdo si se encuentran inducidos o reprimidos

en esta condición. En virtud de lo anterior, se registra en la **Figura 21** el número de genes inducidos es igual a 55, mientras que, reprimidos son un total de 50.

Con respecto a la comparación entre el control y tratamiento en una condición de LN, se aprecia que el número de genes reprimidos alcanza el valor de 76 y los inducidos es igual a 125.

En tanto que, al contrarrestar las dosis de N desde la condición de sequía, el número de genes totales diferencialmente expresados aumenta. En el contexto de contrastar alto con bajo nitrato en la condición control, se aprecia que los genes reprimidos equivalen a 148 y en el caso de los inducidos se triplica el valor.

Por último, al comparar ambas dosis de N en la condición control la cantidad de genes expresados diferencialmente que se encuentran reportados en total son 722, de los cuales 175 se encuentran reprimidos y 547 inducidos.

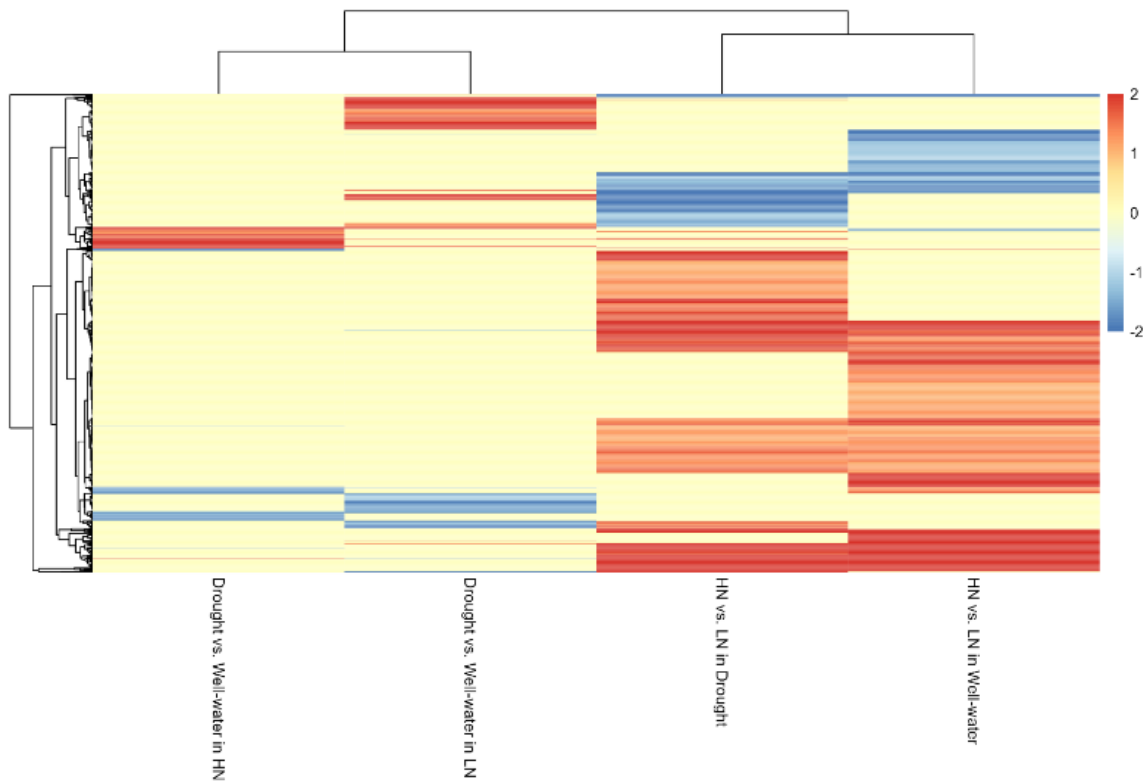


Figura 22. Mapa de calor de los transcritos diferencialmente expresados en respuesta a las condiciones experimentales que involucran las dosis de nitrato y la disponibilidad de agua. En rojo los genes sobre expresados, y en azul aquellos que están reprimidos.

La **Figura 22** ilustra un gráfico tipo mapa de calor en primera instancia proporciona una agrupación entre los tratamientos, identificando similitudes en los perfiles de expresión y al mismo tiempo, utilizando la variable \log_2 (Fold change) permite evaluar la magnitud y dirección de los cambios en la expresión, igualmente el mapa de calor permite evidenciar el patrón de cambios en la expresión de genes entre las condiciones experimentales.

Dentro del mismo clúster que agrupa los tratamientos HN vs. LN, se observa un patrón de comportamiento que es compartido entre los genes inducidos que no dependen de la disponibilidad hídrica, sino que dependen directamente de la dosis de N.

Mientras que, el clúster que agrupa las condiciones Drought vs. Well-water se aprecia que el patrón de comportamiento de igual manera se ve afectado por las dosis contrastantes de nitrato, dado que, el patrón de comportamiento no es equivalente.

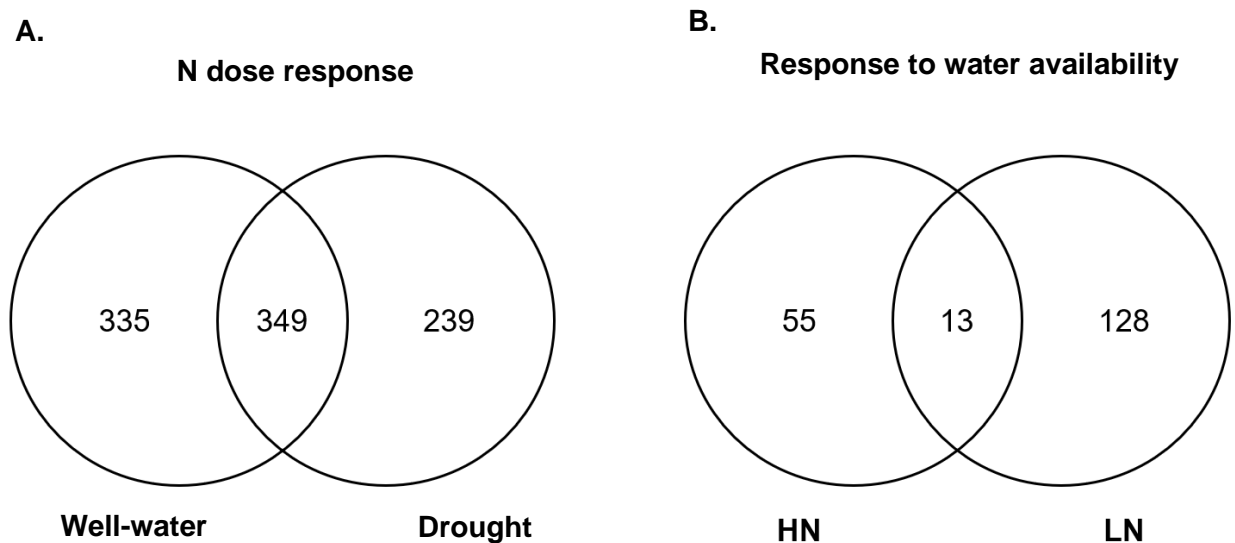


Figura 23. Diagramas de Venn del solapamiento de genes diferencialmente expresados en las distintas condiciones experimentales evaluadas en plantas de tomates. **A.** Intersección de los genes diferencialmente expresados según la dosis de nitrato dependiendo de la condición hídrica. **B.** Comparación según el estatus hídrico sujeta a la disponibilidad de nitrato.

Por otro lado, el diagrama de Venn (**Figura 23**) revela el número total de genes expresados diferencialmente al momento de contrastar ambas dosis de N. Al respecto de esta comparación, al menos 335 genes han sido señalados en respuesta a N en un régimen de riego constante, en tanto que, se han reportado otros 239 genes que responden a N en sequía de forma exclusiva. Solo un 37,8 % del total de los genes reportados (349/923) responden a N de forma

similar en la condición control y en sequía. Esto demuestra que un gran número de genes son compartidos y comunes frente la respuesta a nitrato sin importar el régimen de riego que se encuentren las plantas.

Complementariamente, la **Figura 23B** proporciona una visión detallada de los genes diferencialmente expresados al comparar ambas condiciones de riego. En este sentido, se ha reportado que 55 genes responden a sequía exclusivamente en plantas en la condición 10 mM N, mientras, otros 128 genes se ven involucrados en la respuesta a sequía en el tratamiento con 1 mM de N. En este contexto, se evidencia que solo el 6,6 % (13/196) del total de genes son comunes y son compartidos sin contar la dosis de N empleada.

La información entregada con anterioridad (**Figura 21** y **Figura 23**) evidencia que existe un mayor número de genes involucrados a la suplementación con nitrato, con un total de 923. En tanto que, frente a la respuesta al suministro de agua se aprecia un número menor de genes involucrados en la respuesta de las plantas con un total 196.

3.2. *Procesos biológicos sobrerrepresentados revelan la presencia de señalización regulada por ABA.*

El análisis de enriquecimiento de la ontología génica reveló múltiples términos GO en categorías relacionadas con la respuesta al estrés como significativamente enriquecidas en las distintas condiciones (**Tabla 4** y **Tabla 5**).

Entre los términos GO enriquecidos de aquellos genes diferencialmente expresados que se encuentran inducidos, (**Tabla 4**), se observan categorías relacionadas con el proceso de la fotosíntesis que fueron diferencialmente expresadas en respuesta a la sequía en HN y en respuesta a N en la condición de sequía como de riego constante.

En el caso de la respuesta a la sequía, tanto en HN como en LN se resaltan términos GO ligados con ABA, “response to abscisic acid”, “celular response to abscisic acid stimulus”, “abscisic acid-activated signaling pathway”, “negative regulation of abscisic acid-activated signaling pathway” fueron enriquecidos entre los DGE regulados al alza como también otros procesos biológicos que involucran el movimiento de estomas y la privación de agua.

Además, en respuesta a la sequía en LN se observan presentan ciertos términos GO que demuestran funciones adicionales como “leaf senescence” y “stomatal closure”.

Tabla 4. Lista significativa de términos de ontología génica de procesos biológicos y funciones moleculares que se encuentran inducidos bajo las distintas condiciones experimentales.

	GO terms	p-value	Counts	Term
Upregulated genes by drought in HN	GO:0009737	2,39E-05	17	response to abscisic acid
	GO:0071215	3,63E-05	11	cellular response to abscisic acid stimulus
	GO:0009738	4,55E-05	10	abscisic acid-activated signaling pathway
	GO:0010205	6,00E-05	3	photoinhibition
	GO:1905156	7,06E-05	3	negative regulation of photosynthesis
	GO:0010109	7,98E-05	4	regulation of photosynthesis
	GO:0009414	0,000106094	13	response to water deprivation
	GO:0009415	0,000150885	13	response to water
	GO:0006950	0,000248815	35	response to stress
	GO:0009788	0,000314076	5	negative regulation of abscisic acid-activated signaling pathway
	GO:1902456	0,002034019	3	regulation of stomatal opening
	GO:0006970	0,002110374	13	response to osmotic stress
	GO:0009787	0,002382209	6	regulation of abscisic acid-activated signaling pathway
	GO:1990069	0,002730226	3	stomatal opening
	GO:0015979	0,003515146	5	photosynthesis
	GO:0010150	0,006815584	6	leaf senescence
	GO:0010118	0,010107547	6	stomatal movement
	GO:0051171	0,020832668	19	regulation of nitrogen compound metabolic process
	GO:0010119	0,023069409	4	regulation of stomatal movement
	GO:0072593	0,0194977	4	reactive oxygen species metabolic process
Upregulated genes by drought in LN	GO:0051172	0,02523404	10	negative regulation of nitrogen compound metabolic process
	GO:0015995	0,041411531	2	chlorophyll biosynthetic process
	GO:1902265	2,72E-09	6	abscisic acid homeostasis
	GO:0006950	3,37E-08	70	response to stress
	GO:0010150	9,79E-07	15	leaf senescence
	GO:1902584	1,21E-05	6	positive regulation of response to water deprivation
	GO:0009737	2,61E-05	26	response to abscisic acid
	GO:0009738	0,000949652	12	abscisic acid-activated signaling pathway
	GO:2000070	0,001092445	6	regulation of response to water deprivation
	GO:0071215	0,003990457	12	cellular response to abscisic acid stimulus
	GO:0006995	0,004341431	3	cellular response to nitrogen starvation
	GO:0009788	0,006082285	5	negative regulation of abscisic acid-activated signaling pathway
	GO:0009787	0,017463095	7	regulation of abscisic acid-activated signaling pathway
	GO:0043562	0,01633198	3	cellular response to nitrogen levels
	GO:0051172	0,032233626	16	negative regulation of nitrogen compound metabolic process
	GO:0000302	0,010962656	8	response to reactive oxygen species
	GO:0090332	0,03562998	4	stomatal closure
	GO:0009414	0,043516213	13	response to water deprivation
Upregulated genes by N in well-water	GO:0015979	2,58E-28	56	photosynthesis
	GO:0009267	2,82E-14	45	cellular response to starvation
	GO:0042594	5,83E-13	48	response to starvation
	GO:1901566	2,52E-12	113	organonitrogen compound biosynthetic process
	GO:0015995	7,44E-12	20	chlorophyll biosynthetic process
	GO:0015994	6,26E-10	20	chlorophyll metabolic process
	GO:1901564	0,000105541	206	organonitrogen compound metabolic process
	GO:0042128	0,000299359	7	nitrate assimilation
	GO:0042126	0,000356485	7	nitrate metabolic process
	GO:0044271	0,000618157	141	cellular nitrogen compound biosynthetic process
	GO:0071941	0,000786431	7	nitrogen cycle metabolic process
	GO:0033554	0,000900133	98	cellular response to stress
	GO:0010167	0,001626383	8	response to nitrate
	GO:2001057	0,010358984	7	reactive nitrogen species metabolic process
	GO:0043562	0,033240947	6	cellular response to nitrogen levels
	GO:0080168	0,043655329	4	abscisic acid transport
Upregulated genes by N in drought	GO:0015979	2,12E-56	80	photosynthesis
	GO:0019684	2,00E-20	35	photosynthesis, light reaction
	GO:0015995	9,78E-14	21	chlorophyll biosynthetic process
	GO:0015994	1,17E-11	21	chlorophyll metabolic process
	GO:0031667	2,20E-11	54	response to nutrient levels
	GO:1901566	2,12E-09	96	organonitrogen compound biosynthetic process
	GO:0009767	4,69E-09	14	photosynthetic electron transport chain
	GO:0009773	2,94E-08	7	photosynthetic electron transport in photosystem I
	GO:0010109	1,19459E-05	10	regulation of photosynthesis
	GO:0042128	0,005921854	5	nitrate assimilation
	GO:0042126	0,006666574	5	nitrate metabolic process
	GO:0033554	0,009448141	83	cellular response to stress
	GO:0006995	0,010303107	5	cellular response to nitrogen starvation
	GO:0010167	0,013977921	6	response to nitrate
	GO:0009269	0,035385506	5	response to desiccation
	GO:0072593	0,007462045	16	reactive oxygen species metabolic process
	GO:1901031	0,005364881	2	regulation of response to reactive oxygen species
	GO:1903426	0,022224241	4	regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
	GO:1903428	0,042047576	3	positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process

Paralelamente, en respuesta a N disponible en WW, se observan varios términos GOs relacionados con procesos inducidos que implican la asimilación y metabolización del nitrógeno, incluido con la producción de clorofila y la fotosíntesis.

Mientras que, en respuesta a N en D los términos GO enriquecidos entre los genes regulados al alza como se observa en la **Tabla 4** se incluyen funciones que principalmente involucran al procesamiento del nitrógeno, la actividad fotosintética de las plantas y la aparición de ROS.

Tabla 5. Lista significativa de términos de ontología génica de procesos biológicos y funciones moleculares que se encuentran reprimidos en las distintas condiciones experimentales.

	GO terms	p-value	Counts	Term
Downregulated genes by drought in HN	GO:0030307	0,000145511	5	positive regulation of cell growth
	GO:0060284	0,000281137	6	regulation of cell development
	GO:0001558	0,012569069	5	regulation of cell growth
	GO:0016049	0,01732764	9	cell growth
Downregulated genes by drought in LN	GO:0016049	1,17E-06	19	cell growth
	GO:0040007	2,27E-06	23	growth
	GO:0048589	1,06E-05	19	developmental growth
	GO:0048588	0,001162889	9	developmental cell growth
	GO:0010115	0,002122762	3	regulation of abscisic acid biosynthetic process
	GO:0009688	0,004161525	3	abscisic acid biosynthetic process
	GO:0009414	0,005464279	11	response to water deprivation
	GO:0009415	0,007072874	11	response to water
	GO:0080168	0,013468425	2	abscisic acid transport
	GO:0048639	0,017533306	3	positive regulation of developmental growth
	GO:0006561	0,006680362	2	proline biosynthetic process
	GO:0006560	0,011408891	2	proline metabolic process
	GO:0006950	0,040189618	33	response to stress
Upregulated genes by N in drought	GO:0006995	0,001517873	4	cellular response to nitrogen starvation
	GO:0043562	0,001276295	5	cellular response to nitrogen levels
	GO:2000377	0,013472533	5	regulation of reactive oxygen species metabolic process
	GO:0071705	0,01648969	23	nitrogen compound transport
Upregulated genes by N in well-water	GO:0006995	0,0078246	3	cellular response to nitrogen starvation
	GO:0071705	0,026161917	19	nitrogen compound transport
	GO:0043562	0,028426957	3	cellular response to nitrogen levels
	GO:0006950	0,049644085	63	response to stress

La **Tabla 5** ilustra los procesos biológicos sobrerrepresentados asociados a los genes que se encuentran reprimidos en las distintas condiciones. En respuesta a la sequía en HN entre los términos GO enriquecidos de los genes regulados a la baja se observan funciones relacionadas exclusivamente al crecimiento celular. Mientras que, en LN, los términos GO expuestos tienen funciones regulan el crecimiento celular y regulación por medio de ABA.

Además, en respuesta a N en ambas condiciones hídricas se aprecia que los términos GO se vinculan estrictamente a la respuesta celular de nitrógeno.

DISCUSIÓN

El estudio conjunto del efecto del nitrógeno y la sequía en las plantas es esencial por varias razones clave. Primero, el nitrógeno es un nutriente crucial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, influenciando procesos vitales como la fotosíntesis y la síntesis de proteínas. Sin embargo, su disponibilidad puede verse significativamente afectada bajo condiciones de sequía. La sequía, por otro lado, es un estrés ambiental cada vez más común debido al cambio climático, y puede limitar severamente la absorción de agua y nutrientes por las plantas.

Entender la interacción entre la disponibilidad de nitrógeno y la sequía es fundamental para mejorar las estrategias agrícolas y de conservación. En condiciones de sequía, las plantas a menudo enfrentan una disminución en la absorción de nitrógeno, lo que puede conducir a un crecimiento reducido y una menor productividad. Por otro lado, un suministro adecuado de nitrógeno puede ayudar a las plantas a soportar mejor el estrés hídrico. Además, las prácticas de fertilización deben ajustarse para evitar la sobre fertilización, que puede exacerbar los problemas de sequía y contaminar los cuerpos de agua. Sin embargo, poco se sabe de la interacción de nitrógeno y sequía en el tomate. En esta tesis abordamos este problema desde la fisiología y la respuesta molecular.

Una herramienta para monitorear de manera no destructiva a las plantas y obtener información sobre el estado fisiológico del aparato fotosintético es mediante la fluorescencia. Por este motivo, el equipo MultispeQ facilita la comprensión de la dinámica de los rasgos foliares relacionados con la fotosíntesis. Además, posibilita la constatación de los cambios en la emisión de fluorescencia, proporcionando datos sobre el rendimiento de las plantas y permitiendo la caracterización de su la respuesta al estrés (Soto et al., 2023).

En referencia al parámetro F_v'/F_m' , este corresponde a una estimación de la eficiencia cuántica máxima de la actividad fotoquímica del PSII durante el día cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos (Jiménez-Suancha et al., 2015). Este indicador ha sido empleado para investigar la respuesta de las plantas frente a factores ambientales (Jia et al., 2019). En condiciones de riego constante, se registran valores dentro del rango del 0,5 a 0,7 sugiriendo preliminarmente que estos son los valores óptimos para las plantas de tomate cultivar Moneymaker. Particularmente, se han reportado que en variedades de tomate como cv. M82 los valores en las plantas constantemente regadas son iguales a 0,4 (M. Liu et al., 2023).

Paralelamente, al observar detenidamente la **Figura 11** revela la influencia de las dosis de N en WW:HN y WW:LN, sugiriendo que la disponibilidad de este nutriente puede tener un impacto en la respuesta de F_v'/F_m' .

Pese a lo anterior, frente a situaciones de déficit hídrico (**Figura 11**) las plantas experimentan limitaciones en la actividad de PSII debido a la incapacidad para satisfacer su demanda de agua desde el suelo (Nemeskéri et al., 2019). No obstante, al examinar los casos de D:HN y D:LN, se aprecia que el parámetro F_v'/F_m' reporta valores que no disminuyen de manera pronunciada en comparación con sus respectivos controles (WW:HN y WW:LN). Incluso los valores no disminuyen en el día 16, a pesar del estado morfológico de los folíolos (**Figura 8**) lo que quiere decir que, ~~ni~~ en D:HN y D:LN la eficiencia de la actividad de PSII no presenta limitaciones producto de D.

Según lo observado en un estudio (Pérez-Molina et al., 2020) la deficiencia de N en condiciones de alta iluminación aumentó el grado de estrés en las plantas de tomate, puesto que, aumentaron las especies reactivas de oxígeno (ROS) y como resultado se obtuvo una disminución del crecimiento y desarrollo saludable de las plantas.

Por otro lado, en cuanto a los valores reportados en la **Figura 12** se aprecian diferencias en los niveles de clorofila en base de la concentración empleada de N de manera progresiva. Esto se observa al comparar aquellas plantas tratadas con sequía y una dosis elevada de N, registrando un aumento del contenido relativo de clorofila, con respecto al tratamiento D:LN.

Según lo que se ha reportado en plantas de tomate de la variedad Henzuo 906, sometidas a distintas condiciones de irrigación y tres dosis de N empleando la solución Hoagland, tanto la disponibilidad de agua como las dosis de N añadidas, impactan activamente en el contenido de clorofila (Ullah et al., 2021). También un estudio afirma que la reducción de la fotosíntesis bajo estrés por sequía se debe principalmente a un menor metabolismo del nitrógeno en plantas enfrentadas a estrés hídrico en *Leymus chinensis* (Iqbal et al., 2020; Z. Z. Xu & Zhou, 2006).

Sin embargo, se ha reportado que la función de N como regulador al estrés depende de la intensidad del estímulo que enfrenta la planta y de la dosis de aplicación del macronutriente (Zhong et al., 2017). Si bien una cantidad suficiente de N favorece el crecimiento de las plantas, también fomenta un incremento de la tolerancia al estrés. Según esto último, ciertos estudios sugirieron que la aplicación de una concentración considerablemente alta de N da como resultado un mejor crecimiento y metabolismo del nitrógeno, lo que mejora la tolerancia de las plantas contra el estrés (Iqbal et al., 2020; N. Wang et al., 2021; Zhong et al., 2017). De manera similar, una alta concentración mejora los rasgos fotosintéticos, lo que ayuda a mitigar el estrés por sequía al aumentar la sensibilidad de la conductancia estomática y mantener una tasa fotosintética más alta, lo cual fue documentado en la planta *Orzya sativa* (Iqbal et al., 2020).

Sobre la base de lo expuesto con anterioridad, se puede presumir que las plantas de tomate estuvieron expuestas a rango inferior de PAR durante la realización de los experimentos,

lo cual pudo impactar en los valores reportados de F_v'/F_m' incluso en el día 0, puesto que, las evaluaciones indican que en promedio el 60 % de los centros de reacción se encontraban abiertos en los tomates Moneymaker a la hora de la realización de la actividad fotosintética, lo cual puede ser interpretado como un signo de estrés en las plantas de manera inicial. Dado que, tanto el indicador F_v'/F_m' como SPAD son medidos mediante la fluorescencia la cual se encuentra influenciada por la luz externa que incide en el sensor del equipo, se puede suponer que las mediciones están subrepresentadas por la intensidad lumínica.

Por lo tanto, una de las recomendaciones es aumentar el PAR al interior de las carpas antes de repetir el ensayo, pero no se puede descartar la incidencia de N en el F_v'/F_m' en las condiciones D:HN y D:LN.

Adicionalmente, al momento de evaluar la temperatura promedio de los folíolos (**Figura 13**) ésta suele aumentar hasta alcanzar el punto máximo en el instante que las plantas cursan por un régimen de déficit crítico en las condiciones LN y HN. Este aumento en la temperatura es atribuible al cierre estomático de las plantas con el objetivo de reducir la transpiración, puesto que, se ha reportado que el cierre de estomas conduce a una disminución tanto de la conductancia estomática como de la absorción de CO_2 (Nemeskéri et al., 2019).

Lo anterior se condice con lo reportado en la **Figura 15** debido a que en D se registra una disminución de los valores de la conductancia estomática a lo largo de las evaluaciones hasta que se alcanza punto mínimo en el día 16. Dependiendo de la especie de la planta, el tamaño y la densidad de los estomas puede variar, debido a factores genéticos y/o al crecimiento en diferentes condiciones ambientales y con frecuencia se ha sugerido una correlación negativa entre estos dos rasgos estomáticos (Bertolino et al., 2019). Estudios demuestran que en plantas tratadas por salinidad y sequía se observa un aumento gradual de la DE, esto debido a cambios en la anatomía de las hojas. Un ejemplo de esto es la planta *Zea mays* que presenta un aumento de la DE durante un curso de estrés moderado (Hasanuzzaman et al., 2023; Pitaloka et al., 2022; Z. Xu & Zhou, 2008).

Los resultados exponen en la **Figura 16** que los tomates cv. Moneymaker presentan un aumento progresivo del número de estomas por área foliar en D:LN y D:HN, siendo mayor la DE en aquellas plantas tratadas en HN. Sin embargo, se ha informado que las hojas de plantas desarrolladas en condiciones de déficit hídrico severo como *Leymus chinensis*, *Populus balsamifer*, *Orzya sativa* y *Triticum aestivum* presentan una densidad estomática reducida en comparación con plantas en condiciones de riego constante, aunque mostraron una mejor tolerancia a la sequía (Hasanuzzaman et al., 2023).

Otro de los parámetros fisiológicos analizados corresponde al porcentaje de RWC en los folíolos de las plantas de tomate, el cual indica el grado de volumen con respecto al máximo nivel de hidratación del tejido foliar (Patanè et al., 2022). Se ha informado que un alto RWC es un mecanismo de resistencia a la sequía, y es el resultado de una mayor regulación osmótica o una menor elasticidad de la pared celular del tejido (Keyvan, 2010).

Según lo ilustrado en la **Figura 17** se ilustra que la condición D:HN que el contenido de agua se encuentra cerca del 30 %, mientras que, D:LN descienden hasta el 60 %. Esto puede dar luces de la condición hídrica de las plantas, por lo que, D:HN presenta un grado menor de turgencia que su contraparte. A partir de lo anterior, se presume que las dosis con N afectan los registros de los tratamientos que se encuentran en D.

En relación con los genes que responden a nitrato, se seleccionaron *NIR1* y *NIA1* como se detalla en la **Figura 20A y 20B**. Ambos genes presentan un comportamiento similar a nivel de su perfil de expresión génica atribuible directamente a las concentraciones de N empleadas, evidenciando valores superiores en la condición D:HN en comparación con D:LN.

En cuanto al nitrato este desempeña un papel dual en las plantas, una de ellas es como nutriente y como una señal para regular la expresión génica (X. Y. Liu et al., 2014). En cuanto a la señalización de nitratos se puede dividir en efectos a corto y largo plazo. La respuesta primaria a los nitratos se caracteriza por la regulación de genes después de un corto período de exposición a los aportes de nitratos. En este contexto, se ha observado que genes implicados en el transporte de nitratos (*NRT*) y en la reducción (*NIA* y *NIR*) pueden ser inducidos en cuestión de minutos (L. Zhao et al., 2018). Se ha documentado que los genes que codifican la nitrato reductasa y la nitrito reductasa son inducidos por el suministro de nitrato, facilitando la asimilación de N, mientras que estos genes están regulados negativamente en condiciones de deficiencia, lo que probablemente limite la actividad de asimilación de nitrato (Fukuda et al., 2020).

En cuanto a la respuesta de los genes ante la sequía, *AREB1* y *ABF2* muestran variaciones en la expresión génica relacionadas tanto con las dosis de N como con las condiciones hídricas (**Figura 20C y 20D**). La expresión génica relativa de ambos genes es opuesta, puesto que, *AREB1* presenta niveles de expresión más altos en la condición D:HN, se registran niveles de expresión superiores en comparación con D:LN. Mientras que, *ABF2* presenta niveles de expresión relativa superiores en la condición D:LN que su homólogo D:HN.

Se ha documentado que parte de las vías de señalización activadas en respuesta a estímulos ambientales, la fitohormona ABA, juega un papel importante en la regulación de la expresión génica. Los niveles de ABA aumentan drásticamente en los tejidos vegetativos con niveles decrecientes de potencial hídrico y regulando la expresión de numerosos genes en

condiciones de estrés como sequía, estrés salino y bajas temperaturas (Orellana et al., 2010; Yáñez et al., 2009).

Dentro de los genes que han sido documentados que responden al estrés por sequía una parte de ellos son inducidos por ABA, los cuales corresponden a *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* y *ABF3* que son inducidos por deshidratación, alta salinidad o tratamiento en los tejidos vegetativos con ABA (Fujita et al., 2005; Yoshida et al., 2010). En el caso de *ABF2* en la literatura se ha reportado mediante ensayos ChIP-seq y TARGET que *ABF2* y *ABF3* regulan una cantidad significativa de genes que responden a nitratos dentro del endodermis (Contreras-López et al., 2022), además de presentar funciones que se asocian a la tolerancia a la sequía (Cerdeira & Álvarez, 2023). En el caso de las plantas de tomate, se han identificado dos miembros de la familia ABRE denominados *SIAREB1* y *SIAREB2*, la expresión de ambos genes se encuentra inducida por la sequía y la salinidad tanto en hojas como en tejidos de raíces (Orellana et al., 2010; Yáñez et al., 2009).

La **Figura 23** demuestra que existe un mayor número de genes regulados que responden a la presencia de N tanto en sequía como en riego constante. Se intuye que esta diferencia tiene relación con el grado de la intensidad hídrica que enfrentan las plantas en el día 6, puesto que, la disponibilidad de agua se encuentra entre el 70 % y 50 % del volumen inicial, lo que para las plantas puede no ser suficiente para activar todas las vías de señalización que integran la respuesta a la sequía. A partir de lo reportado en un estudio del transcriptoma de series temporales en la planta *Arabidopsis thaliana* sobre el estrés por sequía, proporcionó una descripción general de las respuestas temporales a la sequía y demostró que a medida que progresa la sequía aumenta el número de genes de respuesta (Bechtold et al., 2016). Adicionalmente, se ha investigado la dinámica transcriptómica en plantas de tomate de múltiples puntos durante el estrés por sequía y la rehidratación, encontrando que la represión de genes relacionados con la fotosíntesis, la proliferación y el ciclo celular y los procesos asociados a la cromatina, así como la activación de genes en muchas vías como la biosíntesis de ABA ante la sequía (Iovieno et al., 2016).

A partir de la **Tabla 4** y **5**, se destacan los procesos biológicos asociados a genes diferencialmente expresados que se encuentran inducidos o reprimidos. Según lo reportado en un estudio que analiza la respuesta de las plantas de la variedad M82, frente al estrés osmótico inducido por PEG (Pirion et al., 2023) el cual es un tratamiento que imita a la condición de sequía en un componente específico, puesto que, la sequía moderada o severa determina la acumulación de sales e iones en el suelo provocando un estrés osmótico. Con respecto a lo anterior, se aprecia que se comparten ciertos procesos biológicos en el tejido foliar de las plantas

con los expuestos en la **Tabla 4** en respuesta a la sequía en HN y LN, como “response to stress” y “response to water deprivation”.

Adicionalmente, en la **Tabla 4** se ilustra un número significativo de procesos biológicos que involucran la respuesta de ABA, “response to abscisic acid”, “cellular response to abscisic acid”, “abscisic acid homeostasis”, “abscisic acid-activated signaling pathway”, “regulation of abscisic acid-activated signaling pathway” y “negative regulation of abscisic acid-activated signaling pathway”, y como se reporta por (Ruggiero et al., 2022) las vías de respuesta al estrés dependientes de ABA están implicadas tanto en la sequía como en la deficiencia de nitrógeno.

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Dado los antecedentes expuestos a lo largo de este trabajo, se evidencia que la comprensión de la relación entre la disponibilidad de nitrógeno y la sequía es esencial para optimizar las estrategias agrícolas, preservación de los recursos y aumento en la productividad de las plantas. A partir de la disponibilidad de agua, las plantas se comportan de manera diferente según la dosis de N. Podemos ver que tanto a nivel morfológico como fisiológico las plantas de tomate Moneymaker experimentan cambios en su desarrollo y crecimiento, así como también observamos cambios en los niveles de RNA. Estos cambios de expresión génica podrían estar afectando procesos biológicos involucrados, lo que puede resultar en un crecimiento reducido y una menor productividad.

REFERENCIAS

- Akinawo, S. O. (2023). Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. In *Environmental Challenges* (Vol. 12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100733>
- Alfaro, M., Salazar, F., Hube, S., Ramírez, L., & Mora, M. S. (2018). Ammonia and nitrous oxide emissions as affected by nitrification and urease inhibitors. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 18, Issue 2).
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z. L., Li, Q., Zeng, X. P., Liu, Y., & Li, Y. R. (2020). Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. In *Biological Research* (Vol. 53, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00312-4>
- Anjum, S. A., Xie, X.-Y., Wang, L.-C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2026). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9). <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Aoki, K., Yano, K., Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda, K., Kurabayashi, A., Suzuki, T., Tsugane, T., Watanabe, M., Ooga, K., Torii, M., Narita, T., Shin-i, T., Kohara, Y., Yamamoto, N., Takahashi, H., Watanabe, Y., Egusa, M., ... Shibata, D. (2010). *Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (Solanum lycopersicum) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics*. <http://tomato.nbrp.jp>.
- Araus, V., Swift, J., Alvarez, J. M., Henry, A., & Coruzzi, G. M. (2020). A balancing act: How plants integrate nitrogen and water signals. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Issue 15, pp. 4442–4451). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa054>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59, pp. 89–113). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bassi, D., Menossi, M., & Mattiello, L. (2018). Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20653-1>
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. In *F1000Research* (Vol. 5). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7678.1>

- Bechtold, U., Penfold, C. A., Jenkins, D. J., Legaie, R., Moore, J. D., Lawson, T., Matthews, J. S. A., Vialet-Chabrand, S. R. M., Baxter, L., Subramaniam, S., Hickman, R., Florance, H., Sambles, C., Salmon, D. L., Feil, R., Bowden, L., Hill, C., Baker, N. R., Lunn, J. E., ... Mullineaux, P. M. (2016). Time-series transcriptomics reveals that AGAMOUS-LIKE22 affects primary metabolism and developmental processes in drought-stressed arabidopsis. *Plant Cell*, 28(2), 345–366. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00910>
- Ben-Jabeur, M., Gracia-Romero, A., López-Cristoffanini, C., Vicente, R., Kthiri, Z., Kefauver, S. C., López-Carbonell, M., Serret, M. D., Araus, J. L., & Hamada, W. (2021). The promising MultispeQ device for tracing the effect of seed coating with biostimulants on growth promotion, photosynthetic state and water–nutrient stress tolerance in durum wheat. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/s41207-020-00213-8>
- Bergmann, D. C., & Sack, F. D. (2007). Stomatal development. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 163–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.104023>
- Bertolino, L. T., Caine, R. S., & Gray, J. E. (2019). Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00225>
- Bian, C., Demirer, G., Cai, Y., & Oz, M. (2023). *Conservation and divergence of regulatory architecture in nitrate-responsive plant gene circuits*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.17.549299>
- Bian, Z., Wang, Y., Zhang, X., Grundy, S., Hardy, K., Yang, Q., & Lu, C. (2021). A Transcriptome Analysis Revealing the New Insight of Green Light on Tomato Plant Growth and Drought Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.649283>
- Bista, D. R., Heckathorn, S. A., Jayawardena, D. M., Mishra, S., & Boldt, J. K. (2018). Effects of drought on nutrient uptake and the levels of nutrient-uptake proteins in roots of drought-sensitive and -tolerant grasses. *Plants*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/plants7020028>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Ceacero, J. C., Díaz-Hernández, J. L., del Campo, A. D., & Navarro-Cerrillo, R. M. (2012). Evaluación temprana de técnicas de restauración forestal mediante fluorescencia de la clorofila y diagnóstico de vitalidad de brinzales de encina (*quercus ilex* sub. *ballota*). *Bosque*, 33(2), 1910202. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002012000200009>

- Cerda, A., & Álvarez, J. M. (2023). Insights into molecular links and transcription networks integrating drought stress and nitrogen signaling. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.19403>
- Cheng, M., Wang, H., Fan, J., Xiang, Y., Tang, Z., Pei, S., Zeng, H., Zhang, C., Dai, Y., Li, Z., Zou, Y., & Zhang, F. (2021). Effects of nitrogen supply on tomato yield, water use efficiency and fruit quality: A global meta-analysis. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 290). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110553>
- Contreras-López, O., Vidal, E. A., Riveras, E., Álvarez, J. M., Moyano, T., Sparks, E. E., Medina, J., Pasquino, A., Benfey, P. N., Coruzzi, G. M., & Gutierrez, R. A. (2022). Spatiotemporal analysis identifies ABF2 and ABF3 as key hubs of endodermal response to nitrate PLANT BIOLOGY. *PNAS*, 119(4), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107879119/-/DCSupplemental>
- Delgado, D., Alonso-Blanco, C., Fenoll, C., & Mena, M. (2011). Natural variation in stomatal abundance of *Arabidopsis thaliana* includes cryptic diversity for different developmental processes. *Annals of Botany*, 107(8), 1247–1258. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr060>
- Edwards, C. E., Ewers, B. E., & Weinig, C. (2016). Genotypic variation in biomass allocation in response to field drought has a greater affect on yield than gas exchange or phenology. *BMC Plant Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0876-3>
- Fàbregas, N., Lozano-Elena, F., Blasco-Escámiz, D., Tohge, T., Martínez-Andújar, C., Albacete, A., Osorio, S., Bustamante, M., Riechmann, J. L., Nomura, T., Yokota, T., Conesa, A., Alfocea, F. P., Fernie, A. R., & Caño-Delgado, A. I. (2018). Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06861-3>
- Fernández-Calleja, M., Monteagudo, A., Casas, A. M., Boutin, C., Pin, P. A., Morales, F., & Igartua, E. (2020). Rapid on-site phenotyping via field fluorimeter detects differences in photosynthetic performance in a hybrid—parent barley germplasm set. *Sensors (Switzerland)*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/s20051486>
- Florido Bacallao, M., & Bao Fundadora, L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 35, 70–88.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(12), 3470–3488. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035659>

- Fukuda, M., Fujiwara, T., & Nishida, S. (2020). Roles of non-coding rnas in response to nitrogen availability in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228508>
- Garcia-Hernandez, M., Berardini, T. Z., Chen, G., Crist, D., Doyle, A., Huala, E., Knee, E., Lambrecht, M., Miller, N., Mueller, L. A., Mundodi, S., Reiser, L., Rhee, S. Y., Scholl, R., Tacklind, J., Weems, D. C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., ... Zhang, P. (2002). TAIR: A resource for integrated Arabidopsis data. In *Functional and Integrative Genomics* (Vol. 2, Issue 6, pp. 239–253). <https://doi.org/10.1007/s10142-002-0077-z>
- Giordano, M., Petropoulos, S. A., & Rouphael, Y. (2021). The fate of nitrogen from soil to plants: Influence of agricultural practices in modern agriculture. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agriculture11100944>
- González, A. (2018). ImageJ: una herramienta indispensable para medir el mundo biológico. *Folium, Relatos Botánicos*, 1, 2–17.
- Goulding, K. W. T. (2016). Soil acidification and the importance of liming agricultural soils with particular reference to the United Kingdom. In *Soil Use and Management* (Vol. 32, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/sum.12270>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). *The physiology of plant responses to drought*. <http://science.sciencemag.org/>
- Hachiya, T., & Sakakibara, H. (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 68, Issue 10, pp. 2501–2512). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>
- Hannah Ritchie, Pablo Rosado and Max Roser (2023) - “CO₂ and Greenhouse Gas Emissions” Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/co2-and-greenhouse-gas-emissions>'.
- Hasanagić, D., Kolečka, I., Kojić, D., Vlaisavljević, S., Janjić, N., & Kukavica, B. (2020). Long term drought effects on tomato leaves: anatomical, gas exchange and antioxidant modifications. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(7). <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03114-z>
- Hasanuzzaman, M., Zhou, M., & Shabala, S. (2023). How Does Stomatal Density and Residual Transpiration Contribute to Osmotic Stress Tolerance? In *Plants* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12030494>
- Iovieno, P., Punzo, P., Guida, G., Mistretta, C., Van Oosten, M. J., Nurcato, R., Bostan, H., Colantuono, C., Costa, A., Bagnaresi, P., Chiusano, M. L., Albrizio, R., Giorio, P., Batelli, G., & Grillo, S. (2016). Transcriptomic changes drive physiological responses to progressive

- drought stress and rehydration in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00371>
- Iqbal, A., Dong, Q., Wang, X., Gui, H., Zhang, H., Zhang, X., & Song, M. (2020). High nitrogen enhance drought tolerance in cotton through antioxidant enzymatic activities, nitrogen metabolism and osmotic adjustment. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020178>
- Jenouvrier, S., Long, M. C., Coste, C. F. D., Holland, M., Gamelon, M., Yoccoz, N. G., & Sæther, B. E. (2022). Detecting climate signals in populations across life histories. *Global Change Biology*, 28(7), 2236–2258. <https://doi.org/10.1111/gcb.16041>
- Jia, M., Li, D., Colombo, R., Wang, Y., Wang, X., Cheng, T., Zhu, Y., Yao, X., Xu, C., Ouer, G., Li, H., & Zhang, C. (2019). Quantifying chlorophyll fluorescence parameters from hyperspectral reflectance at the leaf scale under various nitrogen treatment regimes in winter wheat. *Remote Sensing*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/rs11232838>
- Jiménez-Arias, D., Morales-Sierra, S., Suárez, E., Lozano-Juste, J., Coego, A., Estevez, J. C., Borges, A. A., & Rodriguez, P. L. (2023). Absciscic acid mimic-fluorine derivative 4 alleviates water deficit stress by regulating ABA-responsive genes, proline accumulation, CO₂ assimilation, water use efficiency and better nutrient uptake in tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1191967>
- Jiménez-Suancha, S. C., Álvaro S., O. H., & Balaguera-López, H. E. (2015). Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus* L. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 149. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3753>
- Juenger, T., & Verslues, P. (2023). Time for a drought experiment: Do you know your plants' water status? In *The Plant Cell* (Vol. 35, Issue 1). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac324>
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., Łukasik, I., Goltsev, V., & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. In *Acta Physiologiae Plantarum* (Vol. 38, Issue 4). Polish Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>
- Kanazawa, A., Chattopadhyay, A., Kuhlert, S., Tuitupou, H., Maiti, T., & Kramer, D. M. (2021). Light potentials of photosynthetic energy storage in the field: what limits the ability to use or dissipate rapidly increased light energy? *Royal Society Open Science*, 8(12). <https://doi.org/10.1098/rsos.211102>
- Kaur, G., & Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. In *Biologia Plantarum* (Vol. 61, Issue 2, pp. 201–209). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0700-9>

- Keyvan, S. (2010). The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. In *Journal of Animal & Plant Sciences* (Vol. 8). <http://www.biosciences.elewa.org/JAPS>;
- Kim, J., & Daadi, M. M. (2019). Bioinformatics analysis of single-cell RNA-seq raw data from iPSC-derived neural stem cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1919, pp. 145–159). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9007-8_11
- Kramer, D. M., Cruz, J. A., & Kanazawa, A. (2003). *Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient*. <http://plants.trends.com>
- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., Roth, M. G., Bi, K., TerAvest, D., Weebadde, P., & Kramer, D. M. (2016). MultispeQ Beta: A tool for large-scale plant phenotyping connected to the open photosynQ network. *Royal Society Open Science*, 3(10). <https://doi.org/10.1098/rsos.160592>
- Lawlor, D. W. (2001). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 773–787. <https://academic.oup.com/jxb/article/53/370/773/2908378>
- Leiva-Ampuero, A., Agurto, M., Matus, J. T., Hoppe, G., Huidobro, C., Inostroza-Blancheteau, C., Reyes-Díaz, M., Stange, C., Canessa, P., & Vega, A. (2020). Salinity impairs photosynthetic capacity and enhances carotenoid-related gene expression and biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom). *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.9742>
- Li, C., Yang, Z., Zhang, C., Luo, J., Zhang, F., & Qiu, R. (2023). Effects of Nitrogen Application in Recovery Period after Different High Temperature Stress on Plant Growth of Greenhouse Tomato at Flowering and Fruiting Stages. *Agronomy*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy13061439>
- Li, S., Yang, L., Huang, X., Zou, Z., Zhang, M., Guo, W., Addo-Danso, S. D., & Zhou, L. (2023). Mineral Nutrient Uptake, Accumulation, and Distribution in *Cunninghamia lanceolata* in Response to Drought Stress. *Plants*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/plants12112140>
- Liao, Y., & Shi, W. (2020). Read trimming is not required for mapping and quantification of RNA-seq reads at the gene level. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(3). <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa068>
- Liu, M., Zhao, G., Huang, X., Pan, T., Chen, W., Qu, M., Ouyang, B., Yu, M., & Shabala, S. (2023). Candidate regulators of drought stress in tomato revealed by comparative transcriptomic and proteomic analyses. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1282718>

- Liu, X. Y., Koba, K., Makabe, A., & Liu, C. Q. (2014). Nitrate dynamics in natural plants: Insights based on the concentration and natural isotope abundances of tissue nitrate. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00355>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Luo, L., Zhang, Y., & Xu, G. (2020). How does nitrogen shape plant architecture? In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Issue 15, pp. 4415–4427). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa187>
- Machado, J., Fernandes, A. P. G., Fernandes, T. R., Heuvelink, E., Vasconcelos, M. W., & Carvalho, S. M. P. (2021). Drought and nitrogen stress effects and tolerance mechanisms in tomato: A review. In *Plant Nutrition and Food Security in the Era of Climate Change* (pp. 315–359). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822916-3.00014-7>
- Machado, J., Heuvelink, E., Vasconcelos, M. W., Cunha, L. M., Finkers, R., & Carvalho, S. M. P. (2023a). Exploring tomato phenotypic variability under combined nitrogen and water deficit. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06023-5>
- Machado, J., Heuvelink, E., Vasconcelos, M. W., Cunha, L. M., Finkers, R., & Carvalho, S. M. P. (2023b). Exploring tomato phenotypic variability under combined nitrogen and water deficit. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06023-5>
- Machado, J., Heuvelink, E., Vasconcelos, M. W., Cunha, L. M., Finkers, R., & Carvalho, S. M. P. (2023c). Exploring tomato phenotypic variability under combined nitrogen and water deficit. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06023-5>
- Mihalache, G., Peres, C. I., Bodale, I., Achitei, V., Gheorghitoaie, M. V., Teliban, G. C., Cojocaru, A., Butnariu, M., Muraru, V., & Stoleru, V. (2020). Tomato crop performances under chemical nutrients monitored by electric signal. *Agronomy*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy10121915>
- Morales-Navarro, S., Pérez-Díaz, R., Ortega, A., de Marcos, A., Mena, M., Fenoll, C., González-Villanueva, E., & Ruiz-Lara, S. (2018). Overexpression of a SDD1-like gene from wild tomato decreases stomatal density and enhances dehydration avoidance in arabidopsis and cultivated tomato. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00940>
- Nasir, M. U., Hussain, S., & Jabbar, S. (2015). Tomato processing, lycopene and health benefits: A review. In *SCIENCE LETTERS* (Vol. 3).

- Nemeskéri, E., Neményi, A., Bocs, A., Pék, Z., & Helyes, L. (2019). Physiological factors and their relationship with the productivity of processing tomato under different water supplies. *Water (Switzerland)*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/w11030586>
- Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., & Casaretto, J. A. (2010). The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell and Environment*, 33(12), 2191–2208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02220.x>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue MAR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Patanè, C., Cosentino, S. L., Romano, D., & Toscano, S. (2022). Relative Water Content, Proline, and Antioxidant Enzymes in Leaves of Long Shelf-Life Tomatoes under Drought Stress and Rewatering. *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223045>
- Pérez-Molina, J. P., Castro Lara, R., Portuguese Brenes, I., Araya Trejos, V., & Quesada Traña, A. (2020). Chlorophyll fluorescence and biomass partitioning within light and nitrogen deficiency: An example of the use of the R programming language for teaching. *UNED Research Journal*, 12(1), e2629. <https://doi.org/10.22458/urj.v12i1.2629>
- Pirone, R., Frugis, G., Locatelli, F., Mattana, M., Genga, A., & Baldoni, E. (2023). Transcriptomic analysis reveals the gene regulatory networks involved in leaf and root response to osmotic stress in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1155797>
- Pitaloka, M. K., Caine, R. S., Hepworth, C., Harrison, E. L., Sloan, J., Chutteang, C., Phunthong, C., Nongngok, R., Toojinda, T., Ruengphayak, S., Arikrit, S., Gray, J. E., & Vanavichit, A. (2022). Induced Genetic Variations in Stomatal Density and Size of Rice Strongly Affects Water Use Efficiency and Responses to Drought Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.801706>
- Rhee, S. Y., Beavis, W., Berardini, T. Z., Chen, G., Dixon, D., Doyle, A., Garcia-Hernandez, M., Huala, E., Lander, G., Montoya, M., Miller, N., Mueller, L. A., Mundodi, S., Reiser, L., Tacklind, J., Weems, D. C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., ... Zhang, P. (2003). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): A model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 31, Issue 1, pp. 224–228). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg076>
- Roşca, M., Mihalache, G., & Stoleru, V. (2023). Tomato responses to salinity stress: From morphological traits to genetic changes. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118383>

- Ruggiero, A., Punzo, P., Van Oosten, M. J., Cirillo, V., Esposito, S., Costa, A., Maggio, A., Grillo, S., & Batelli, G. (2022). Transcriptomic and splicing changes underlying tomato responses to combined water and nutrient stress. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.974048>
- Sakoda, K., Yamori, W., Shimada, T., Sugano, S. S., Hara-Nishimura, I., & Tanaka, Y. (2020). Higher Stomatal Density Improves Photosynthetic Induction and Biomass Production in *Arabidopsis* Under Fluctuating Light. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589603>
- Salinas-Cornejo, J., Madrid-Espinoza, J., Verdugo, I., Pérez-Díaz, J., Martín-Davison, A. S., Norambuena, L., & Ruiz-Lara, S. (2021). Article the exocytosis associated snap25-type protein, slsnap33, increases salt stress tolerance by modulating endocytosis in tomato. *Plants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/plants10071322>
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Haleem Abdul-Wajid, H., & Leonardo Battaglia, M. (2021). *plants Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects*. <https://doi.org/10.3390/plants>
- Soto, J., Aparicio, J., Darghan, A., & Urban, M. O. (2023). RankspeQ: An R package platform for genotype characterization and performance-ranking based on MultispeQ measurements. *SoftwareX*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2023.101544>
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W., & Su, Z. (2017). AgriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W122–W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx382>
- Ullah, I., Mao, H., Rasool, G., Gao, H., Javed, Q., Sarwar, A., & Khan, M. I. (2021). Effect of deficit irrigation and reduced n fertilization on plant growth, root morphology and water use efficiency of tomato grown in soilless culture. *Agronomy*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy11020228>
- Useche-Carrillo, N. V., Ayala-Arreola, J., Campos-Rojas, E., & Barrientos-Priego, A. F. (2022). Relationships between stomatal and gas exchange characteristics of the leaf blade in ‘Colín V-33’ avocado seedlings. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 28(3), 133–144. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2021.05.008>
- Vega, A., Canessa, P., Hoppe, G., Retamal, I., Moyano, T. C., Canales, J., Gutiérrez, R. A., & Rubilar, J. (2015a). Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum*

- lycopersicum. *Frontiers in Plant Science*, 6(NOVEMBER).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00911>
- Vega, A., Canessa, P., Hoppe, G., Retamal, I., Moyano, T. C., Canales, J., Gutiérrez, R. A., & Rubilar, J. (2015b). Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science*, 6(NOVEMBER).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00911>
- Viger, M., Smith, H. K., Cohen, D., Dewoody, J., Trewin, H., Steenackers, M., Bastien, C., & Taylor, G. (2016). Adaptive mechanisms and genomic plasticity for drought tolerance identified in European black poplar (*Populus nigra* L.). *Tree Physiology*, 36(7), 909–928.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpw017>
- Wang, M., Shen, Q., Xu, G., & Guo, S. (2014). New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 310, pp. 1–37). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00001-3>
- Wang, N., Fu, F., Wang, H., Wang, P., He, S., Shao, H., Ni, Z., & Zhang, X. (2021). Effects of irrigation and nitrogen on chlorophyll content, dry matter and nitrogen accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95792-z>
- Xiong, X., Chang, L., Khalid, M., Zhang, J., & Huang, D. (2018). Alleviation of Drought Stress by Nitrogen Application in *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* L. *Agronomy*, 8(5).
<https://doi.org/10.3390/agronomy8050066>
- Xu, Z. Z., & Zhou, G. S. (2006). Nitrogen metabolism and photosynthesis in *Leymus chinensis* in response to long-term soil drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(3), 252–266.
<https://doi.org/10.1007/s00344-006-0043-4>
- Xu, Z., & Zhou, G. (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3317–3325.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern185>
- Yan, S., Weng, B., Jing, L., & Bi, W. (2023). Effects of drought stress on water content and biomass distribution in summer maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118131>
- Yáñez, M., Cáceres, S., Orellana, S., Bastías, A., Verdugo, I., Ruiz-Lara, S., & Casaretto, J. A. (2009). An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes. *Plant Cell Reports*, 28(10), 1497–1507.
<https://doi.org/10.1007/s00299-009-0749-4>

- Yang, L., Bu, S., Zhao, S., Wang, N., Xiao, J., He, F., & Gao, X. (2022). Transcriptome and physiological analysis of increase in drought stress tolerance by melatonin in tomato. *PLoS ONE*, 17(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267594>
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant Journal*, 61(4), 672–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x>
- Zhao, L., Liu, F., Crawford, N. M., & Wang, Y. (2018). Molecular regulation of nitrate responses in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19072039>
- Zhao, Y., Li, M. C., Konaté, M. M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., Williams, P. M., Evrard, Y. A., Doroshov, J. H., & McShane, L. M. (2021). TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02936-w>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01079>