



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR
DEL CcNRT2.1 POSIBLE TRANSPORTADOR DE
NITRATO DE ALTA AFINIDAD DE CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)”**

Tesis que presenta

M. C. Marta Guadalupe Lizama Gasca

En opción al título de

DOCTORADO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Marta Guadalupe Lizama Gasca** titulado “**Caracterización bioquímica y molecular del CcNRT2.1 posible transportador de nitrato de alta afinidad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)**” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Ileana Echevarría Machado**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 26 de Noviembre de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: M. C. Marta Guadalupe Lizama Gasca

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y forma parte del proyecto 169041 titulado “Estudio de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que contribuyen a la variabilidad en la respuesta del sistema radical a distintas fuentes de nitrógeno en *Capsicum chinense* Jacq.” bajo la dirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de tesis no lo puedo describir como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo disfrute de cada momento, investigación, proyectos y procesos que se realizaron dentro de esta, en verdad los conocimientos y las experiencias aprendidas durante estos cuatro años dejan un gran sabor de boca en mi vida. Por esto mismo, mediante estos agradecimientos, quiero exaltar la labor de todos aquellos que estuvieron presentes durante toda o la mayor parte de la realización y desarrollo de esta tesis, gracias a aquellos que con respeto y dedicación realizaron aportes a esta, de corazón gracias.

Primero agradezco a Dios por la vida que me ha brindado, por que día a día me demuestra lo hermosa y justa que puede llegar a ser. Gracias por permitirme vivir y disfrutar cada día.

Gracias a mi familia por creer en mí y apoyarme en cada decisión y proyecto que he decidido emprender, gracias por ser mi fortaleza y lo constante en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 242990, gracias a la cual pude llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. por el apoyo brindado durante estos cuatro años de mi formación académica.

A mi familia, de manera muy especial a mis padres, Rosario y Manuel, por su esfuerzo, dedicación, sacrificio y amor inagotable hacia mí, gracias por guiarme y educarme en los buenos principios, por enseñarme a valorar las cosas y las personas que tengo a mi alrededor y por saber estar conmigo siempre y a cada momento.

A mis hermanos, Rosario, Manuel, Samuel y Mónica, por sus consejos y animos para lograr mis objetivos y por hacer de este camino algo más ameno. Gracias por su amor y por todos esos buenos momentos que valen más que todo el oro del mundo.

A mi asesora la Dra. Ilenana Echevarría Machado, por su dedicación, paciencia conocimientos y experiencia enseñados y compartidos durante estos años de mi formación académica. Mil gracias por ser la persona que ha sido conmigo. Gracias por las pláticas y

los consejos, gracias por siempre demostrarme su aprecio, el cual sabe que es mutuo. Gracias por ayudarme a crecer en lo académico y en lo personal. Gracias infinitas por todo, por que sin usted todo lo logrado en este trabajo de investigación no hubiera sido posible.

A mi comité tutorial, el Dr. José Lopez Bucio, el Dr. Manuel Martínez Estévez y el Dr. Enrique Castaño de la Serna, por todos sus conocimientos y consejos brindados durante mi formación doctoral, sinceramente gracias.

A mis revisores de tesis la Dra. Georgina Estrada Tapia, la Dra. Ana Luisa Ramos, la Dra. Virginia Herrera Valencia, el Dr. Manuel Martínez Estévez, el Dr. Enrique Castaño de la Serna y el Dr. René Garruña Hernández, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A mis amigos, que son parte fundamental de mi vida, gracias por siempre estar.

A mis amigos del laboratorio 07, Anahí, Federico, Fabiola, Manuel, Helberth, Angel, Eduardo, Jafet y Fátima, gracias por todos los buenos momentos pasados.

A la M. C. Fátima Medina Lara y el M. C. Ramón Souza, por el apoyo brindado durante el transcurso de este proyecto.

Y por último, pero no menos importante, a mi esposo Camilo, que ha sabido ser mi mejor amigo, mi cómplice, mi confidente, mi paño de lagrimas y mi compañero de vida, gracias por estar siempre conmigo en los momentos que más lo he necesitado, gracias por pasar desvelos conmigo cuando tenía que trabajar durante la noche y la madrugada, gracias por desvelarte cuando se acercaban los tutorales y por ensayar conmigo mis presentaciones, gracias por todo, porque eres y siempre serás parte importante en mi vida.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi familia, a mis padres, Rosario y Manuel; a mis hermanos Rosario, Manuel, Samuel y Mónica; a mis sobrinos Samuel, Diego, Leonardo, Emiliano, Esteban, Jesus, Rosana y Rebeca; y a mi compañero de vida, mi esposo Camilo. El camino no ha sido sencillo hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha sentido menos. Les agradezco y hago presente mi cariño hacia ustedes, mi hermosa y amada familia.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | i |
| CAPÍTULO I | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 1 |
| 1.1. FORMAS DE N EN EL SUELO Y SU ORIGEN. IMPACTO SOBRE LAS PLANTAS | 1 |
| 1.1.1. EL NITRATO EN EL SUELO | 1 |
| 1.1.2. DESTINOS DEL NITRATO EN LA PLANTA..... | 2 |
| 1.1.3. TRANSPORTE DE NITRATO EN EUCARIOTAS..... | 5 |
| 1.2.1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE NITRATO DE ALTA AFINIDAD DE DOS COMPONENTES..... | 8 |
| 1.3.1. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NITRATO A NIVEL TRANSCRIPCIONAL..... | 11 |
| 1.3.1.1. REGULACIÓN A NIVEL POSTRADUCCIONAL | 13 |
| 1.4.1. SISTEMAS DE EXCRECIÓN DE NITRATO | 14 |
| 1.5.1. FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NITRATO EN LA PLANTA..... | 15 |
| 1.6.1. MODELO DE ESTUDIO: CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.)..... | 20 |
| 1.6.1.1. ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES | 21 |
| 1.6.1.2. RESPUESTA RADICULAR DE CHILE HABANERO A FUENTES DE NITRÓGENO | 22 |
| 1.6.1.3. TRANSPORTADORES DE NITRATO EN CHILE HABANERO | 23 |
| HIPÓTESIS | 26 |
| JUSTIFICACIÓN | 26 |
| OBJETIVO GENERAL | 27 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |

| | |
|---|----|
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 28 |
| CAPÍTULO II..... | 29 |
| CLONACIÓN DEL ADNc TOTAL Y ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LA PROTEÍNA ACCESORIA CcNAR2 DE CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.) | 29 |
| 2.1. INTRODUCCIÓN | 29 |
| 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO | 30 |
| 2.2.2. CLONACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS GENES <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 31 |
| 2.2.3. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 32 |
| 2.2.4. LOCALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA | 34 |
| 2.2.5. EFECTO DEL TIEMPO DE FOTOPERÍODO SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 34 |
| 2.2.6. EFECTO DE LOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 35 |
| 2.2.6.1. EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA..... | 35 |
| 2.2.6.2. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> EN RESPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NO ₃ ⁻ | 35 |
| 2.2.6.3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE SACAROSA SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 36 |
| 2.2.6.4. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 36 |
| 2.2.6.4.1. INTENSIDAD DE LUZ..... | 36 |
| 2.2.7. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> EN DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 2.2.8. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 37 |
| 2.2.9. ESTIMACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE NO_3^- MEDIANTE EL CAMBIO EN EL PH APOPLÁSTICO DE LAS DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ DE CHILE HABANERO..... | 39 |
| 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 2.3.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS NAR2 DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ..... | 41 |
| 2.3.1.1. PERFIL DE HIDROFOBICIDAD DE LAS PROTEÍNAS <i>CcNAR2</i> DE CHILE HABANERO..... | 42 |
| 2.3.1.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> | 43 |
| 2.3.1.3. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS NRT2 Y NAR2..... | 44 |
| 2.3.1.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO SOBRE LA POSIBLE INTERACCIÓN <i>CcNRT2.1</i> - <i>CcNAR2</i> | 51 |
| 2.3.1.5. DISEÑO DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE LAS PROTEÍNAS <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2_C1</i> | 57 |
| 2.3.2. LOCALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA..... | 60 |
| 2.3.3. EFECTO DEL TIEMPO DE FOTOPERÍODO SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNAR2</i> | 62 |
| 2.3.4. EFECTO DE LA FUENTE DE N SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNAR2</i> | 63 |
| 2.3.5. EFECTO DE LA SACAROSA SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNAR2</i> | 65 |
| 2.3.6. EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNAR2</i> | 67 |
| 2.3.7. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> EN RAÍCES DE CHILE HABANERO..... | 68 |
| 2.3.8. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcNRT2.1</i> Y <i>CcNAR2</i> A LO LARGO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO..... | 70 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO III..... | 75 |
| CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA CcNRT2.1 Y SU RELACIÓN CON EL FLUJO NETO DE H ⁺ EN RAÍCES DE CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.) | |
| 3.1. INTRODUCCIÓN | 75 |
| 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 76 |
| 3.2.1. MATERIAL VEGETAL | 76 |
| 3.2.2. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS, GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS | 76 |
| 3.2.3. TRATAMIENTOS DE NITRATO | 76 |
| 3.2.4. INMUNODETECCIÓN DE CcNRT2.1 EN DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO | 77 |
| 3.2.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 78 |
| 3.2.6. SOLUBILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON DETERGENTE | 79 |
| 3.2.7. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CONTENIENDO DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) | 79 |
| 3.2.8. INMUNODETECCIÓN DE CcNRT2.1 | 80 |
| 3.2.9. INMUNOLocalIZACIÓN DE CcNRT2.1 EN LA RAÍZ DE CHILE HABANERO..... | 80 |
| 3.2.10. ABSORCIÓN NETA DE NITRATO..... | 81 |
| 3.2.11. CONTENIDO DE NITRATO EN LAS DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO | 81 |
| 3.2.12. ESTIMACIÓN DEL FLUJO NETO DE H ⁺ EN RAÍCES DE CHILE HABANERO EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE NO ₃ ⁻ MEDIANTE ESTIMACIÓN DE FLUJO DE IONES POR MICROELECTRODOS (MIFE) | 82 |
| 3.3. RESULTADOS | 84 |
| 3.3.1. INMUNODETECCIÓN DE CcNRT2.1 EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NO ₃ ⁻ | |

| | |
|---|-----|
| | 84 |
| 3.3.2. INMUNODETECCIÓN DE CcNRT2.1 EN TODOS LOS ÓRGANOS DE LA PLANTA DE CHILE HABANERO | 93 |
| 3.3.3. INMUNODETECCIÓN DE CcNRT2.1 EN LAS DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO | 95 |
| 3.3.4. LOCALIZACIÓN CELULAR Y SUBCELULAR DE CcNRT2.1..... | 97 |
| 3.3.5. ABSORCIÓN NETA DE NITRATO EN LAS DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA..... | 98 |
| 3.3.6. CONTENIDO DE NITRATO EN LAS DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA..... | 99 |
| 3.3.7. EFECTO DEL NO ₃ ⁻ SOBRE EL FLUJO DE H ⁺ EN LAS DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.) MEDIANTE ESTIMACIÓN DE FLUJO DE IONES POR MICROELECTRODOS (MIFE)..... | 100 |
| CAPÍTULO IV | 104 |
| DISCUSIÓN GENERAL | 104 |
| CAPÍTULO V | 116 |
| 5.1. CONCLUSIONES GENERALES | 116 |
| 5.2. PERSPECTIVAS..... | 118 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 119 |
| ANEXO | 151 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Ruta de asimilación del nitrato..... | 3 |
| Figura 1.2. Transportadores de nitrato en la membrana plasmática..... | 11 |
| Figura 1.3. Localización de las proteínas NRT en Arabidopsis..... | 17 |
| Figura. 1.4. Secuencia de aminoácidos deducida de CcNRT2.1..... | 24 |
| Figura 1.5. Topología sugerida para el transportador CcNRT2.1..... | 25 |
| Figura 2.1. Topología predicha para la proteína CcNAR2..... | 42 |
| Figura. 2.2. Árboles filogenéticos de los transportadores de nitrato de alta afinidad (NRT2) y las proteínas relacionadas con la asimilación de nitrato (NAR2)..... | 45 |
| Figura. 2.3. Interacción CcNRT2-CcNAR2 <i>in silico</i> | 52 |
| Figura. 2.4. Alineamiento de la secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas CcNAR2_C1, CcNAR2_C2 y CcNAR2_C3 con otras proteínas NAR2 en las que se ha demostrado su interacción con proteínas NRT2..... | 55 |
| Figura. 2.5. Modelo de la topología del transportador CcNAR2_C1..... | 56 |
| Figura 2.6. Dominios transmembranales predichos de la proteína CcNRT2.1..... | 58 |
| Figura 2.7. Modelamiento de la estructura tridimensional de CcNRT2.1 y CcNAR2_C1... | 59 |
| Figura 2.8. Localización de los niveles de transcritos de CcNRT2.1 y CcNAR2 en los diferentes órganos de la planta..... | 61 |
| Figura. 2.9. Cambios en los niveles de transcritos de CcNAR2 durante un período de fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad..... | 63 |
| Figura. 2.10. Efecto de la fuente nitrogenada sobre los niveles de transcritos de CcNAR2..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura. 2.11. Efecto del suministro de sacarosa sobre los niveles de transcritos de <i>CcNAR2</i> en las raíces de chile habanero..... | 65 |
| Figura. 2.12. Efecto de la intensidad de luz sobre los niveles de transcritos de <i>CcNAR2</i> | 67 |
| Figura 2.13. Efecto de diferentes concentraciones de nitrato sobre los niveles de expresión de los genes <i>CcNRT2.1</i> y <i>CcNAR2</i> | 69 |
| Figura. 2.14. Localización de los niveles de transcritos de <i>CcNRT2.1</i> y <i>CcNAR2</i> a lo largo de la raíz primaria de chile habanero. Plántulas de <i>Capsicum chinense</i> Jacq..... | 71 |
| Figura. 2.15. Toma de nitrato en las diferentes zonas de la raíz. A), Modelo de la toma de nitrato..... | 72 |
| Figura. 3.1. Secuencia del péptido sintético diseñado para generar anticuerpos contra <i>CcNRT2.1</i> | 84 |
| Figura. 3.2. Inmunodetección de <i>CcNRT2.1</i> en tejido de chile habanero..... | 85 |
| Figura. 3.3. Regulación de los niveles de <i>CcNRT2.1</i> en respuesta a diferentes concentraciones de nitrato..... | 86 |
| Figura. 3.4. Determinación de la especificidad del α -1°4557..... | 87 |
| Figura. 3.5. Efecto de la aplicación de diferentes clases de detergentes sobre la inmunodetección de <i>CcNRT2.1</i> a partir de extracto citosólico de raíz..... | 89 |
| Figura. 3.6. Efecto de la solubilización de las proteínas membranales con diferentes clases de detergentes sobre la inmunodetección de <i>CcNRT2.1</i> | 90 |
| Figura. 3.7. Efecto de la dosis de Tritón X-100 sobre la solubilización y detección de <i>CcNRT2.1</i> a partir de extractos membranales de raíz..... | 92 |
| Figura. 3.8. Inmunodetección de <i>CcNRT2.1</i> en todos los órganos de la planta de chile habanero..... | 94 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3.9. Inmunodetección de CcNRT2.1 en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero..... | 96 |
| Figura 3.10. Localización celular y subcelular de CcNRT2.1 en la raíz primaria de chile habanero..... | 97 |
| Figura 3.11. Absorción neta de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero..... | 98 |
| Figura 3.12. Contenido total de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero..... | 100 |
| Figura 3.13. Efecto del KNO_3^- sobre el flujo neto de H^+ en las diferentes zonas de las raíces de <i>Capsicum chinense</i> Jacq..... | 102 |

LISTADO DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1.1. Relación de las proteínas NAR2 que han sido caracterizadas funcionalmente | 9 |
| Cuadro 1.2. Proteínas NRT2 caracterizadas funcionalmente | 18 |
| Cuadro 2.1. Análisis de identidad de las clonas de NAR2 de chile habanero (CcNAR2_C1, CcNAR2_C2 y CcNAR2_C3) con sus homologos en <i>Solanaceaes</i> | 41 |
| Cuadro 2.2. Localización subcelular <i>in silico</i> de CcNRT2.1 y CcNAR2 de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)..... | 44 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|--|
| Aa | Aminoácidos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleíco |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleíco complementario |
| ARN | Ácido ribonucleíco |
| AtNRT | Transportador de nitrato de alta afinidad de <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| C/N | Balance carbono-nitrógeno |
| <i>C. chinense</i> | <i>Capsicum chinense</i> |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| HATS | Sistema de transporte de alta afinidad |
| chATS | Transportador de alta afinidad expresado de manera constitutiva |
| iHATS | Transportador de baja afinidad expresado de manera inducible |
| LATS | Sistema de transporte de baja afinidad |
| MFS | Super familia de transportadores |
| N | Nitrógeno |
| NAR2 | Proteína Accesoria Relacionada al Transporte de Nitrato |
| NH ₄ ⁺ | Amonio |
| NNP | Nitrite Nitrate Porter |
| NO ₃ ⁻ | Nitrato |
| NiR | Nitrito reductasa |

| | |
|--------|--|
| NRT1.1 | Transportador de nitrato de baja afinidad |
| NRT2.1 | Transportador de nitrato de alta afinidad |
| NR | Nitrato reductasa |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| POT | Transportadores de oligopéptidos |
| PTR | Peptide transporter |
| PTGS | Silenciamiento postranscripcional de genes |
| p/v | Peso/volumen |
| RL | Raíz lateral |
| RP | Raíz primaria |
| RT | Transcripción reversa |

RESUMEN

El nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) son las dos principales fuentes de nitrógeno inorgánico (NI) para las plantas, siendo el primero la fuente primaria de nitrógeno (N) en los suelos bien aireados. El NO_3^- también actúa como una molécula señal para romper la dormancia de semillas, inducir la expansión de las hojas, regular el desarrollo de raíces laterales y coordinar la expresión de genes relacionados con nitrato. La planta con el fin de utilizar de manera eficiente el NO_3^- y regular con precisión su desarrollo, modula de manera perfecta, la toma y distribución de este nutrimento. Para adquirir nitrato eficientemente del suelo, las plantas han desarrollado dos sistemas de toma de NO_3^- : 1) un sistema de transporte de baja afinidad, integrado por proteínas del tipo NRT1 y 2) un sistema de transporte de alta afinidad, integrado por proteínas del tipo NRT2. La gran mayoría de los transportadores NRT2 funcionan como un sistema de dos componentes, asociados a las proteínas NAR2 (Nitrate Association Related Protein). En el género *Capsicum* no hay información relacionada con la regulación de las proteínas del tipo NRT2 y mucho menos información de la regulación de las proteínas NAR2 a nivel molecular y bioquímico. En un trabajo previo, se aisló un ADNc de chile habanero de aproximadamente 1953 pb (*CcNRT2.1*) que presentó una alta identidad con los transportadores de NO_3^- del tipo NRT2 y se observó que sus niveles de transcritos pueden ser regulados por NO_3^- , sacarosa, el ciclo de fotoperíodo y la luz. El objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímica y molecularmente a *CcNRT2.1*. También, se clonó a un ADNc que presentó una alta identidad con NAR2, para establecer la posible relación funcional entre estas proteínas durante el transporte de NO_3^- de alta afinidad en la raíz de chile habanero. Al hacer el análisis filogenético con la secuencia deducida de proteínas, se obtuvo que *CcNRT2.1* se ubica en un clado cercano a las proteínas de *Arabidopsis* caracterizadas previamente como transportadores de NO_3^- de alta afinidad que se expresan en la raíz y que funcionan acoplados a las proteínas NAR2. También, esta proteína fue detectada en la membrana de las células epidérmicas y corticales de la raíz de chile. Los datos *in silico*, soportan la interacción de estas dos proteínas, así como los niveles de transcritos, los cuales son inducidos de manera similar por nitrato, luz y concentración de sacarosa; además de la misma zona de la raíz. En este trabajo se reportan por primera vez para *Capsicum* resultados que sugieren la participación de las proteínas *CcNRT2.1* y *CcNAR2* como un sistema de transporte de NO_3^- de alta

afinidad, que parece participar en la coordinación del balance C/N para unir la absorción de NO_3^- con el metabolismo del C en la planta.

ABSTRACT

Nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) are the two main sources of inorganic nitrogen (NI) for plants, the former being the primary source of nitrogen (N) in well aerated soils. NO_3^- also acts as a signal molecule to break dormancy of seeds, induce leaf expansion, regulate the development of lateral roots and coordinate the expression of genes related to nitrate. The plant in order to efficiently use the NO_3^- and regulate its development with precision, modulates perfectly, the intake and distribution of this nutrient. To efficiently acquire NO_3^- from the soil, the plants have developed two NO_3^- intake systems: 1) a low affinity transport system, composed of NRT1 type proteins and 2) a high affinity transport system, composed of proteins of the type NRT2. The vast majority of NRT2 transporters function as a two-component system, associated with NAR2 proteins (Nitrate Association Related Protein). In the genus *Capsicum* there is no information related to the regulation of NRT2 type proteins and much less information on the regulation of NAR2 proteins at the molecular and biochemical level. In a previous work, a cDNA of habanero chile of approximately 1953 bp (CcNRT2.1) was isolated, which showed a high identity with NO_3^- transporters of the NRT2 type and it was observed that its transcript levels can be regulated by NO_3^- , sucrose, the photoperiod cycle and light. The objective of this work was to characterize biochemically and molecularly CcNRT2.1. Also, a cDNA that had a high identity with NAR2 was cloned to establish the possible functional relationship between these proteins during the transport of high affinity NO_3^- in the habanero pepper root. When doing the phylogenetic analysis with the deduced sequence of proteins, it was obtained that CcNRT2.1 is located in a clade close to the Arabidopsis proteins previously characterized as high affinity nitrate transporters that are expressed in the root and that work coupled to the NAR2 proteins. Also, this protein was detected in the membrane of the epidermal and cortical cells of the chili root. The data *in silico*, support the interaction of these two proteins, as well as the levels of transcripts, which are similarly induced by NO_3^- , light and sucrose concentration, in addition to the same area of the root. In this work we report for the first time for *Capsicum* results suggesting the participation of the proteins CcNRT2.1 and CcNAR2 as a high affinity NO_3^- transport system, which seems to participate in the coordination of the C/N balance to unite the absorption of NO_3^- with the metabolism of C in the plant.

INTRODUCCIÓN

El nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) son las dos principales fuentes de nitrógeno inorgánico (NI) para las plantas. En los suelos bien aireados, la nitrificación es rápida, y el NO_3^- es la fuente primaria de nitrógeno (N) (Crawford y Forde, 2002). Además de ser un nutriente esencial, el NO_3^- también actúa como una molécula señal para romper la dormancia de las semillas (Alboresi *et al.*, 2005), inducir la expansión de las hojas (Walch-Liu *et al.*, 2000), regular el desarrollo de raíces laterales (RL) (Zhang y Forde, 2000) y coordinar la expresión de genes relacionados con su captación y reducción, y con cambios en la arquitectura de la raíz (Ho *et al.*, 2009; Krouk *et al.*, 2010). Con el fin de utilizar el NO_3^- y regular con precisión su desarrollo, las plantas absorben y distribuyen este nutrimento de una manera eficiente desde la raíz hacia los tejidos fotosintéticos y reproductivos. Se han descrito cuatro familias de genes en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), que codifican transportadores de NO_3^- : NRT1/PTR (transportadores de NO_3^- / transportadores de péptidos, por sus siglas en inglés, con 53 miembros), NRT2 (siete miembros), CLC (canales de cloro, por sus siglas en inglés, con siete miembros) y SLAC1/SLAH (homólogos asociados al canal de aniones lento 1, con cinco miembros) (Dechorgnat *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Los sistemas de captación o toma de NO_3^- se agrupan en dos tipos: 1) un sistema de transporte de baja afinidad (LATS, por sus siglas en inglés) y 2) un sistema de transporte de alta afinidad (HATS, por sus siglas en inglés). Tres transportadores NRT2 (NRT2.1, NRT2.2 y NRT2.4) y dos transportadores NRT1 (resistente a clorato 1 [CHL1] y NRT1.2) localizados en la raíz de *Arabidopsis*, están involucrados en la toma de NO_3^- de alta afinidad. Mientras que la mayoría de los transportadores NRT1 son transportadores de NO_3^- de baja afinidad, CHL1 (NRT1.1) es un transportador de NO_3^- de afinidad dual, involucrado tanto en el sistema de transporte de alta como de baja afinidad (Tsay *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Por otra parte, CHL1 también actúa como un sensor de nitrato, responsable de la respuesta transcripcional regulada por este nutriente (Ho *et al.*, 2009). Mediante estudios realizados en una mutante que tenía desacoplada la capacidad de toma y la capacidad de percepción, se demostró que la actividad de transporte de NO_3^- no es requerida para la función de percepción de este nutriente de CHL1, por lo tanto CHL1 es por sí mismo un sensor de nitrato (Ho *et al.*, 2009). La fosforilación de la T101 en CHL1 es regulada por la concentración externa de NO_3^- y controla su actividad de transporte y señalización. Cuando la T101 es fosforilada, CHL1 actúa como sensor y transportador de

NO_3^- de alta afinidad, que soporta la respuesta primaria de NO_3^- de alta afinidad a bajas concentraciones de NO_3^- . Cuando la proteína CHL1 se desfosforila en ese residuo actúa como un transportador de NO_3^- de baja afinidad que conduce a una respuesta primaria de NO_3^- de baja afinidad a concentraciones altas de NO_3^- . Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que a bajas concentraciones de NO_3^- , la proteína cinasa CIPK23 puede fosforilar a la T101 de CHL1 para mantener una respuesta primaria de alta afinidad. Esto indica que CHL1 puede sentir un amplio rango de concentraciones de NO_3^- en el suelo y a través de una regulación por fosforilación puede cambiar su actividad de transporte y señalización, funcionando de ese modo como un receptor de este ión en las plantas superiores, siendo el único transceptor (receptor + transportador) hasta el momento caracterizado en las plantas (Liu y Tsay, 2003; Ho *et al.*, 2009).

Aunque hay cuatro genes (NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4 y CHL1) involucrados en el sistema de transporte de alta afinidad en *Arabidopsis*, cada uno de ellos hace una contribución única bajo determinadas condiciones (Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2002; Little *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Kiba *et al.*, 2012). De igual manera, se ha demostrado que la regulación de HATS está altamente relacionada con cambios en la acumulación de transcritos de *NRT2.1* en las raíces. Con más detalle, tanto la actividad de HATS de nitrato como la expresión de *NRT2.1*, son inducidos de manera similar por NO_3^- (Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Lejay *et al.*, 1999; Zhuo *et al.*, 1999), reprimidos por alto suministro de N a la planta (Lejay *et al.*, 1999; Zhuo *et al.*, 1999; Cerezo *et al.*, 2001; Gansel *et al.*, 2001), y por oscuridad (Lejay *et al.*, 1999) y estimulados por un suministro de azúcar a las raíces (Lejay *et al.*, 2003, 2008). Por esta razón, se ha hipotetizado que el control transcripcional de *NRT2.1* es un mecanismo importante para la regulación de los HATS de NO_3^- en *Arabidopsis* (Forde, 2002; Miller *et al.*, 2007; Gojon *et al.*, 2009; Girin *et al.*, 2010).

Sin embargo, varios reportes han señalado que los transportadores NRT2 podrían estar fuertemente regulados a nivel postraduccional (Fraisier *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Ishikawa *et al.*, 2009). Estos datos cuestionan el papel de la transcripción de *NRT2.1* como un proceso importante para la regulación de la toma de NO_3^- en las raíces y sugieren que los eventos postraduccionales afectan la abundancia y la actividad de la proteína NRT2.1, ocasionando un impacto mayor en la funcionalidad de los HATS. Little y colaboradores (2005), demostraron que AtNRT2.1 es esencial para la represión de la iniciación de RL bajo condiciones de crecimiento con alta concentración de

sacarosa y baja concentración de NO_3^- . CHL1 es otra proteína importante para regular el desarrollo de las raíces y la expresión de genes relacionados con NO_3^- . Esto se demostró mediante el uso de la mutante *nrt1.1*, los resultados obtenidos sugieren que esta proteína se encuentra implicada directa o indirectamente en la señalización de NO_3^- que conduce a la estimulación de la formación de RL, preferentemente cuando el NO_3^- se encuentra en concentraciones μM (Remans *et al.*, 2006).

Las plantas se encuentran expuestas a diferentes condiciones ambientales, que ocasiona que modifiquen sus mecanismos de regulación, para que puedan enfrentar y adaptarse a estos cambios. Entre estas modificaciones se encuentran la activación de ciertas proteínas, como las proteínas transportadoras de alta afinidad de NO_3^- . En la planta modelo *Arabidopsis* se ha demostrado que estas proteínas toman NO_3^- cuando éste se encuentra en concentraciones menores a 1 mM en el suelo (Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007). En el género *Capsicum* no se ha investigado la función de proteínas homólogas a NRT2 (Lizama-Gasca, 2012). En un trabajo previo se aisló un ADNc de raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de aproximadamente 1953 pb de longitud, al cual se le nombró CcNRT2.1 por su alta identidad con AtNRT2.1. Sin embargo, esta proteína no ha sido caracterizada funcionalmente, ni se ha reportado y caracterizado otra dentro de esta familia en las solanaceas. Por lo tanto, el objetivo este trabajo es caracterizar bioquímica y funcionalmente a CcNRT2.1 de chile habanero como una posible proteína transportadora de NO_3^- de alta afinidad.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Formas de N en el suelo y su origen. Impacto sobre las plantas

El N es cuantitativamente el nutriente inorgánico más importante para las plantas y es un elemento básico para la síntesis de aminoácidos y proteínas (Ruffel *et al.*, 2014). El N utilizado por las plantas no está uniformemente distribuido en el suelo y generalmente es un factor limitante en el ecosistema. Este macronutriente se puede encontrar en forma inorgánica (NO_3^- y NH_4^+) y orgánica (aminoácidos, urea, pequeños péptidos, etc). En la mayoría de los ecosistemas con clima templado y en suelos cultivables (excepto en ecosistemas fríos y pobres en N), las plantas, hongos y bacterias asociadas toman NH_4^+ y NO_3^- preferencialmente a los aminoácidos u otras moléculas que contienen N (Jackson *et al.*, 2008). El NH_4^+ y NO_3^- son las principales fuentes de N tomadas por las raíces y regulan de manera importante la expresión de genes, la transferencia de energía, la activación de proteínas, así como procesos fisiológicos y metabólicos (Ruiz Herrera *et al.*, 2015). A continuación se describe más detalladamente una de las formas principales de N para las plantas, el NO_3^- .

1.1.1. El NO_3^- en el suelo

La gran mayoría del N total en el suelo (>98%) es materia orgánica, que en su mayoría no está directamente disponible para las plantas. Únicamente una fracción muy pequeña de este N total se encuentra en forma inorgánica. Esta conversión inorgánica (de NH_4^+ a NO_2^- y entonces a NO_3^-) ocurre mediante procesos biológicos donde participan microorganismos del suelo. Generalmente en suelos aireados, predomina el NO_3^- que puede lixiviarse si no es absorbido por las raíces de las plantas o utilizado por los microorganismos. Debido a esto, el coeficiente de difusión para el NO_3^- es muy alto ($2.82 \times 10^{-1} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). La concentración de NO_3^- en la solución del suelo es muy variable, tanto espacial como temporalmente (Miller *et al.*, 2007), y esto depende mucho del tipo de suelo, de la adición de fertilizantes, la actividad microbiana, etc. (Dechorgnat *et al.*, 2011; Wolt, 1994). Sus

concentraciones fluctúan entre 20 y 70 mM (Tynker y Nye, 2000) y es más móvil (varios mm por día; Gregory, 2006) comparado con el NH_4^+ (adsorbido en los sitios de intercambio catiónico del suelo). Bajo condiciones climáticas templadas, el NO_3^- es la principal fuente de N para las plantas y es tomado desde la solución del suelo por proteínas transportadoras que se encuentran en las células de la raíz. Sin embargo, varios factores internos y ambientales pueden limitar la adquisición de NO_3^- por la planta. De igual manera, la toma de NO_3^- por las raíces también depende de muchos otros procesos fisiológicos en la planta (ej. su asimilación, la adquisición de otros nutrientes, el crecimiento, etc.) que pueden prevenir el uso óptimo de los recursos disponibles de NO_3^- a la planta (Miller *et al.*, 2007). Por lo tanto, las plantas deben modular constantemente la eficiencia de la captación de NO_3^- de la raíz, para compensar las fluctuaciones de disponibilidad de NO_3^- externo (Dechorgnat *et al.*, 2011).

1.1.2. Destinos del NO_3^- en la planta

Plantas, hongos filamentosos, algas, bacterias y levaduras son capaces de incorporar el N a partir del NO_3^- , a través de un mecanismo de reducción de este compuesto (Lea y Leegood, 1993). La vía de reducción de NO_3^- está altamente conservada en los diferentes organismos capaces de utilizarlo como única fuente de N. Fundamentalmente, consta de tres pasos secuenciales; en el primer paso la enzima nitrato reductasa reduce el NO_3^- a nitrito (NO_2^-), el NO_2^- a su vez es reducido a NH_4^+ por la nitrito reductasa en el segundo paso. En el tercer paso, este NH_4^+ es utilizado para la síntesis de aminoácidos mediante la acción de la glutamato deshidrogenasa y la glutamina sintasa (Fig. 1.1) (Magasanik y Kaiser, 2002). El NAD(P)H, proveniente fundamentalmente de la vía de las pentosas fosfato, es el donador de electrones más frecuente en estas reacciones (Bruinenberg *et al.*, 1983).

El uso del NO_3^- como fuente de N implica un gasto energético inmenso como consecuencia de: a) su transporte al interior celular en contra del gradiente electroquímico; b) la conversión del N desde el estado de oxidación +5 al -3 y; c) la incorporación del NH_4^+ a intermediarios del carbono; ya que por cada molécula de N que se reduce, se requieren 28 moléculas de ATP (Crawford y Arst, 1993; Touraine *et al.*, 2001). En adición, el NO_2^- formado tras la primera reducción del NO_3^- es un compuesto tóxico y mutagénico para las

células debido a su capacidad para diazotizar los grupos amino de las bases nitrogenadas (Hinze y Holzer, 1985). Debido a esto, las células usan sofisticados sistemas de regulación transcripcional y postraducciona con el fin de regularizar la actividad de la vía a los requerimientos nutricionales de la célula y a la disponibilidad de N.

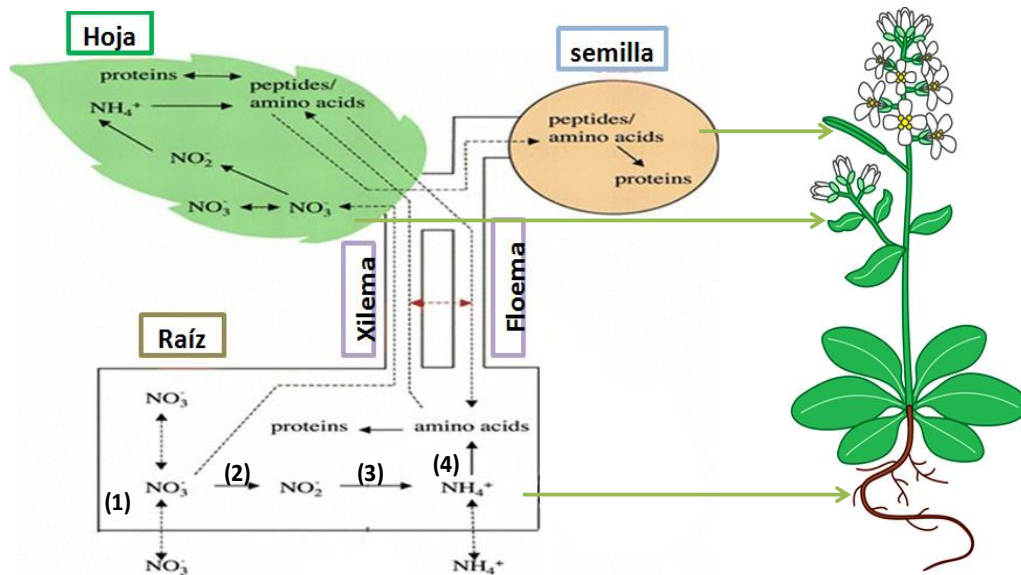


Figura 1.1 Ruta de asimilación del NO_3^- . El NO_3^- para poder ser asimilado por las plantas, debe atravesar la membrana plasmática a través de proteínas transportadoras (1). Una vez en el interior, el NO_3^- puede tener cuatro posibles destinos: el primero que sea reducido a nitrito por la nitrato reductasa (2), el segundo, almacenado en la vacuola de las células de las raíces, el tercero que sea enviado a la parte aérea vía xilema en donde puede almacenarse en vacuola de las células de las hojas o metabolizarse en este órgano y, cuarto, que sea expulsado desde el interior de la célula hasta el medio exterior. A su vez, el NO_2^- es reducido a NH_4^+ por la nitrito reductasa (3). El NH_4^+ es incorporado a esqueletos de carbono procedentes del ciclo de Krebs, mediante la acción de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H y glutamina sintetasa (4). La glutamina (Gln) y α -cetoglutarato pueden producir glutamato (Glu) mediante la acción de la glutamato sintasa. El glutamato es desaminado por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . A partir del glutamato y de la glutamina

se pueden producir el resto de los aminoácidos y compuestos orgánicos nitrogenados de la célula. Posteriormente, estos aminoácidos pueden ser enviados a la parte aérea a través del xilema y almacenarse en las hojas y semillas (adaptado de Williams y Miller, 2001).

El agrupamiento en un solo cromosoma de todos los genes que codifican la maquinaria necesaria para el uso del NO_3^- como única fuente de N, es la estrategia más usada por los organismos asimiladores de este compuesto. Esta estrategia permite coordinar eficientemente la expresión y la regulación de todos los elementos. Algunos ejemplos son: el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, en el que los genes que codifican para un transportador de NO_3^- (*nrtA*), la nitrato reductasa (*niaD*) y la nitrito reductasa (*niiA*) se encuentran agrupados en un mismo cromosoma (Johnstone *et al.*, 1990) o el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* donde se observan dos agrupamientos génicos diferentes, un grupo de aproximadamente 45 Kb que contiene los genes de reducción para NO_3^- y NO_2^- , (*Nia1*) y (*Nii1*), respectivamente; y los genes *Nrt2*, para transporte de $\text{NO}_3^-/ \text{NO}_2^-$ y un segundo grupo de aproximadamente 15 Kb que contiene un tercer gen *Nrt2* y un gen regulado por NO_3^- que codifica para una oxidasa alternativa mitocondrial (AOX) (Galván y Fernández, 2001; Quesada *et al.*, 1998). En el caso de la levadura *Hansenula polymorpha* se ha identificado un único agrupamiento de estos genes, *YNT1* (transportador de NO_3^-), *YNI1* (nitrito reductasa), *YNR1* (nitrato reductasa), *YNA1* e *YNA2*, en donde los dos últimos codifican para dos factores de transcripción (Ávila *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 1996).

El estudio de la vía de asimilación de NO_3^- ha cobrado gran relevancia, principalmente como consecuencia de su importancia en la nutrición de las plantas y la trascendencia de éstas en la alimentación humana (Canfield *et al.*, 2010). El aumento exponencial de la población y, por tanto, de la demanda de alimentos, ha colocado a la producción agrícola en una situación difícilmente sostenible sin la aplicación de abonos nitrogenados, siendo el NO_3^- el principal fertilizante utilizado (Canfield *et al.*, 2010; FAO 2015). A la vista de esta situación es de especial interés el poder mejorar el rendimiento de la vía, con el fin de mantener o incluso mejorar los rendimientos agrícolas, disminuyendo significativamente el uso de fertilizantes (Canfield *et al.*, 2010; Raliya *et al.*, 2017). En este sentido, se estima que la sobrefertilización ha provocado que se doble la tasa anual de entrada de N en el ciclo. Esta

situación conlleva una serie de importantes efectos negativos tales como: liberación de óxido nitroso y óxido nítrico a la atmósfera, contribuyendo al efecto invernadero, disminución de la capa de ozono y lluvia ácida (Canfield *et al.*, 2010). Además, dado que el NO_3^- tiene carga neta negativa actúa como un ión capaz de secuestrar minerales alcalinos como calcio, magnesio y potasio, nutrientes básicos para las plantas, lo que conlleva a una disminución de la fertilidad de los suelos (Canfield *et al.*, 2010).

1.1.3. Transporte de NO_3^- en eucariotas

Las características fisicoquímicas del NO_3^- hacen que sólo pueda atravesar la membrana plasmática a través de proteínas transportadoras (Glass y Siddiqi, 1995). En los organismos capaces de asimilar NO_3^- se aislaron numerosos tipos de transportadores, tanto exclusivos para el NO_3^- como capaces de transportar a otros sustratos además de éste (Crawford y Glass, 1998; Guan, 2017). La clasificación de estas proteínas transportadoras se realiza con base a múltiples criterios, como: características cinéticas, especificidad por sustrato o patrón de expresión. En la mayor parte de estos organismos el transporte de NO_3^- no es llevado a cabo por un solo tipo de transportador. Generalmente, se observa una gran variedad de sistemas de transporte, esto con el objetivo principal de asegurar el transporte de NO_3^- en un amplio rango de condiciones ambientales. Algunos casos representativos son los del alga verde *C. reinhardtii*, con tres familias de sistemas de transporte diferentes (NRT1, NRT2 y NAR1) (Fernández y Galván, 2007, 2008; Galván y Fernández, 2001) o la planta *Arabidopsis* con varios sistemas de transporte para este nutriente (NRT1, NRT2/NAR, CLC y SLAH) (Miller *et al.*, 2007). En los últimos años el número de transportadores identificados aumentó considerablemente como consecuencia de los proyectos de secuenciación genómica. Sin embargo, las características funcionales y estructurales de la mayoría de ellos se desconocen.

El transporte de NO_3^- , incluso cuando sus concentraciones extracelulares están en el rango milimolar, se realiza en contra de un gradiente electroquímico (Crawford y Arst, 1993); lo cual implica un consumo de energía para que pueda ser transportado hacia el interior de la célula. De manera general, esta energía es proporcionada por el gradiente de protones de la membrana plasmática, el cual es dependiente de la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana (Eddy y Hopkins, 1985; Miller y Cramer, 2005).

Estudios electrofisiológicos del transportador de NO_3^- NrtA de *Aspergillus nidulans* o del transportador de *Candida utilis* muestran una estequiometría para el transporte de NO_3^- de $2\text{H}^+ : 1\text{NO}_3^-$ (Eddy y Hopkins, 1985; Zhou *et al.*, 2000).

Una primera clasificación de estos transportadores se realizó con base a sus características cinéticas, más concretamente, en función de sus K_m . Esto permitió agrupar a estas proteínas acorde a su afinidad por el sustrato, como sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) y baja afinidad (LATS) (Forde, 2000; Galván y Fernández, 2001; Fernández y Galván, 2007). Los primeros tienen una K_m en el rango micromolar ($K_m < 1 \text{ mM}$) y se encuentran en plantas, algas, levaduras y hongos filamentosos, mientras que la K_m de los segundos está en el rango milimolar ($K_m > 1 \text{ mM}$), y están en plantas, algas y levaduras. Al coexistir en los organismos, la importancia relativa de cada uno de estos sistemas de transporte puede variar en función de los niveles de NO_3^- en el medio.

Por otro lado, algunos autores consideran la existencia de un tercer grupo de transportadores dentro de esta clasificación y son aquellos que presentan una cinética bifásica en respuesta a las condiciones del medio. Este es el caso del transportador AtNPF6.3 (AtNRT1.1/CHL1) que se caracteriza por poseer una K_m de $\sim 50 \mu\text{M}$ cuando los niveles de NO_3^- en el medio son bajos; mientras que en presencia de altos niveles de este anión los valores de su K_m aumentan hasta el rango milimolar (Lipton *et al.*, 1993; Liu y Tsay, 2003; Léran *et al.*, 2014).

Junto con este criterio de clasificación, estos transportadores también se pueden agrupar en función de su patrón de expresión en transportadores constitutivos o inducibles. Los iHATS (transportadores de alta afinidad inducible) normalmente tienen una afinidad menor por el NO_3^- que los cHATS (transportadores de alta afinidad constitutiva), aunque su capacidad de transporte es mayor que la de los segundos, por lo que suelen ser los responsables de prácticamente todo el transporte de NO_3^- del medio cuando éste se encuentra en concentraciones micromolares (Filleur *et al.*, 2001).

El análisis y comparación de las secuencias de los distintos transportadores de NO_3^- aislados hasta el momento ha permitido agruparlos en dos familias génicas claramente diferenciadas. Por un lado, la familia NNP (*Nitrate Nitrite Porter*), que está constituida por transportadores de NO_3^- y NO_2^- de procariontes y de eucariotes (Forde, 2000). Esta familia es una de las 17 que forman parte de la Superfamilia de Facilitadores Mayores (MFS, por sus siglas en inglés) (Pao *et al.*, 1998).

Dentro de este grupo de transportadores de NO_3^- se incluyen los transportadores de plantas del tipo NRT2, YNT1 de *H. polymorpha*, NRTA y NRTB de *A. nidulans* y NRT2 de *Tuber borchii* (Forde, 2000; Montanini *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008; Matín *et al.*, 2011). En todos los casos, son transportadores funcionalmente muy similares, con valores de K_m para el NO_3^- en el rango μM . Los transportadores agrupados en la MFS son un grupo bastante heterogéneo en el que se incluyen transportadores de diferentes tipos de sustratos. A nivel estructural son muy similares, con doce dominios transmembranales y extremos amino- y carboxilo- terminal citosólicos. Otra característica interesante es la existencia de un dominio central citosólico de tamaño variable entre los dominios transmembranales VI y VII (Tsujiimoto *et al.*, 2007).

Un segundo grupo de transportadores de NO_3^- está comprendido en la familia de transportadores de péptidos dependientes de protones (PTR o POT, por sus siglas en inglés), en la que se agrupan principalmente cotransportadores H^+ /oligopéptidos, ampliamente distribuidos en procariotas y eucariotas (Tsay *et al.*, 2007). A los transportadores de NO_3^- de esta familia se les denomina NPF (Familia de Transportadores NRT1/PTR) y en ella se incluye exclusivamente a transportadores de plantas, como AtNRT1.1 de *Arabidopsis* y BrNRT1.2 de *Brassica rapa*. Se ha propuesto que la familia NPF incluye a los LATS y la familia NRT2 a los HATS, aunque esta generalización se encuentra con excepciones como las de AtNRT1.1, que tiene propiedades de HATS y LATS y CrNRT2.3 de *C. reinhardtii*, que se trata de un LATS (Navarro *et al.*, 2000; Léran *et al.*, 2014).

Los transportadores de la familia NPF identificados hasta el momento muestran la capacidad de transportar otros compuestos junto con el NO_3^- . Así, en el caso del transportador BrNRT1.2, se ha determinado su capacidad para transportar con igual eficacia L-histidina y NO_3^- (Zhou *et al.*, 1998). Para AtNRT1.1, el estudio de mutantes de *Arabidopsis* resistentes a clorato puso de manifiesto el transporte de clorato por parte de este transportador (Tsay *et al.*, 1993).

El primer ejemplo que conecta directamente la regulación hormonal con el transporte activo de NO_3^- , es el del transportador NRT1.1. En efecto, NRT1.1 no solamente transporta NO_3^- , sino que también facilita la toma de la fitohormona auxina cuando hay una baja disponibilidad de NO_3^- (Krouk *et al.*, 2010). Este mecanismo ha sido propuesto para explicar la represión del crecimiento de las RL por NRT1.1, ya que se sugiere que la actividad de transporte de auxinas de NRT1.1 promueve el transporte basipetal de esta fitohormona en

las raíces, evitando que la concentración de auxina en el ápice de la raíz llegue al umbral necesario para que ocurra el crecimiento de la RL (Krouk *et al.*, 2010).

El impacto de la auxina en el transporte activo de NO_3^- de NRT1.1 ha sido probado en oocitos de *Xenopus* y se encontró que era débil; de manera contrastante se obtuvo que el NO_3^- inhibió fuertemente el influjo de auxinas en oocitos (Krouk *et al.*, 2010). La interacción entre el NO_3^- y las hormonas a nivel de transporte pudiera ser un mecanismo utilizado por las plantas para integrar la nutrición y el desarrollo. De igual manera, recientemente, el transportador de NO_3^- de baja afinidad NRT1.2 de *Arabidopsis*, otro miembro de la familia NPF (Léran *et al.*, 2014), ha sido identificado como un transportador de ácido abscísico (ABA) en levaduras (Kanno *et al.*, 2012). En esta ocasión, el NO_3^- no parece inhibir el transporte de ABA en el sistema heterólogo de levadura (Kanno *et al.*, 2013).

1.2.1. Sistema de transporte de NO_3^- de alta afinidad de dos componentes

Se ha reportado que algunos transportadores de NO_3^- de alta afinidad, pertenecientes a la familia de los NRT2, necesitan una proteína acompañante llamada NAR2 (proteína relacionada con la asimilación de NO_3^- , por sus siglas en inglés) para su función. Quesada *et al.*, (1994) identificaron por primera vez el gen *CrNar2* que codifica para una pequeña proteína de alrededor de 200 residuos aminoacídicos, que no presenta actividad de transporte por sí sola, pero que es necesaria para complementar el transporte de NO_3^- en mutantes deficientes en la toma de NO_3^- en *Chlamydomonas reinhardtii*. De igual manera, se demostró una situación similar para algunos transportadores de alta afinidad de plantas superiores como es el caso de *Hordeum vulgare* (HvNRT2.1) (Tong *et al.*, 2005), *A. thaliana* (AtNRT2.1-AtNRT2.6) (Okamoto *et al.*, 2006), *Oryza sativa* (OsNRT2.1 y OsNRT2.3a) (Yan *et al.*, 2011) y *Chrysanthemum morifolium* (CmNRT2) (Gu *et al.*, 2014) (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Relación de las proteínas NAR2 que han sido caracterizadas funcionalmente hasta la fecha.

| Especie | Caracterización funcional NAR2 | Interacción NRT2/NAR2 | Referencia |
|---------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>Clamydomonas reinhardtii</i> | CrNAR2.1 | CrNRT2.1 y CrNRT2.2/CrNAR2.1 | Zhou <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtNAR2.1 y AtNAR2.2 | AtNRT2.1-AtNRT2.6/AtNAR2.1 | Kotur <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Hordeum vulgare</i> | HvNAR2.1, HvNAR2.2 y HvNAR2.3 | HvNRT2.1/HvNAR2.3 | Tong <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Oryza sativa</i> | OsNAR2.1 y OsNAR2.2 | OsNRT2.1,2.2 y 2.3a/OsNAR2 | Liu <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Chrysanthemum morifolium</i> | CmNAR2 | CmNRT2/CmNAR2 | Gu <i>et al.</i> , 2014 |

Trabajos recientes muestran la necesidad de una interacción de ambas proteínas, AtNAR2.1 y AtNRT2.1, para la localización de AtNRT2.1 en la superficie celular (Barbier y Brygoo *et al.*, 2011). Dentro de los siete miembros de la familia NRT2 en *Arabidopsis*, se demostró que AtNRT2.1 codifica un componente esencial del sistema de transporte de alta afinidad de NO_3^- (Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004).

La proteína NRT2.1 está localizada en la membrana plasmática (Chopin *et al.*, 2007a) y es la más importante del sistema HATS en *Arabidopsis*; particularmente, cuando la

concentración de NO_3^- externa es baja (Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004). Además de la posibilidad de que las proteínas NAR2 estén involucradas en la estabilidad de NRT2.1 (Wirth *et al.*, 2007), recientemente se halló que NAR2 está asociada fisiológicamente a NRT2.1 en la membrana plasmática, formando un sistema de transporte de NO_3^- que se encuentra activo. Se plantea que este sistema es un tetrámero que consiste de dos subunidades de AtNRT2.1 y dos subunidades de AtNAR2.1 (Figura 1.2) (Yong *et al.*, 2010). Okamoto y col. (2006) reportaron que *Arabidopsis* posee dos genes del tipo NAR2 y que la expresión de AtNAR2.1 (también nombrado como AtNRT3.1) es requerida, junto con la expresión de AtNRT2.1, para el sistema de transporte de alta afinidad de NO_3^- en raíces. Las plantas mutantes alteradas en AtNRT2.1 o AtNAR2.1 o en ambos genes, son deficientes en la actividad HATS, proporcionando así evidencia para la relevancia de tal interacción en la planta (Orsel *et al.*, 2004).

Varias formas de AtNRT2.1 coexisten en la membrana plasmática de las células de la raíz, siendo la forma monomérica (45 kDa) la más abundante. La ausencia de esta forma monomérica en la membrana plasmática de las mutantes *nar2.1-1* sugiere que AtNAR2.1 es esencial para la localización de la proteína AtNRT2.1 en la membrana plasmática. Sin embargo, no se pudo encontrar evidencia de la presencia de un complejo AtNRT2.1/AtNAR2.1 en la membrana plasmática, sugiriendo que la forma monomérica de AtNRT2.1 podría ser la forma activa para el transporte de NO_3^- (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011). Más sin embargo, de acuerdo a su masa molecular (150 kDa) se sugiere que la unidad funcional para el sistema de transporte de alta afinidad estaría integrada por dos subunidades de AtNRT2.1 combinadas con dos subunidades de AtNAR2. De igual manera, se sugiere que incluso aún cuando AtNRT2.1 pudiera sufrir una proteólisis parcial, ésta conservaría su capacidad de transporte NO_3^- (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011). Como se puede constatar, el mecanismo por el cual NAR2 regula la función de NRT2 es aun controversial (Figura 1.2).

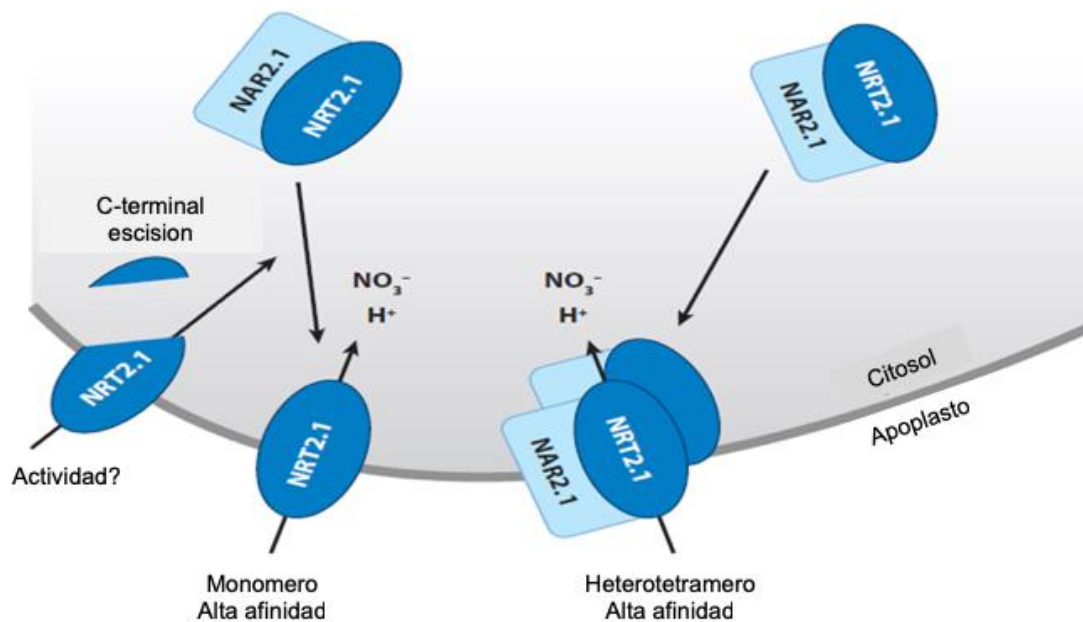


Figura 1.2. Transportadores de NO_3^- del tipo NRT2 en la membrana plasmática. La interacción de NRT2.1 y NAR2.1 es requerida para el posicionamiento de NRT2.1 en la membrana plasmática. La forma monomérica de NRT2.1 y la forma heteromérica NRT2.1/NAR2.1, coexisten en la membrana y se sugiere que es la forma heteromérica la responsable de la absorción de NO_3^- dentro de la célula. Una proteólisis parcial de AtNRT2.1 en el extremo C-terminal puede ocurrir en la membrana plasmática, resultando en la presencia de ambas proteínas en la membrana, las truncadas y las intactas. No está claro si la proteína trunca mantiene la capacidad de transporte (Modificado de Barbier-Brygoo *et al.*, 2011).

1.3.1. Regulación de los transportadores de NO_3^- a nivel transcripcional

La toma de NO_3^- por las raíces está sujeta a una compleja regulación de al menos dos diferentes vías de señalización de N. El NO_3^- por sí mismo induce localmente la expresión de varios genes que codifican su propio sistema de transporte en un período corto de tiempo (<1 hr), como es el caso de *AtNRT1.1* y *AtNRT2.1*; así como las principales enzimas involucradas en su asimilación, la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) (Crawford y Glass, 1998; Wang *et al.*, 2004; Gojon *et al.*, 2009). Esta es una respuesta rápida (de unos pocos minutos a unas pocas horas) tras el primer suministro de NO_3^- (o re-

suministro después de un período prolongado de ausencia de N). Sin embargo, a largo plazo (varias horas a varios días), el NO_3^- a altas concentraciones tiene una acción opuesta, reprimiendo la expresión de *AtNRT2.1* (Muños *et al.*, 2004; Krouk *et al.*, 2006). Por el contrario, el sistema de toma de NO_3^- de la raíz se encuentra bajo una represión de retroalimentación sistémica por las señales de la planta completa, asociadas con el nivel de N de todo el organismo (Crawford y Glass, 1998; Gansel *et al.*, 2001; Forde, 2002). Se ha sugerido que los metabolitos del N, como los aminoácidos, que son trasladados vía floema desde los brotes hacia las raíces, pudieran ser moléculas señales que medien la regulación negativa de la absorción de N por las raíces (Cooper y Clarkson, 1989; Müller y Touraine, 1992).

Otros factores que afectan la regulación transcripcional de los transportadores de NO_3^- son las fitohormonas. Hasta ahora el papel de cada fitohormona y su combinación en la actividad de transporte de NO_3^- en las raíces no es muy conocida, como lo es para el desarrollo de las raíces en respuesta a este nutriente (Wilson *et al.*, 2013).

La primera justificación para evaluar la relación entre las hormonas y los genes que codifican para transportadores de NO_3^- fue la acumulación de los ARNm de estos transportadores en tejidos específicos dentro de la planta. La localización del ARNm de *NRT1.1* en órganos nacientes, condujo a la hipótesis de una regulación a través de una señal de crecimiento (Guo *et al.*, 2001). En segundo lugar, la conexión hormonal y la regulación del transporte de NO_3^- a nivel transcripcional se basa en la afirmación de que una gran parte de la señalización hormonal involucra reprogramación transcripcional de una compleja red de genes (Chapman y Estelle, 2009; Hwang *et al.*, 2012).

La regulación transcripcional de genes *NRT2* por hormonas se ha demostrado por suministro exógeno de estos reguladores de crecimiento. En un experimento llevado a cabo en plantas de *Arabidopsis*, se obtuvo que desde las dos primeras horas de exposición de las raíces a 100 μM de ácido naftalenacético (NAA), la acumulación del ARNm de *NRT2.1* fue fuertemente inhibida (Gan *et al.*, 2005). Del mismo modo, el suministro exógeno de citocininas reguló de manera negativa la expresión de genes *NRT2*, como *NRT2.1*, *NRT2.3* y *NRT2.6* en *Arabidopsis* (Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005; Sakakibara *et al.*, 2006). Los elementos regulatorios de la vía de señalización de citocininas que afectan la regulación de genes que codifican para transportadores de NO_3^- son aún desconocidas. Sin embargo, se ha demostrado que la regulación de *NRT2.1* y *NAR2.1* por una señalización sistémica relacionada a NO_3^- depende de la biosíntesis de citocininas controlado por los genes *IPT3*

y/o *IPT5* y/o *IPT7* (Ruffel *et al.*, 2011). Adicionalmente a las auxinas y citocininas, también se sabe que el ABA inhibe la expresión del gen *NRT2.1* de *Arabidopsis* y de manera contraria, el etileno influye de manera positiva en la expresión de este mismo gen cuando las concentraciones de NO_3^- son bajas (Tian *et al.*, 2009; Kiba *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013).

La correlación entre el NO_3^- y las hormonas con respecto al transporte, pudiera ser la interacción más importante a través del cual las plantas logran compaginar su nutrición y desarrollo (Ruffel *et al.*, 2014). Kanno y colaboradores (2013) determinaron mediante el sistema de doble híbrido en levaduras, que el transportador de NO_3^- NPF4.6/NRT1.2 de *Arabidopsis* es también un transportador uniporte de ácido abscísico (ABA), que presenta un valor de K_m por ABA de $5 \mu\text{M}$, al cual se le nombró como NPF4.6/NRT1.2/AIT1. Los autores no descartan la posibilidad de que pudiera actuar de igual manera como un transportador antiporte como se ha reportado para algunos miembros de la familia de proteínas NPF.

1.3.1.1. Regulación a nivel postraducciona

La regulación postraducciona permite una respuesta más rápida que la obtenida exclusivamente con el control transcripcional. A pesar de la gran importancia de este sistema de regulación, el conocimiento del mismo solo se ha puesto en evidencia recientemente. En *Nicotiana plumbaginifolia*, se demostró que a pesar de existir una expresión constitutiva del transportador de NO_3^- de alta afinidad NpNRT2.1, ocurría un descenso del transporte de NO_3^- en presencia de NH_4^+ cuando este último nutriente se encontraba en el medio. Esto sugería que el NH_4^+ o algún compuesto derivado de éste, regulaba negativamente el transporte de NO_3^- a nivel postraducciona (Fraisier *et al.*, 2000). El transportador de NO_3^- AtNRT1.1 también está sometido a regulación postraducciona, en función de las condiciones del medio. En este caso, las modificaciones en los niveles extracelulares de NO_3^- causan un cambio de afinidad mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación del residuo de T101 en la proteína. En presencia de bajas concentraciones de NO_3^- (en el rango μM), el transportador se fosforila en la T101 y esta fosforilación desencadena el aumento de la afinidad del transportador por este nutriente. En la situación opuesta, cuando los niveles extracelulares de NO_3^- son elevados, el

transportador se encuentra desfosforilado, presentando una Km por el NO_3^- muy superior. Este mecanismo permite un rápido ajuste del transporte de NO_3^- a través de este transportador en función de las condiciones del medio (Liu y Tsay, 2003; Lerán *et al.*, 2014). Trabajos donde se demuestra que CHL1 es capaz de restablecer el transporte de NO_3^- en la mutante Δynt1 de *Hansenula polymorpha*, indican que la T101 se encuentra involucrada en la regulación de los niveles de AtNRT1.1 expresados en esta levadura y sugiere además que la fosforilación del residuo T101 podría estar implicada en la localización en la membrana de este transportador (Martín *et al.*, 2008). Se ha reportado que la proteína cinasa responsable de esta fosforilación es la CIPK23 (“Calcineurin B-like (CBL)-interacting protein kinase”, por sus siglas en inglés) (Ho *et al.*, 2009).

Para el transportador de *A. nidulans*, NrtA, se sugiere la existencia de un mecanismo de inactivación postraducciona (fosforilación) y/o la degradación en vesículas, para evitar así un exceso de entrada de NO_3^- (Wang *et al.*, 2007).

También, se tiene evidencia de una proteólisis parcial de la proteína AtNRT2.1 en el extremo C-terminal, que podría ocurrir en la membrana plasmática, resultando en la presencia de proteínas intactas y proteínas truncadas en la membrana; sin embargo no está claro todavía si este proceso está asociado con la inactivación de la actividad de transporte de AtNRT2.1 (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011).

1.4.1. Sistemas de excreción de NO_3^-

La asimilación de NO_3^- hacia formas reducidas del mismo es un balance entre la cantidad de NO_3^- transportado al interior celular y el excretado. Sin embargo, muy poco se conoce de las entidades moleculares implicadas en el eflujo de este ión en las células. En plantas se sabe que la excreción de NO_3^- incrementa al aumentar su concentración intracelular (Macduff y Jackson, 1992) y se regula por mecanismos diferentes a los que modulan su transporte (Aslam *et al.*, 1994, 1996). También, se ha reportado que determinadas condiciones de estrés producen un aumento en la excreción de este ión en plantas (Aslam *et al.*, 1996). De hecho, en *A. thaliana* se ha identificado la primera proteína implicada en la excreción de este nutriente. NAXT1 (“Nitrate Excretion Transporter 1”) es un miembro de las siete proteínas NAXT identificadas en *A. thaliana*, que pertenecen a la familia de transportadores de NO_3^- y péptidos (NRT1/PTR) (Segonzac *et al.*, 2007). NAXT1 se expresa

en la corteza de las raíces adultas y lleva a cabo el transporte pasivo de NO_3^- al exterior celular cuando las células son sometidas a estrés ácido (Segonzac *et al.*, 2007). Además de NAXT1, otra de las proteínas NAXT de *Arabidopsis*, también ha mostrado ser capaz de excretar NO_3^- en fragmentos de membrana plasmática aislada de plantas que crecen en condiciones normales, aunque su capacidad de excreción es menor que NAXT1 (Segonzac *et al.*, 2007). También, en *Arabidopsis* se ha identificado la proteína AtClCa implicada en la homeostasis del NO_3^- . Esta proteína pertenece a la familia de los canales de cloro CLC que se localiza en la membrana vacuolar y mediante un intercambio NO_3^-/H^+ es capaz de acumular NO_3^- en la vacuola (De Angeli *et al.*, 2006).

1.5.1. Función de los transportadores de NO_3^- en las plantas

Como se describió anteriormente, las familias de genes *NRT1* y *NRT2* codifican los sistemas LATS y HATS, respectivamente (Crawford y Glass, 1998; Daniel-Vedele *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Forde, 2000; Fraiser *et al.*, 2000). En la mayoría de las especies vegetales estudiadas los genes *NRT1* y *NRT2* están organizados en familias multigénicas (Liu *et al.*, 1999), indicativo de que pueden ejercer papeles diferentes en la planta (Huang *et al.*, 1999; Forde y Clarkson, 1999; Forde, 2000; Williams y Miller, 2001; Orsel *et al.*, 2004). En la zona apical de la raíz de *Arabidopsis*, se expresa el gen *NRT1.1*, el cual codifica para una proteína de afinidad dual que lleva el mismo nombre. La proteína AtNRT1.1/CHL1/NPF6.3 tiene un papel importante en la percepción y transporte de NO_3^- ; posteriormente, a través de una cascada de señalización activa la expresión de los genes relacionados con este ión (Tsay *et al.*, 1993) (Ho *et al.*, 2009). *NRT1.1* está involucrado en diferentes procesos de señalización que dan como resultado cambios en el desarrollo de la raíz y la germinación de las semillas (Ho y Tsay, 2010).

En *Arabidopsis*, se han identificado cinco transportadores que se encuentran localizados en la raíz, éstos son CHL1 (*NRT1.1*) (Tsay *et al.*, 1993), AtNRT2.1 (Huang *et al.*, 1999), AtNRT2.2 (Orsel *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007), AtNRT2.4 (Kiba *et al.*, 2012) y AtNRT2.5 (Lezhneva *et al.*, 2014), los cuales participan en la captación de NO_3^- desde el suelo. Otros miembros de la familia *NRT1*, como *NRT1.4* (Chiu *et al.*, 2004), *NRT1.7* (Fan *et al.*, 2009) y *NRT1.6* (Almagro *et al.*, 2008) se encuentran involucrados en el almacenamiento de NO_3^-

en los pecíolos, en la removilización del ión de las hojas viejas a las jóvenes y la entrega de NO_3^- para el desarrollo de las semillas, respectivamente. En adición, dos transportadores NRT1 de *Arabidopsis* NAXT1 (Segonzac *et al.*, 2007) y NRT1.5 (Lin *et al.*, 2008) median el flujo de NO_3^- en la corteza y la absorción de NO_3^- hacia el xilema, respectivamente. Los transportadores CLCa (De Angeli *et al.*, 2006) y NRT2.7 (Chopin *et al.*, 2007), localizados en el tonoplasto, son responsables del almacenamiento del NO_3^- en la vacuola de hojas y semillas, respectivamente. El transportador de NO_3^- de baja afinidad de *Arabidopsis* AtNRT1.8 es predominantemente expresado en las células parenquimáticas dentro de la vasculatura de raíces y brotes de plántulas, sugiriendo un papel en la carga o descarga del NO_3^- en el xilema (Li *et al.*, 2010). Wang y Tsay (2011) caracterizaron al transportador de NO_3^- de baja afinidad de *Arabidopsis* AtNRT1.9. Ellos encontraron que este transportador se encuentra localizado predominantemente en las raíces, específicamente en las células acompañantes del floema lo que indica que es un regulador negativo del transporte de NO_3^- de raíces a brotes. En mutantes *nrt1.9* el transporte de NO_3^- hacia la parte radicular a través del floema es reducido, resultando en un incremento del transporte de NO_3^- hacia la parte aérea (de raíces a brotes a través del xilema). Por otra parte las plantas mutantes *nrt1.9* muestran un mayor crecimiento bajo altas condiciones de NO_3^- . Estos resultados sugieren que NRT1.9 media el transporte de NO_3^- hacia las raíces desde el floema y que, a altas concentraciones de este ión la transferencia del mismo en el floema de las raíces sirve como una ruta de descarga para prevenir que grandes cantidades de NO_3^- sean transportadas a los brotes (Figura 1.3).

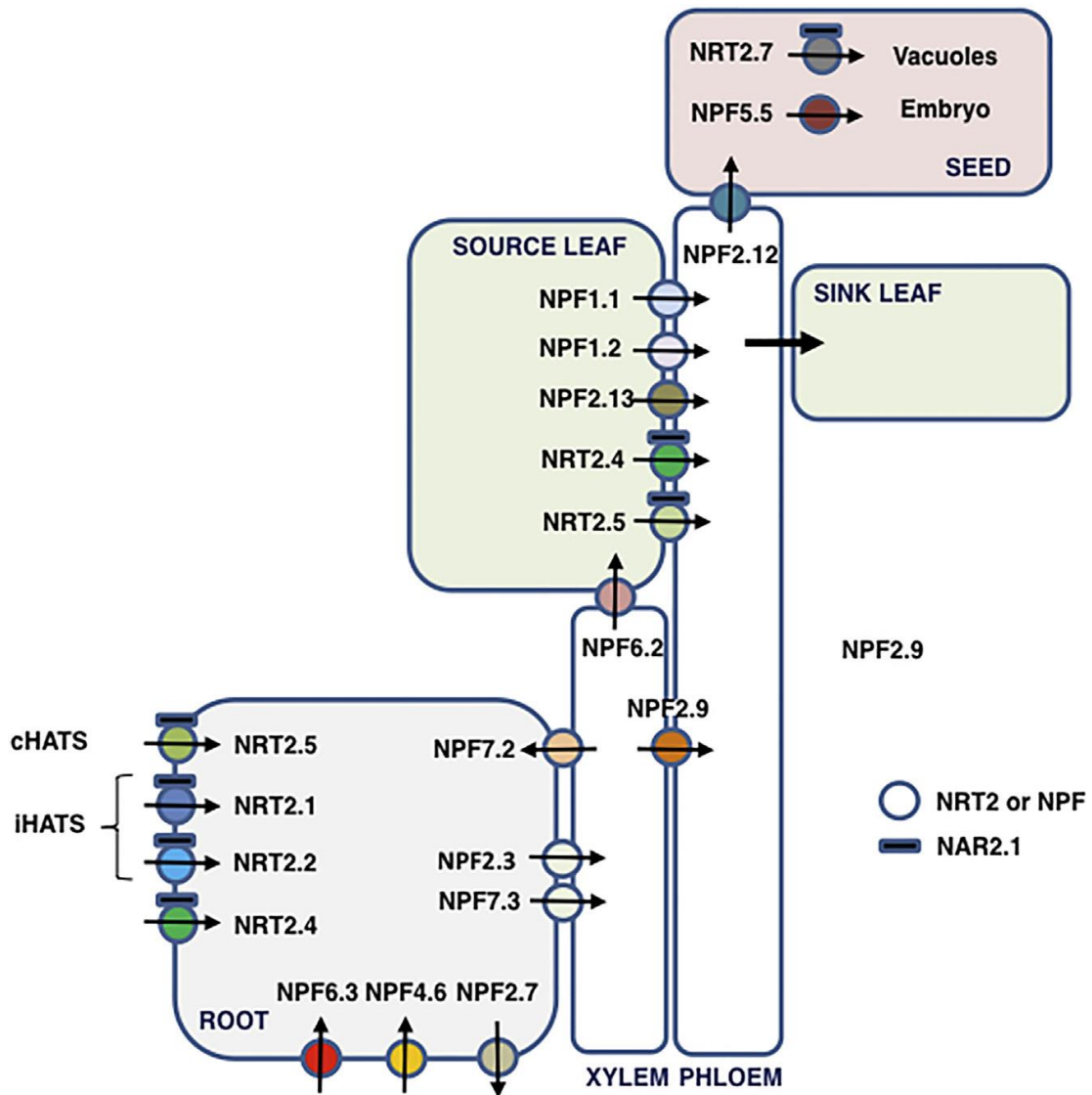


Figura 1.3. Localización de las proteínas NRT en Arabidopsis. En esta imagen se resumen la función de los diferentes transportadores de NO_3^- caracterizados hasta el momento. Tomado de O'Brien *et al.*, 2016.

Aunque la estructura topológica de las proteínas NRT1 y NRT2 es común, la secuencia primaria es diferente. Hasta el 2004, sólo tres proteínas (NRT1.1, NRT1.2 y NRT2.1) habían sido caracterizadas funcionalmente en plantas, implicándolas en la absorción de NO_3^-

(Muños *et al.*, 2004). Actualmente, otras proteínas, tales como NRT1.3, NRT1.4, NRT1.5, NRT1.6, NRT1.7, NRT1.8, NRT2.2, NRT2.4, NRT2.5 y NRT2.7 también han sido caracterizadas (Cerezo *et al.*, 2001; Chopin *et al.*, 2007; Bertoni *et al.*, 2012; Lezhneva *et al.*, 2014). Algunas de las proteínas del tipo NRT2 caracterizadas funcionalmente y la descripción de sus características se resumen en el cuadro 1.2.

Cuadro 1.2. Proteínas NRT2 caracterizadas funcionalmente.

| Transportador | Localización | Regulación a nivel transcripcional | Regulación a nivel postraducciona | Función | Cita |
|---------------|---|---|-----------------------------------|---|---|
| AtNRT2.1 | Raíz MP Citoplasma | Se induce por nitrato (presencia y ausencia), azúcar y luz | Fosforilación Proteólisis | Toma de nitrato de alta afinidad Crecimiento de RLs | Filleur <i>et al.</i> , 2001; Chopin <i>et al.</i> , 2007; Wittgenstein <i>et al.</i> , 2014 |
| AtNRT2.2 | Raíz MP Citoplasma | Se induce por nitrato | ? | Toma de nitrato de alta afinidad | Filleur <i>et al.</i> , 2001; Li <i>et al.</i> , 2007; Cerezo <i>et al.</i> , 2001; Okamoto <i>et al.</i> , 2003; Wittgenstein <i>et al.</i> , 2014 |
| AtNRT2.4 | RLs jóvenes y tejido conductor de hojas | Se reprime por amonio y nitrato. Se induce en ausencia de N | ? | Toma de nitrato de alta afinidad | Kiba <i>et al.</i> , 2012; Lejay <i>et al.</i> 2008; Okamoto <i>et al.</i> , 2003 |
| AtNRT2.5 | Raíz MP | Se induce por ausencia de N y se mantiene de manera constitutiva en | ? | Toma de nitrato de alta afinidad en plantas adultas, en | Lezhneva <i>et al.</i> , 2014 |

| | | presencia de nitrato | | ausencia de N por tiempos largos | |
|-----------|---|---|---|--|--|
| AtNRT2.7 | Semilla Tonoplasto | Expresión constitutiva en presencia de nitrato | ? | Almacena- miento de nitrato en embriones maduros | Chopin <i>et al.</i> , 2007 |
| OsNRT2.1 | Coleoptilos Raíz | Se induce por nitrato | ? | Toma de nitrato de alta afinidad | Takayanagi <i>et al.</i> , 2011 |
| OsNRT2.3a | Xilema | Se induce por nitrato | ? | Transporte de nitrato a larga distancia en el xilema, de raíces a brotes | Tang <i>et al.</i> , 2012; Yan <i>et al.</i> , 2011 |
| OsNRT2.3b | Principalmente en el floema de brotes y ligeramente en el de raíces | Se induce por nitrato | ? | Toma de nitrato de alta afinidad/ Sensor de pH citosólico | Fan <i>et al.</i> , 2016 |

Las proteínas NRT2 comparten la secuencia motivo conservada **D/N-R-X-G-R-R/K**, entre los dominios transmembranales 2 y 3, y otra, **I-X₂-R-X₃-G-X₃-G**, antes y dentro del dominio transmembranal 4, que se presentan incluso entre los miembros de la MFS mostrando una divergencia extensa (Charrier *et al.*, 2015).

Un motivo consenso **[FYK]-X₃-[ILQRK]-X-[GA]-X-[VASK]-X-[GASN]-[LIVFQ]-X_{1,2}-G-X-G-[NIM]-X-G-[GTA]** dentro del quinto dominio putativo transmembranal ha sido propuesto como distintivo de la familia NNP (nitrato- nitrito porter) (Pao *et al.*, 1998).

Una porción de esta secuencia, **A-G-W/L-G-N-M-G**, presente en la secuencia de CRNA de *A. nidulans*, en las secuencias NRT2 de *Chlamydomonas* y *Hordeum vulgare*, y en la secuencia NARK de *Escherichia coli*, se han sugerido como motivos de reconocimiento del sustrato (Charrier *et al.*, 2015).

Los transportadores NRT1, perteneciente a la familia POT que incluye a los transportadores de oligopéptidos dependientes del número de H⁺, no muestran conservación significativa con los miembros de la familia NRT2. Estos transportadores se encuentran presentes en mamíferos, plantas, hongos y bacterias (Pao *et al.*, 1998).

Las mutantes de *Arabidopsis* con expresión alterada de los genes *AtNRT2.1* y *AtNRT2.2* son defectuosas en la actividad HATS (Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004). Estos dos genes se encuentran de extremo a extremo en el genoma de *Arabidopsis* y codifican para varias proteínas similares, que pueden llegar a compartir hasta un 90% de identidad (Orsel *et al.*, 2002). Esta información sugiere que los genes funcionales homólogos del tipo *NRT2* codifican para diferentes miembros de la familia de transportadores HATS, esto debido a eventos de duplicación de genes, lo que dio como resultado una rápida evolución en las plantas.

Li y colaboradores (2007), llevaron a cabo un trabajo donde describieron la función de la proteína NRT2.1 de *Arabidopsis*, mediante el uso de una mutante que es únicamente interrumpida en la expresión de *AtNRT2.1*. Esta mutante se utilizó para analizar la contribución de los genes que codifican para proteínas del tipo iHATS y cHATS que participan en el transporte de NO₃⁻. Los resultados obtenidos definieron que *AtNRT2.1* es el principal contribuyente en ambos sistemas de transporte (Li *et al.*, 2007).

1.6.1. Modelo de estudio: chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

La captación y asimilación del N, así como las condiciones limitantes de nutrientes minerales en el suelo representa dos mecanismos de gran importancia para el desarrollo de las plantas. En Yucatán, el chile habanero crece en condiciones desfavorables de suelo. El 90% de los suelos de la península presentan una concentración alta de materia orgánica, un pH entre 7.5 a 8.5, son pobres en N y fósforo (P) y presentan altas concentraciones de potasio (K); por lo que su sistema radical tiende a ser poco desarrollado y con bajo vigor de

crecimiento (Ramírez *et al.*, 2006). Debido a todo lo descrito anteriormente, el chile habanero es un candidato ideal para evaluar la toma de NO_3^- de alta afinidad.

Adicionado a esto, en la familia de las *solanáceas*, la mayoría de las proteínas NRT2 no han sido caracterizadas funcionalmente y la información disponible sobre este tipo de proteínas es muy limitada; por lo que estudiar la toma de NO_3^- de alta afinidad resulta de gran importancia y brindaría un panorama más amplio de la regulación de este tipo de proteínas en especies subtropicales y de importancia económica.

1.6.1.1. Origen y características importantes

El género *Capsicum*, que es nativo de América subtropical y tropical, es una de las plantas cultivadas más importantes en el mundo y tiene un papel clave como constituyente de muchos productos alimenticios (Wang y Bosland, 2006). Adicionalmente, el género *Capsicum* tiene un alto valor nutrimental, es una fuente excelente de vitaminas C, A y complejo B, y minerales como folato, potasio, manganeso y molibdeno (Kothari *et al.*, 2010). En México, el chile habanero (*C. chinense* Jacq.) se encuentra entre los principales productos agrícolas de la región sureste, ya que es altamente demandado por el mercado nacional, así como la industria farmacéutica, alimentaria y química, debido a sus altos contenidos de capsaicina, alcaloide que le confiere alta pungencia a sus frutos, considerados de los más picosos de todas las especies vegetales conocidas (González *et al.*, 2006). Se sabe que el chile habanero, como cualquier otro cultivo, es vulnerable a la escasez de N, que reduce la producción de flores y frutos, así como el contenido de capsaicinoides en el fruto (Medina-Lara *et al.*, 2008; Monforte-González *et al.*, 2010).

La siembra puede efectuarse en cualquier temporada del año con el riego adecuado; pero la época de lluvias (junio-septiembre) es de gran importancia, pues las temperaturas, humedad y luminosidad presentes en esta época, favorece un mejor desarrollo de la planta (González *et al.*, 2006). Este cultivo prospera en condiciones de iluminación de intensa a moderada y su ciclo vegetativo es de 75-130 días (Baradas, 1994). Además, es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*.) (Tun Dzul, 2011). Su clasificación taxonómica es la siguiente (Tun Dzul, 2011):

Reino: *Plantae*
Clase: *Angiospermae*
Subclase: *Eudicotyledoneae*
Superorden: *Simpetala*
Familia: *Solanaceae*
Género: *Capsicum*
Especie: *Capsicum chinense* Jacq.



1.6.1.2. Respuesta radical de chile habanero a fuentes de N

Se ha observado que el chile habanero al estar en presencia de NO_3^- , modifica el crecimiento y desarrollo de su sistema radicular, aumentando la formación y el crecimiento de las raíces laterales (RL) (Celis-Arámulo *et al.*, 2011). Usando plántulas de chile habanero colocadas en cajas de Petri con medio B5 segmentado, con NO_3^- en la región media, se observó que el número de RL aumentó en el segmento en el que se encontraba este nutriente. De igual manera, al exponer a las raíces a 1 mM de NO_3^- durante tiempos cortos (0-4 hrs), se observaron modificaciones en la expresión de los genes que codifican para diferentes proteínas como son: la proteína VPS26, la cual es una proteína de sorteo vacuolar, una ATPasa vacuolar (V-ATPasa), una proteína 14-3-3, la nitrato reductasa y un transportador de nitrato de alta afinidad (Celis-Arámulo *et al.*, 2011).

Por otro lado se ha demostrado que el chile habanero puede emplear diferentes estrategias para afrontar los niveles fluctuantes de NO_3^- en el suelo. En un trabajo realizado por Santiago-Antonio y colaboradores (2014) se investigó la respuesta de crecimiento ante un déficit de NO_3^- en tres diferentes variedades de chile habanero, dos de la región de Yucatán (Mayan Ek y Mayan Chan) y una variedad comercial (SEMINIS) con el objetivo de identificar respuestas contrastantes que pudieran representar diferentes estrategias adaptativas por esta especie bajo estas condiciones. Los resultados obtenidos indican que la variedad Mayan Ek es la que presentó una mayor masa seca total durante el período de tratamiento, cuando es comparada con las otras variedades. El contenido de metabolitos sugiere que los mecanismos adaptativos de esta variedad involucra una remobilización de N cuando

existe un déficit, principalmente de NO_3^- en la raíz y aminoácidos a partir de otras partes de la planta. La variedad Mayan Chan presenta una elevada toma de NO_3^- de alta afinidad cuando es sometido a períodos largos de déficit de N, revelando un mecanismo adaptativo diferente. Todas las variedades incrementaron los niveles de transcritos del gen *CcNRT2.1*, pero difieren en su período de inducción. En ese trabajo se identificaron rasgos morfológicos y moleculares que pudieran incrementar la productividad de chile habanero cuando crece en suelos con limitación de N.

1.6.1.3. Transportadores de NO_3^- en chile habanero

En un trabajo previo realizado por Lizama-Gasca (2012) clonaron un ADNc total (1593 pb de longitud) a partir de raíces de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. (cv.naranja). Las plántulas se desarrollaron durante 45 días en condiciones de hidroponía con medio Hoagland modificado (Richard-Morland *et al.*, 2008) a 1/5 de su fuerza iónica. Estas plántulas fueron colocadas durante cuatro días (96 hr) en ausencia de N (testigo, KCl 1 mM) y posteriormente se expusieron a 1 mM de los siguientes compuestos: KNO_3^- , NH_4Cl y glutamato de K, durante tiempos cortos: 0, 1, 2 y 4 h con aireación constante. Esta secuencia presentó un alto porcentaje de identidad con una familia de los transportadores NRT2, entre los que se encuentran los de *Nicotiana tabacum* (NtNRT2.1 y NtNRT2.2 con 94 y 89 %, respectivamente), *Nicotiana glauca* (NpNRT2.1 con 94 %), *Solanum lycopersicum* (SlNRT2.1, 2 y 3 con 95, 95 y 88 %, respectivamente) y *Arabidopsis thaliana* (AtNRT2.1, 2 y 4 con 78, 73 y 77 %, respectivamente). La secuencia de proteína obtenida a partir de la traducción *in silico* de *CcNRT2.1* sugiere que la proteína tiene un tamaño de 530 aminoácidos, una masa molecular de 57.5 KDa y un punto isoeléctrico de 9.15. De igual manera, presenta características estructurales específicas de este tipo de proteínas. La secuencia **A-G-W/L-G-N-M-G**, la cual se encuentra en la quinta región transmembranal de la familia de las proteínas NNP (Trueman *et al.*, 1996), fue detectada en la sexta región transmembranal de la proteína *CcNRT2.1*. La firma **G-X₃-D-X₂-G-X-R** de los NRT2s (Pao *et al.*, 1998) se encontró entre la tercera y cuarta región transmembranal de la proteína *CcNRT2.1*. Los dos residuos de arginina que se sabe son esenciales para el transporte de NO_3^- en CRNA (NRTA) de *A. nidulans* (Unkles *et al.*, 2004), correspondientes a la Arg115

y la Arg332 de AtNRT2.1 fueron también conservados en la secuencia de la proteína CcNRT2.1 en la posición 115 y 332, respectivamente.

Estas características estructurales sugieren que la proteína CcNRT2.1 de chile habanero pudiera estar involucrada en el transporte activo de NO_3^- . La proteína CcNRT2.1 contiene un residuo hidrofílico C-terminal de aproximadamente 71 aminoácidos; esta secuencia fue similar a la región correspondiente a las proteínas NRT2 de plantas superiores y algas verdes, conteniendo los dos sitios conservados de fosforilación, hallados en la mayoría de estas proteínas NRT2s (**S/T-X-R/K**) (Tsujiyama *et al.*, 2007). Otro sitio putativo de fosforilación de los NRT2s que es conservado en algas verdes y plantas superiores, es el que se encuentra entre la décima y onceava región transmembranal (Forde, 2000), el cual también fue conservado en la secuencia de la proteína CcNRT2.1; de igual manera la región N-terminal de CcNRT2.1 contiene un segmento conservado de aproximadamente 20 aminoácidos, que es hallado en la mayoría de los NRT2s de las plantas superiores y contiene sitios putativos de fosforilación (Figura 1.4).

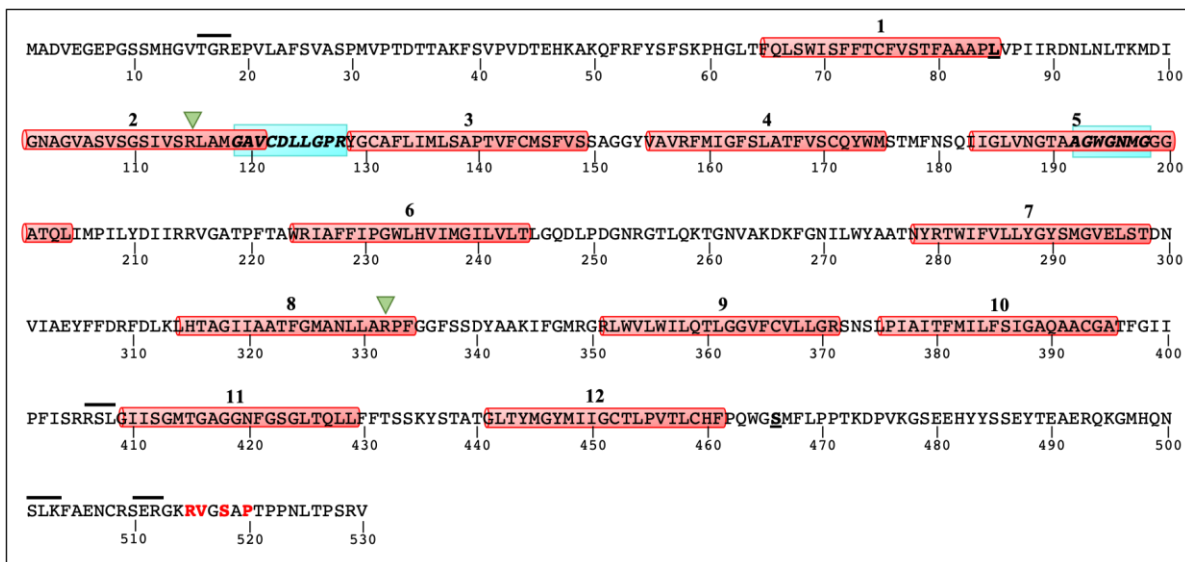


Figura. 1.4. Secuencia de aminoácidos deducida de CcNRT2.1. Las secuencias de aminoácidos hidrofóbicos, que forman las regiones intramembranales están numeradas y en cilindros color rojo. Los motivos de reconocimiento de la proteína cinasa C (S/T-X-R/K) se encuentran con una línea en la parte superior. Los triángulos invertidos indican los dos residuos de arginina correspondientes a los requeridos para el transporte de NO_3^- por un NRT2 homólogo (CRNA, también

conocido como NRTA) del hongo *Aspergillus nidulans*. Las firmas de aminoácidos conservados en la familia de las proteínas NNP (A-G-W/L-G-N-M-G) y las proteínas NRT2 (G-X3-D-X2-G-X-R) se encuentran en negritas, cursivas y en cajas color cian, respectivamente. En letras rojas se encuentran las regiones concenso de fosforilación. En negritas y subrayados se señalan los residuos aminoacídicos de posible interacción con proteínas NAR2 en homólogos de *Arabidopsis* y cebada.

En la Figura 1.5 se muestra la topología sugerida para CcNRT2.1; con un tamaño de 530 aminoácidos, una masa molecular y punto isoelectrico predichos de 57.5 kD y 9.15, respectivamente. Todas estas características junto con las señaladas en la figura 1.4 sugieren que CcNRT2.1 de chile habanero pudiera ser una proteína transportadora de NO_3^- de alta afinidad, cuya función debe ser validada por métodos experimentales.

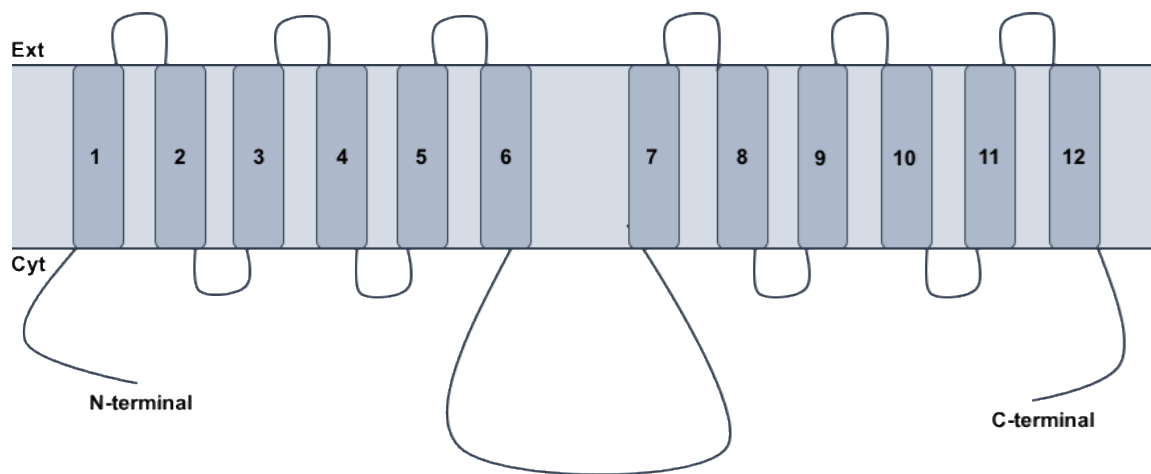


Figura 1.5. Topología sugerida para el transportador CcNRT2.1. Las 12 hélices transmembranales se representan con cilindros enumerados del 1 al 12, en donde las seis primeras hélices transmembranales se separan de las restantes seis por medio de un loop citosólico central largo. De igual manera se muestran los extremos amino y carboxilo terminales, representados como N-terminal y C-terminal respectivamente; los cuales se ubican en el citosol de la célula. Ext y Cyt significan extracelular y citosolico, respectivamente.

HIPÓTESIS

La proteína CcNRT2.1 de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una proteína transportadora de NO_3^- de alta afinidad que se regula por diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno y se localiza en las raíces de chile habanero.

JUSTIFICACIÓN

Los transportadores de NO_3^- de alta afinidad son las proteínas responsables de la toma de este nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Ellas participan en el proceso de transporte cuando las concentraciones externas de NO_3^- son bajas (rango micromolar), ya sea en el suelo o en diferentes órganos de la planta.

Además del transporte de NO_3^- , a estas proteínas se les ha adjudicado una participación en la regulación del desarrollo vegetal en respuesta tanto a señales ambientales (disponibilidad de N en el medio) como a señales endógenas (balance C/N en el tejido). Esta nueva función ha sido descrita sólo para un miembro de esta familia de proteínas y en la planta modelo *Arabidopsis*.

De igual manera estas proteínas para que puedan llevar a cabo el transporte de NO_3^- de alta afinidad requieren interactuar con proteínas del tipo NAR2 (proteína relacionada con la asimilación de NO_3^- , por sus siglas en inglés), formando así un sistema de transporte de NO_3^- de dos componentes.

Por lo tanto para comprender la versatilidad de funciones que pueden haber adquirido estas proteínas, debido a las condiciones ambientales contrastantes en las cuales las plantas se han desarrollado es necesario caracterizar molecular y bioquímicamente a las proteínas NRT2 y NAR2 en especies de importancia agrícola, como lo es chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Por lo que en un futuro el conocimiento generado en este trabajo, contribuirá al mejoramiento de la fertilización nitrogenada en las especies, particularmente para mejorar la producción vegetal en condiciones de poca disponibilidad de N.

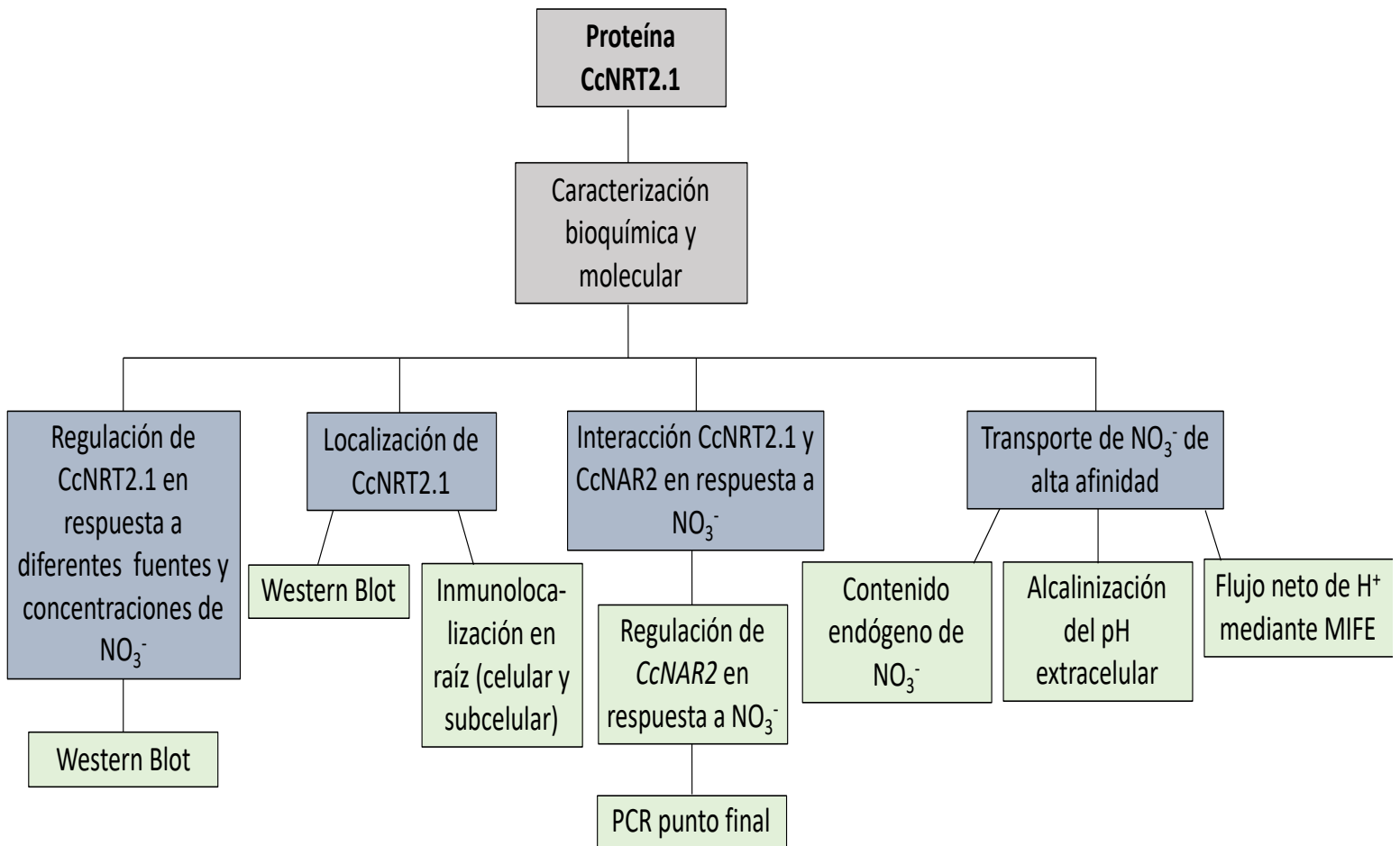
OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente y molecularmente a CcNRT2.1 en las raíces de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en respuesta a factores abióticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICO

- 1) Determinar la localización celular y subcelular de la proteína CcNRT2.1 en las raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).
- 2) Obtener el ADNc total de *CcNAR2* de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).
- 3) Evaluar el efecto de diferentes factores abióticos (concentración de NO_3^- , sacarosa, luz, etc.) sobre los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en las raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



CAPÍTULO II

Clonación del ADNc total y análisis *in silico* de la proteína accesoria CcNAR2 de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

2.1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas NAR2 (Nitrate Assimilation Related Protein) son pequeñas proteínas de aproximadamente 200 aminoácidos, que se ha demostrado que interactúan con proteínas NRT2 para llevar a cabo el transporte de (*Capsicum chinense* Jacq.). de alta afinidad (Orsel *et al.*, 2006). Las proteínas NAR2 no presentan actividad de transporte, pero son requeridas para complementar el transporte de NO_3^- ; como por ejemplo en la mutante *Crnar2* de *Chlamydomonas reinhardtii*, que es deficiente en la toma de NO_3^- de alta afinidad. La asociación funcional de *Crnar2* con su proteína “compañera” que transporta NO_3^- en el rango de alta afinidad, fue posteriormente confirmada utilizando ovocitos de *Xenopus* (Zhou *et al.*, 2000).

Por otro lado, únicamente uno de los tres genes NAR2 de cebada mostró complementación funcional con el transportador de NO_3^- de alta afinidad HvNRT2.1 en el sistema de ovocitos (Tong *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, Okamoto y colaboradores (2006) encontraron que tanto los HATS constitutivos como inducibles dependen de la expresión de genes del tipo *NAR2*; pero no para los LATS. Sin embargo, no todos los miembros de la familia AtNRT2 requieren de una segunda proteína para la función de toma de NO_3^- (ej. AtNRT2.7; Chopin *et al.*, 2007).

Yong y colaboradores (2010) demostraron que los polipéptidos NRT2.1 y NAR2.1 interactuaban directamente en la membrana plasmática para formar un oligómero que podía ser funcional para el influjo de NO_3^- en raíces de *Arabidopsis*. En el genoma de arroz se han identificado cuatro genes putativos NRT2 (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, *OsNRT2.3a* y *b* y *OsNRT2.4*) y dos genes putativos NAR2 (*OsNAR2.1* y *OsNAR2.2*) (Araki y Hasegawa, 2006; Cai *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2011). A través de análisis de doble híbrido en levaduras se demostró que *OsNAR2.1* interactúa con *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* y *OsNRT2.3a* (Yan *et al.*, 2011). De igual manera, mediante expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus*, se

demostró que OsNAR2.1 interacciona con OsNRT2.3a y no con OsNRT2.3b (Fan *et al.*, 2016).

Numerosos genes pertenecientes a la familia *NAR2* han sido identificados durante los últimos años en varias especies de plantas. En la actualidad tres genes *NAR2* de cebada (*HvNAR2.1-HvNAR2.3*) (Tong *et al.*, 2005), dos genes *NAR2* de *Arabidopsis* (*AtNAR2.1* y *AtNAR2.2*) (Kotur *et al.*, 2012), dos genes *NAR2* de arroz (*OsNAR2.1* y *OsNAR2.2*) (Yan *et al.*, 2011), un gen *NAR2* de crisantemo (*CmNAR2*) (Gu *et al.*, 2014) y un gen de *Chlamydonas* (*CrNAR2*) (Zhou *et al.*, 2000) han sido caracterizados. Sin embargo, se tiene muy poca información en la literatura de este tipo de proteínas en la familia de las *Solanaceae*. En *Nicotina plumbaginifolia* *NpNRT2.1*, que es un ortólogo de *AtNRT2.1*, puede complementar la mutante *atnrt2.1-1*, pero no a las mutantes *atnar2.1* (Orsel *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que *NpNRT2.1* pudiera estar participando en el transporte de NO_3^- , pero no se sabe si necesite de una proteína accesoria para llevar a cabo esta función.

Actualmente en la base de datos del NCBI hay reportes de secuencias deducidas de aminoácidos para proteínas del tipo *NAR2* dentro del género *Capsicum*, específicamente en especies de *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum* y *Capsicum baccatum*. Sin embargo, la información acerca de su regulación y funcionamiento es prácticamente nula. Por lo tanto, el poder aislar y caracterizar molecularmente el ADNc total que codifica para una posible proteína *NAR2* de *Capsicum chinense* Jacq. sería un avance importante en el estudio de estos genes en *solanaceae* y brindaría un acercamiento de la interacción y el funcionamiento de estas proteínas con las proteínas *NRT2* en el transporte de NO_3^- .

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Las plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq. cv. naranja) fueron germinadas *in vitro* a partir de semillas comerciales de la empresa Seminis. Las plántulas se desarrollaron durante 45 días en condiciones de hidroponía con medio Hoagland modificado (Richard-Morland *et al.*, 2008; Santiago-Antonio *et al.*, 2014) a 1/5 de su fuerza iónica; con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, las plantas fueron colocadas en medio Hoagland modificado (Richard-Morland *et al.*, 2008) sin NO_3^- por 96 hrs. Pasado este tiempo las plantas se colocaron nuevamente en medio Hoagland

modificado (Richard-Morland *et al.*, 2008) con 1 mM de NO_3^- por 96 hrs. El material biológico fue colectado (0.1 gr de raíz), congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C para su posterior uso.

2.2.2. Clonación y obtención del gen *CcNAR2*

Para la clonación del ADNc total se diseñaron cebadores que permitieron la amplificación del marco de lectura completo de *CcNAR2* (desde el ATG de inicio hasta el TGA de parada). Para ello, se utilizó la secuencia NAR2 de *Capsicum annuum* (AF492634), la cual presentó una alta homología con la secuencia AtNAR1 de *Arabidopsis thaliana*, previamente caracterizada. Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa Oligo (<http://www.oligo.net>). El tamaño de los cebadores fijado en el programa fue de 20 nucleótidos. Las secuencias de los cebadores para *CcNAR2* fueron NAR-F: 5'ATGGCAAGTACACCTGCTAT3' y NAR-R: 5'TCATTTACTTGCCTTGGCAT3'.

Como molde se usó el ARN total extraído de las raíces de plántulas de chile habanero (0.1 gr) creciendo en condiciones de 1 mM de NO_3^- , anteriormente descritas. El ARN total fue extraído usando la metodología de TRIZOL (Invitrogen) y tratado con Turbo DNAsa (2U/ μl) (Invitrogen). La concentración y calidad del ARN fueron analizados con el NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC) y con un gel de agarosa al 1 % (p/v), respectivamente.

La primera hebra de ADNc fue sintetizada a partir del ARN total (1 μg) mediante transcripción reversa usando el Kit de la enzima Superscrip II (Invitrogen) y siguiendo la metodología del proveedor. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* usando cebadores específicos sintetizados previamente.

La mezcla de reacción para *CcNAR2* contenía 2.5 μl del amortiguador de la reacción 10X; 1 μl de dNTP's (10 mM); 2 μl de MgCl_2 (50 mM); 2 μl del cebador F-NAR2 (10 mM); 2 μl del cebador R-NAR2 (10 mM); 0.2 μl de la enzima Taq Platinum (5 U/ μl) (Invitrogen); 1 μl de ADNc. El programa de PCR fue el siguiente: 96°C por 1 min., 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 55.8°C por 30 seg. y 72°C por 45 seg., 72°C por 10 min. y éste se desarrolló en un termociclador My Cyler (BIO-RAD). Para visualizar los fragmentos amplificados, las muestras respectivas se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) en 30 ml de TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.

Una vez que se identificaron en el gel las bandas que correspondían a los fragmentos esperados, se procedió a su extracción y purificación de acuerdo al protocolo que

proporciona el proveedor del kit QIAEX II Agarosa Gel Extraction Protocol (*QIAGEN*). Para verificar la pureza de los fragmentos, una alícuota de cada uno se aplicó en un gel de 1% (p/v) de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Se procedió a la ligación de éstos al plásmido pGEM-T Easy (Promega), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. La mezcla de reacción para ambos genes se realizó de la siguiente manera: 1 µl del vector pGEM-T Easy; 3 µl del producto de ADNc de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* purificados; 1 µl de la enzima T4 ligaza (3 U/µl) (Promega); 5 µl amortiguador 2X.

Para la verificación de la ligación se realizó una reacción de PCR para *CcNAR2*. Las mezclas y las condiciones del PCR fueron las mismas que las utilizadas anteriormente.

Una vez comprobado que se obtenían únicamente las bandas deseadas de aproximadamente 609 pb, se procedió a su purificación mediante el kit QIAprep Spin (*QIAGEN*). Para confirmar las identidades, los ADNc insertados en el plásmido pGEM-T Easy, fueron secuenciados en ambos extremos por la compañía Macrogen, utilizando los cebadores universales SP6 y T7; así como también los cebadores específicos NAR-F y NAR-R.

2.2.3. Análisis *in silico* de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

A partir de la secuencia completa de nucleótidos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* y el empleo del programa bioinformático GeneRunner, se obtuvieron las secuencias deducidas de aminoácidos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*. Para los análisis bioinformáticos se utilizaron como secuencias de referencia las secuencias aminoácidas de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*, esta búsqueda se llevó a cabo utilizando los programas BLASTp en las bases de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y Phytozome 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), en ambos casos se usaron parámetros predeterminados de cada una de las bases de datos.

Para conocer la masa molecular y el punto isoeléctrico sugerido para cada una de las proteínas se empleó el programa Compute pI/Mw tool (<http://expasy.org/>). La predicción de los dominios transmembranales de *CcNAR2* fue determinado usando el programa bioinformático TOPCONS (Tsirigos *et al.*, 2015) (<http://topcons.cbr.su.se>). El programa STRING 10 (<http://string-db.org>) se utilizó para determinar las posibles interacciones entre las proteínas deducidas *CcNRT2.1* y *CcNAR2*.

La reconstrucción filogenética se realizó con base en la secuencia de aminoácidos, teniendo en cuenta solo los marcos de lectura abiertos de todas las secuencias incluidas en dicho análisis. Se desarrollaron dos árboles filogenéticos, uno correspondiente a las proteínas NRT2 y otro correspondiente a las proteínas NAR2. El árbol filogenético correspondiente a las proteínas NRT2 se realizó con 307 secuencias de proteínas de diferentes especies de plantas, algas verdes, musgos, hongos, levaduras, bacterias y cianobacterias, incluyendo a la secuencia de chile habanero aislada en nuestro laboratorio. El árbol filogenético correspondiente a las proteínas NAR2 se desarrolló con 151 secuencias de diferentes especies de plantas, algas verdes y musgos, incluyendo a las secuencias de chile habanero aisladas en nuestro laboratorio. Para probar la monofilia de los transportadores de NO_3^- de alta afinidad y de las proteínas NAR2 de solanáceas se utilizaron tres grupos externos de tres especies: *Escherichia coli* (Zheng *et al.*, 2013) para las proteínas NRT2; así como *Clamydomonas reinhardtii* (Quesada *et al.*, 1994) y *Physcomitrella patens* (Bruch y Schimp, 1849) para las proteínas NAR2. Para el enraizamiento del árbol correspondiente a las proteínas NRT2 se utilizó a las bacterias NarK y NarU de *Escherichia coli*, por ser los organismos más primitivos dentro del grupo de proteínas. Para el enraizamiento del árbol correspondiente a las proteínas NAR2 se utilizó a *C. reinhardtii*, de igual manera, por considerarse el organismo más primitivo dentro de los dos grupos externos.

El alineamiento múltiple de secuencias de proteínas del tipo NRT2 y NAR2, fue realizado usando MUSCLE (multiple sequence comparison by log-expectation, por sus siglas en inglés), usando parámetros predeterminados, y el alineamiento resultante fue usado para construir los árboles filogenéticos correspondientes. La historia evolutiva se infiere utilizando el método de Maximum Likelihood, usando parámetros definidos; el modelo utilizado fue el de Jones-Taylor-Thornton (JTT); el tipo de sustitución usada fue el de aminoácidos, con una completa delección de gaps. El análisis realizado fue de reconstrucción de filogenia y las distancias evolutivas (expresado como el número de aminoácidos diferentes por sitio) se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson. El análisis evolutivo se llevó a cabo en el programa bioinformático MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) (<http://www.megasoftware.net/>), los valores de Bootstrap para los árboles fueron calculados usando un porcentaje de 1000 ensayos con un número definido de 1000 para el generador de números al azar (Felsenstein, 1985). El diseño de los árboles se realizó empleando el programa FigTree 4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Las nomenclaturas y números de acceso de las secuencias usadas para el diseño de los árboles filogenéticos, tanto de NRT2 como de NAR2, se muestran en los cuadros en anexo A1 y A2, respectivamente.

La localización subcelular putativa de CcNRT2.1 y CcNAR2 fueron predichas mediante la utilización de diferentes programas bioinformáticos: Cell-Ploc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>), CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>), Euk-mPloc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi/>), HybridGO-Loc Server (<http://bioinfo.eie.polyu.edu.hk/HybridGoServer/>) y Plant subcelular localization integrative predictor (PSI) (<http://bis.zju.edu.cn/psi/>).

El diseño de la estructura tridimensional de las proteínas CcNRT2.1 y CcNAR2 se realizó usando los servidores en línea I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) y Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

2.2.4. Localización de los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en los diferentes órganos de la planta

El RNA total de raíz, tallo y hoja fue extraído de plántulas de 45 días de edad creciendo en condiciones de hidroponía usando las sales de la solución Hoagland, las cuales fueron expuestas a un período de ausencia de N y posteriormente tratadas con 1 mM de KNO₃, bajo las mismas condiciones que las descritas en el apartado 2.2.1.

Para la extracción del RNA total de flor y fruto (pericarpio, placenta y semilla), se utilizaron plantas creciendo en condiciones de invernadero que tenían aproximadamente 60 días post-trasplante.

El material biológico fue colectado, congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C para su posterior uso en la extracción de ARN.

2.2.5. Efecto del tiempo de fotoperíodo sobre los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

Las plántulas de 45 días de edad que crecieron en las condiciones anteriormente descritas, fueron divididas en siete grupos, colocadas en vasos de precipitado de 100 ml, cada vaso contenía cinco plántulas. Se usó como solución nutritiva al medio Hoagland y las

condiciones de crecimiento fueron: un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad a 25 °C. Las plántulas se mantuvieron bajo estas condiciones durante 24 hrs.

Se cosecharon las raíces a partir del inicio del período de luz, esto fue a las 6:00 am (0 hrs luz), 9:00 am (3 hrs luz), 1:00 pm (7 hrs luz), 5:00 pm (11 hrs luz), 10:00 pm (16 hrs luz ó 0 hrs oscuridad), 1:00 am (3 hrs oscuridad) y 5:00 am (7 hrs oscuridad).

2.2.6. Efecto de factores abióticos sobre los niveles de ARNm de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

2.2.6.1. Efecto de la fuente nitrogenada

Las plántulas creciendo durante 45 días bajo las condiciones anteriormente descritas, fueron sometidas a un periodo de 96 hrs de ausencia de N, eliminando de la solución Hoagland el KNO_3 y adicionando 1 mM de KCl, para compensar el K en el medio. Una vez pasadas las 96 hrs, las plántulas se colocaron en presencia de 1mM de diferentes fuentes de N: KNO_3 , NH_4Cl_2 y glutamato de potasio. Como tratamiento testigo se utilizó 1 mM de KCl. La exposición de las plántulas a diferentes fuentes de N se realizó por un período máximo de cuatro hrs, realizando evaluaciones a las 0, 1, 2 y 4 hrs de exposición a dichas fuentes. Para este experimento se utilizaron 18 plántulas por tratamiento, teniendo un total de 72 plántulas.

Para llevar a cabo el análisis de la expresión diferencial se colectó el material biológico (0.1 gr de raíces), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.2.6.2. Evaluación de los cambios en los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en respuesta a diferentes concentraciones de NO_3^-

Las plántulas creciendo bajo las condiciones descritas en el apartado 2.2.1, fueron colocadas durante cuatro días (96 hr) en ausencia de N (testigo, KCl 1 mM), y se sometieron a diferentes concentraciones de NO_3^- (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) por 96 hrs. Pasado este tiempo, se les cambio el medio por uno nuevo conteniendo las mismas concentraciones de NO_3^- mencionadas anteriormente. A las 24 hrs se colectó el material biológico (0.1 gr de raíces), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.2.6.3. Efecto de la adición de sacarosa sobre los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

Las plántulas de 45 días de edad fueron transferidas a vasos de precipitado de 100 ml, conteniendo cada vaso cinco plántulas, con medio Hoagland modificado a la mitad de su fuerza iónica (Richard-Morland *et al.*, 2008), las cuales se encontraban bajo un ciclo de luz/obscuridad de 16 hr luz/8 hr oscuridad. Para este experimento las plántulas se dividieron en dos grupos de tres vasos con 50 ml de solución Hoagland modificada, conteniendo 1mM de KNO_3^- (Richard-Morland *et al.*, 2008) con cinco plántulas cada uno. Para evaluar el efecto de la sacarosa, las plántulas se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente hasta el inicio del experimento. Al inicio del período de oscuridad se adicionó sacarosa a la solución nutritiva de un grupo de plántulas, a una concentración de 1 % (p/v) y al otro grupo de plántulas se les mantuvo sin sacarosa en su solución nutritiva. En todos los experimentos en que se adicionó sacarosa, se añadió 50 mg/l de penicilina y 25 mg/l de cloranfenicol a la solución nutritiva, para evitar el crecimiento bacteriano. Adicionalmente se utilizaron testigos con ambos antibióticos. La cosecha del material vegetal se llevó a cabo a las 22:00, 01:00 y 05:00 hrs, correspondiendo a las 0, 3 y 7 hrs del período de oscuridad.

2.2.6.4. Efecto de la luz sobre los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

2.2.6.4.1. Intensidad de luz

Con el objeto de conocer el efecto que produce la intensidad de la luz sobre los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*, las plántulas creciendo como se indica anteriormente se dividieron en cuatro grupos, cada uno de ellos con 15 plántulas (tres vasos con cinco plántulas cada uno). En cada vaso se adicionó 50 ml del medio Hoagland modificado conteniendo 1mM de KNO_3^- (Richard-Morland *et al.*, 2008). A cada grupo se les adicionó malla sombra a diferentes porcentajes. Al primer grupo de 15 plántulas, se les colocó bajo una intensidad normal de luz, sin malla sombra ($180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), al siguiente grupo de plántulas se les colocó malla sombra al 50 % ($70 \mu\text{mol. M}^{-2}. \text{S}^{-1}$), al tercer grupo se le adicionó malla sombra al 70 % ($65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y al último se trató con una malla sombra al 90 % ($54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La malla fue colocada al inicio del fotoperíodo (6:00 am ó 0 hrs

luz) y las raíces fueron cosechadas a las 9:00 am (3 hrs luz), 1:00 pm (7 hrs luz) y 5:00 pm (11 hrs luz).

2.2.7. Evaluación de los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero

Las semillas de *Capsicum chinense* Jacq. (cv.naranja), se desinfectaron y se colocaron en cajas de Petri para su germinación, siguiendo el protocolo descrito por Celis-Arámburo *et al.*, (2011). Cuando ocurrió la protrusión de la radícula (de 4 a 5 días), las semillas germinadas fueron transferidas al modelo *in vitro*.

En este caso, las semillas germinadas se colocaron en cajas de Petri con el medio de crecimiento denominado medio basal B₅: 23 mM ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 5.8, sacarosa al 0.5% (p/v), agar-agar al 1% (p/v) y las sales del medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) diluidas 1:50, al cual se le eliminó la fuente de N y se le adicionó 1 mM de KNO₃ como única fuente de N. Las cajas fueron colocadas verticalmente, en condiciones de oscuridad, hasta que la RP alcanzó una longitud de aproximadamente 7 ± 0.5 cm (aproximadamente de 10 a 12 días). Posteriormente, fueron colocadas durante cuatro días (96 hr) en solución Hoagland sin N, pasado este tiempo se sometieron a una concentración de 0.5 mM NO₃⁻ por 6 hrs. Al término de este tiempo, se colectó el material biológico (raíz, tallo y hoja). La raíz se seccionó en tres regiones de acuerdo a la distancia desde el ápice: 0-20 mm (Zona 1, Z1), 21-41 mm (Zona 2, Z2) y 42-62 mm (Zona 3, Z3). El material biológico se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.2.8. Extracción del ARN total y análisis de los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

Para la extracción del ARN total de los diferentes tratamientos, se utilizó la metodología del TRIZOL, en la cual se usó 0.1 gr de tejido de raíz pulverizado, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadió 1 ml del reactivo de TRIZOL (Invitrogen). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12 000 g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se le adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó manual y vigorosamente y se incubó por 2-3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12 000 g por

15 min a 4°C. A la fase acuosa se le adicionó 500 µl de isopropanol y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12 000 g por 10 min a 4°C, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 7 500 g (8 500 rpm) por 5 min a 4°C. La pastilla se dejó secar de 60 a 120 min. El ARN total se resuspendió en 30-50 µl de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril. Para la cuantificación, las muestras de ARN de cada tratamiento se leyeron a 260 nm en el equipo NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC) y su integridad fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v), teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, el ARN total fue tratado con Turbo DNase (2 U/µl) (Invitrogen) a 37 °C por 1hr y la reacción se detuvo a 65 °C por 30 min.

Se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante transcripción reversa. Cada reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, el cual contenía 1 µg/µl de ARN, 1µl de oligo dT (25 µM) y 1 µl de dNTP'S (10 mM). La mezcla se homogenizó y incubó a 65 °C durante 5 min, colocándose posteriormente a 4 °C durante 3 min. Para la reacción se adicionó 4 µl del amortiguador 5X de la enzima Superscrip II (Invitrogen), 2 µl de DTT (0.1 M) y 1 µl de ARNase out (400 U/µl) (Invitrogen); seguidamente se homogenizó y se incubó a 42 °C durante 5 min. Por último, a la mezcla se le adicionó 1 µl de la enzima Superscrip II (Invitrogen) y se dejó reaccionar a 42 °C durante 50 min. Para detener la reacción, la mezcla fue incubada a 70 °C durante 15 min.

Una vez obtenida la primera cadena de ADNc se procedió a evaluar los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* bajo los diferentes tratamientos, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos sintetizados previamente, los cuales fueron diseñados con base a la secuencia de ADNc de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*. La secuencia de los cebadores para *CcNRT2.1* fue: F-319: 5'GCTGCCGCCCTTTAGTCCC3' y R-741: 5'-ACGCAATTCTCCAAGCAGTG-3'. La mezcla de reacción contenía 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1 µl de dNTP (10 mM); 1 µl de MgCl₂ (50 mM); 2 µl del oligo F-319 (10 µM); 2 µl del oligo R-741 (10 µM); 1 µl de la enzima Taq. Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNc. El programa de PCR fue el siguiente: 95 °C por 1 min, 30 ciclos (el número de ciclos fue ajustado en cada condición) de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 75 °C por 40 seg, 72 °C por 10 min.

Para *CcNAR2*, la secuencia de los cebadores fueron: F-228: 5'-GCTATGTTACGCTCCGATTA-3' y R-447: 5'-CCTTCTTGTCATCAGTGTTTC-3'. La mezcla de reacción se preparó con 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1µl de dNTP's (10 mM); 1 µl de MgCl₂ (50 mM); 2 µl del cebador F-228 (10 mM); 2 µl del cebador R-447 (10 mM); 0.2 µl de la enzima Taq Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNc. El programa de

PCR fue el siguiente: 95 °C por 1 min., 28 ciclos de 95 °C por 30 seg., 51.3 °C por 30 seg. y 75 °C por 25 seg., 72 °C por 10 min. Ambas PCR's se desarrollaron en un termociclador My Cycler (BIO-RAD).

Para visualizar los posibles fragmentos amplificados por PCR, las muestras respectivas se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) en 50 ml de TAE 1 X, adicionado con 2.5 µl de bromuro de etidio para *CcNRT2.1* y 3.3 µl de GelRed™ (Biotium) para *CcNAR2*.

Como testigo de carga, se amplificó el gen de la tubulina, usando los cebadores y las condiciones de amplificación descritas en Santiago-Antonio *et al.*, (2014).

2.2.9. Estimación de la absorción de NO₃⁻ mediante el cambio en el pH apoplástico de las diferentes zonas de la raíz de chile habanero

Se utilizaron plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. (cv.naranja), germinadas y crecidas *in vitro*, tal como se describió en 2.2.7. Las raíces fueron seccionadas en las regiones Z1, Z2 y Z3, respectivamente. Como marcador de pH apoplástico se utilizó el fluoróforo Oregon Green® 488 (Thermo Fisher). Se usaron tres réplicas para cada zona de la raíz para el tratamiento con el fluoróforo (NO₃⁻ + Oregon Green® 488), tres réplicas para cada zona de la raíz en el tratamiento sin fluoróforo (NO₃⁻ - Oregon Green® 488), una replica de cada zona de la raíz para el tratamiento testigo (sin NO₃⁻ + Oregon Green® 488) y una replica de cada zona de la raíz para el tratamiento testigo (sin NO₃⁻ - Oregon Green® 488).

Cada zona de la raíz fue incubada con 600 µl del medio B₅ más 5 µl de Oregon Green® 488 (Thermo Fisher) a una concentración de 1 mM; posteriormente se incubaron por 3 min. a temperatura ambiente; después se pasaron a una solución de CaCl₂ 0.5 mM y se incubaron por 5 min. a temperatura ambiente. Después de este tiempo se montaron en los portaobjetos, usando glicerol al 96 % (v/v), se les colocaron los cubreobjetos, se sellaron con esmalte y se visualizaron en un microscopio confocal FV-1000 (Olympus, Tokio, Japón) a una longitud de onda de excitación de 488/514 nm y una longitud de onda de emisión de 592 nm.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de las proteínas NAR2 de *Capsicum chinense* Jacq.

Como resultado de la clonación y con los resultados obtenidos mediante secuenciación, se obtuvieron 18 clonas positivas, 11 de las cuales resultaron ser iguales y siete diferentes entre sí, teniendo al final ocho clonas con secuencias diferentes; las cuales se nombraron como CcNAR2_C1-C8. Estas clonas fueron secuenciadas de nuevo en ambos extremos para verificar los resultados obtenidos anteriormente, ahora utilizando cebadores específicos. Los resultados de la secuenciación utilizando los cebadores específicos se analizaron y se verificó que en efecto eran ocho clonas diferentes de NAR2.

Para verificar la posible interacción de CcNRT2.1 y CcNAR2 mediante análisis *in silico*, moleculares y bioquímicos, se utilizaron tres de las ocho clonas obtenidas: CcNAR2_C1, CcNAR2_C6 y CcNAR2_C7, las cuales se eligieron con base a la diferencia en la secuencia de aminoácidos y se renombraron como CcNAR2_C1, CcNAR2_C2 y CcNAR2_C3, respectivamente. Todos los análisis que a continuación se presentan fueron realizados con estas tres clonas seleccionadas. Las clonas de CcNAR2 (C1, C2 y C3) de *Capsicum chinense* Jacq. tuvieron un tamaño de 609 pb. La secuencia deducida de aminoácidos fue de 202 residuos, con una masa molecular predicha de 22.66, 22.68 y 22.53 kD, y un pI predicho de 8.73, 8.51 y 8.68, respectivamente. Estas clonas tuvieron una identidad de 99.5% entre CcNAR2_C1 y CcNAR2_C7 y de 96.5% entre la CcNAR2_C1 y CcNAR2_C6. El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos deducida indica que las CcNAR2 de chile habanero son altamente similares a otros miembros de la familia NAR2 de proteínas accesorias de NO₃⁻ de plantas, especialmente de la familia de las Solanaceas, incluyendo a *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotina attenuata*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennelli* y *Solanum tuberosum* (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Análisis de identidad de las clonas de NAR2 de Chile habanero (CcNAR2_C1, CcNAR2_C2 y CcNAR2_C3) con sus homologos en *Solanaceae*s. Como se observa en el cuadro, las clonas CcNAR2_C1, _C2 y _C3 presentaron un alto grado de identidad con otros miembros de la familia de *Solanaceae*s, especialmente con los miembros del género *Capsicum*.

| Nombre | Especie | Identidad CcNAR2_C1 (%) | Identidad CcNAR2_C2 (%) | Identidad CcNAR2_C3 (%) | Número de accesión |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| CaNAR3.2 | <i>Capsicum annuum</i> | 97 | 94 | 97 | AAM12786.1/ NP_001311768.1 |
| CaNAR3.2 | <i>Capsicum annuum</i> | 99 | 95 | 98 | PHT87990.1 |
| CaNAR3.2 | <i>Capsicum annuum</i> | 91 | 90 | 91 | XP_016567660.1 |
| CaNAR3.2 | <i>Capsicum annuum</i> | 97 | 97 | 96 | PHT87993.1 |
| CbNAR3.2 | <i>Capsicum baccatum</i> | 99 | 96 | 99 | PHT53801.1 |
| CbNAR3.2 | <i>Capsicum baccatum</i> | 93 | 91 | 92 | PHT53804.1 |
| CcNAR3.2 | <i>Capsicum chinense</i> | 99 | 96 | 99 | PHU23681.1 |
| CcNAR3.2 | <i>Capsicum chinense</i> | 92 | 91 | 92 | PHU23685.1 |
| NatNAR3.1 | <i>Nicotiana attenuata</i> | 74 | 71 | 73 | XP_019262435.1 |
| NatNAR3.2 | <i>Nicotiana attenuata</i> | 70 | 71 | 69 | XP_019261908.1 |
| NsNRT3.1 | <i>Nicotiana sylvestris</i> | 76 | 73 | 75 | XP_009798081.1 |

| | | | | | |
|-----------|----------------------------------|----|----|----|----------------|
| NtaNAR3.1 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 76 | 74 | 76 | XP_016444829.1 |
| NtaNAR3.2 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 72 | 69 | 71 | XP_016498467.1 |
| NtoNRT3.2 | <i>Nicotiana tomentosiformis</i> | 74 | 72 | 74 | XP_009610897.1 |
| SINRT3.2 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 74 | 73 | 73 | XP_010319027.1 |
| SpeNAR3.2 | <i>Solanum pennelli</i> | 75 | 74 | 75 | XP_015069077.1 |
| StNRT3.1 | <i>Solanum tuberosum</i> | 73 | 72 | 73 | XP_006344484.1 |

2.3.1.1. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas CcNAR2 de chile habanero

El perfil de hidrofobicidad y las posibles regiones transmembranales de las proteínas CcNAR2 se dedujeron utilizando el programa TOPCONS. Para este análisis los resultados obtenidos fueron los mismos para las tres clonas; por lo que únicamente se presenta el resultado de la clona CcNAR2_C1. El programa indicó que CcNAR2 presenta una sola región transmembranal, la cual se ubica en el extremo C-terminal. De igual manera se obtuvo que la secuencia primaria de esta proteína presenta un péptido señal al inicio de la secuencia (Figura 2.1).

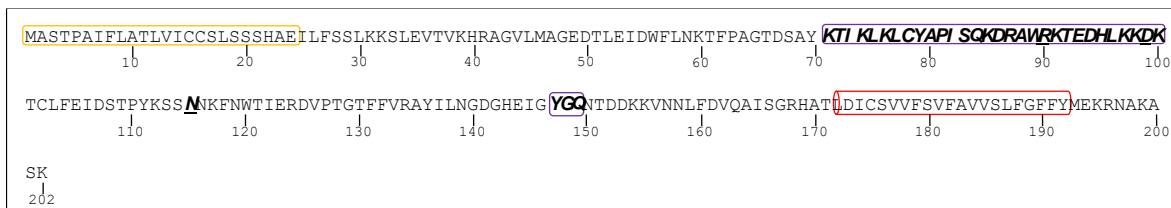


Figura 2.1. Topología predicha para la proteína CcNAR2. Secuencias de aminoácidos hidrofóbicos que forman la región intramembranal (cilindro color rojo). En la caja color amarillo se encuentran los aminoácidos que forman el

peptido señal. Las firmas de aminoácidos conservados en la familia de las proteínas NAR2 (K-X2-K-X2-LCY-X2-S-X3-R-X-WR-X3-D-X4-DK y YGQ) se encuentran en negritas, cursivas y en cajas color lila. En negritas, cursivas y subrayados se encuentran los posibles residuos aminoácidos que participan en la interacción con proteínas NRT2 en homólogos de *Arabidopsis* y cebada. La topología se obtuvo a través del programa TOPCONS.

Este resultado concuerda con lo reportado para otras proteínas NAR2 de otras especies de plantas y de *Chlamydomonas reinhardtii* (Tong *et al.*, 2005). Además, la posible presencia de un péptido señal de aproximadamente 20 aminoácidos podría ser el que dirija a la proteína NAR2 hacia la membrana plásmatica.

2.3.1.2. Localización subcelular de las proteínas CcNRT2.1 y CcNAR2

Ha sido muy documentado y demostrado que las proteínas del tipo NRT2 son proteínas membranales y que éstas interactúan con proteínas NAR2 en la membrana plásmatica. Sin embargo, las proteínas NAR2 se especulan que pueden estar en el citosol y que cuando llega el momento en el que se requiera de la toma de NO_3^- de alta afinidad, éstas se asocian con las proteínas NRT2 y las dirigen a la membrana. De igual manera se sugiere que pudieran actuar también protegiendo a las proteínas NRT2 de degradaciones (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011).

Para poder identificar las posibles localizaciones subcelulares de CcNRT2.1 y CcNAR2 se procesaron las secuencias completas de ambas proteínas con cinco distintos programas bioinformáticos descritos en los materiales y métodos.

Los resultados obtenidos en los cinco programas bioinformáticos coinciden y sugieren que la proteína CcNRT2.1 se localiza en la membrana plásmatica. Este resultado concuerda con lo reportado para este tipo de proteínas, como es el caso de AtNRT2.1 (Wirth *et al.*, 2007), OsNRT2.1, OsNRT2.3a y OsNRT2.3b (Yan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2016).

En cambio, existió divergencia para la localización subcelular de las proteínas NAR2 entre los programas, indicando a la membrana plásmatica, el citosol o incluso el núcleo como posibles sitios de localización (Cuadro 2.2). Existe poca información de la localización

subcelular de estas proteínas, únicamente se sabe es que al estar formando los complejos con las proteínas NRT2, se podrían localizar en la membrana plásmática (Chopin *et al.*, 2007; Kotur y Glass, 2015). Sin embargo, es probable que estas proteínas también se encuentren en el citosol, ya que debido a que son proteínas pequeñas y que presentan mayoritariamente regiones hidrofílicas.

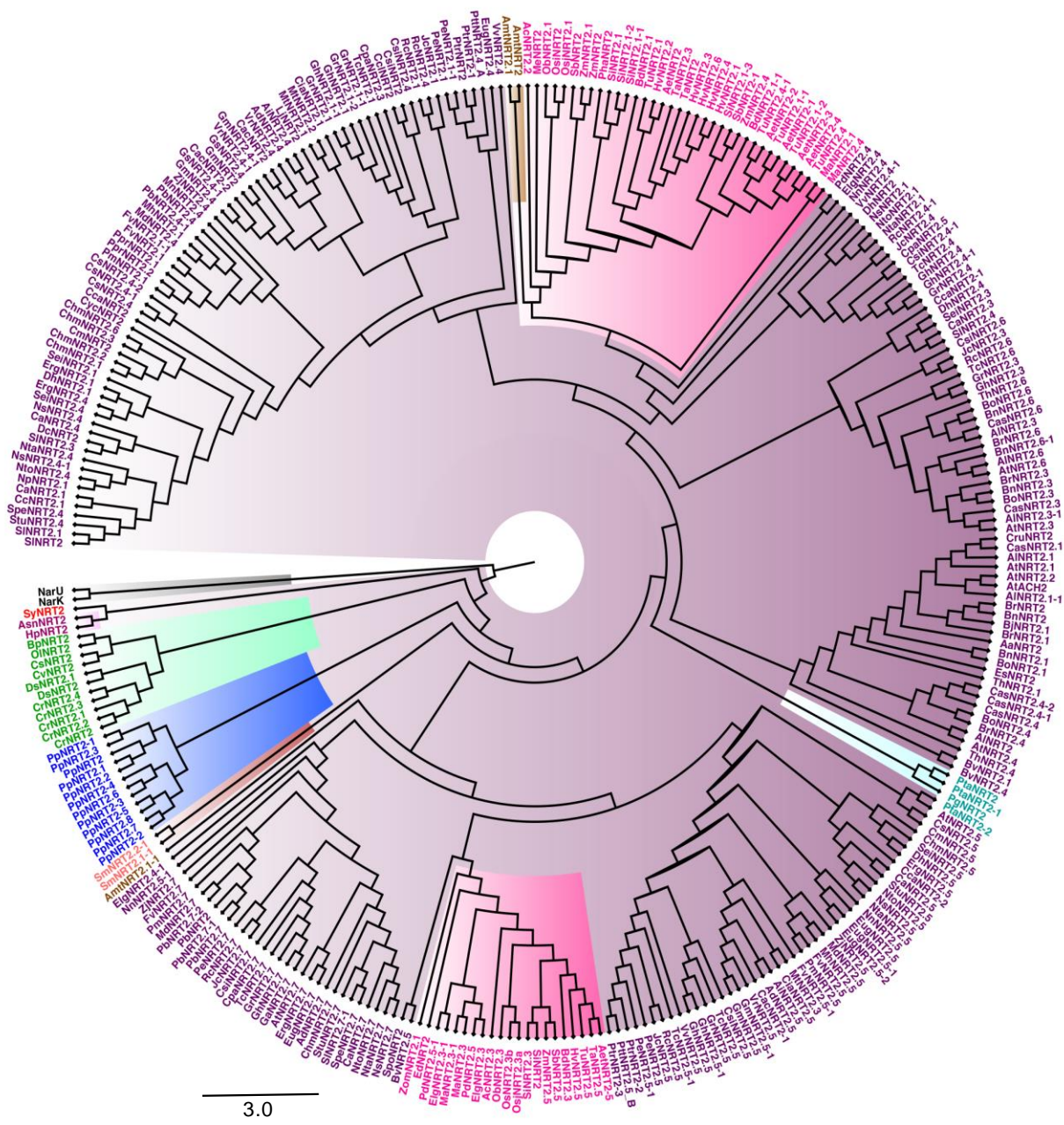
La predicción de la localización subcelular nos indica que durante la evolución los NRT2 han conservado fuertemente algunas regiones en sus secuencias que le han permitido mantener esta localización y que esta conservación de secuencias es clave para la conservación de la función de estas proteínas en la toma de NO_3^- de alta afinidad.

Cuadro 2.2. Localización subcelular *in silico* de CcNRT2.1 y CcNAR2 de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). MP: membrana plasmática; C: citosol; N: núcleo y E: región extracelular.

| Programa | CcNRT2.1 | CcNAR2 |
|---------------------|----------|--------|
| Cell-Ploc 2.0 | MP | N |
| CELLO2GO | MP | E |
| Euk-mPloc 2.0 | MP | C |
| HybridGO-Loc Server | MP | MP |
| PSI | MP | E |

2.3.1.3. Árbol filogenético de las proteínas NRT2 y NAR2

Para el análisis filogenético se utilizaron 307 secuencias de proteínas NRT2 y 151 secuencias de proteínas NAR2 (Cuadros A1 y A2 en anexos, respectivamente). Para este análisis y en el resto de este trabajo se seleccionó únicamente a la secuencia de la CcNAR2_C1 de chile habanero, por ser ésta la más representada en las raíces de chile habanero, dado por el número de clonas secuenciadas que resultaron iguales a ella. Los árboles filogenéticos correspondientes a ambas proteínas se presentan en la Figura 2.2.



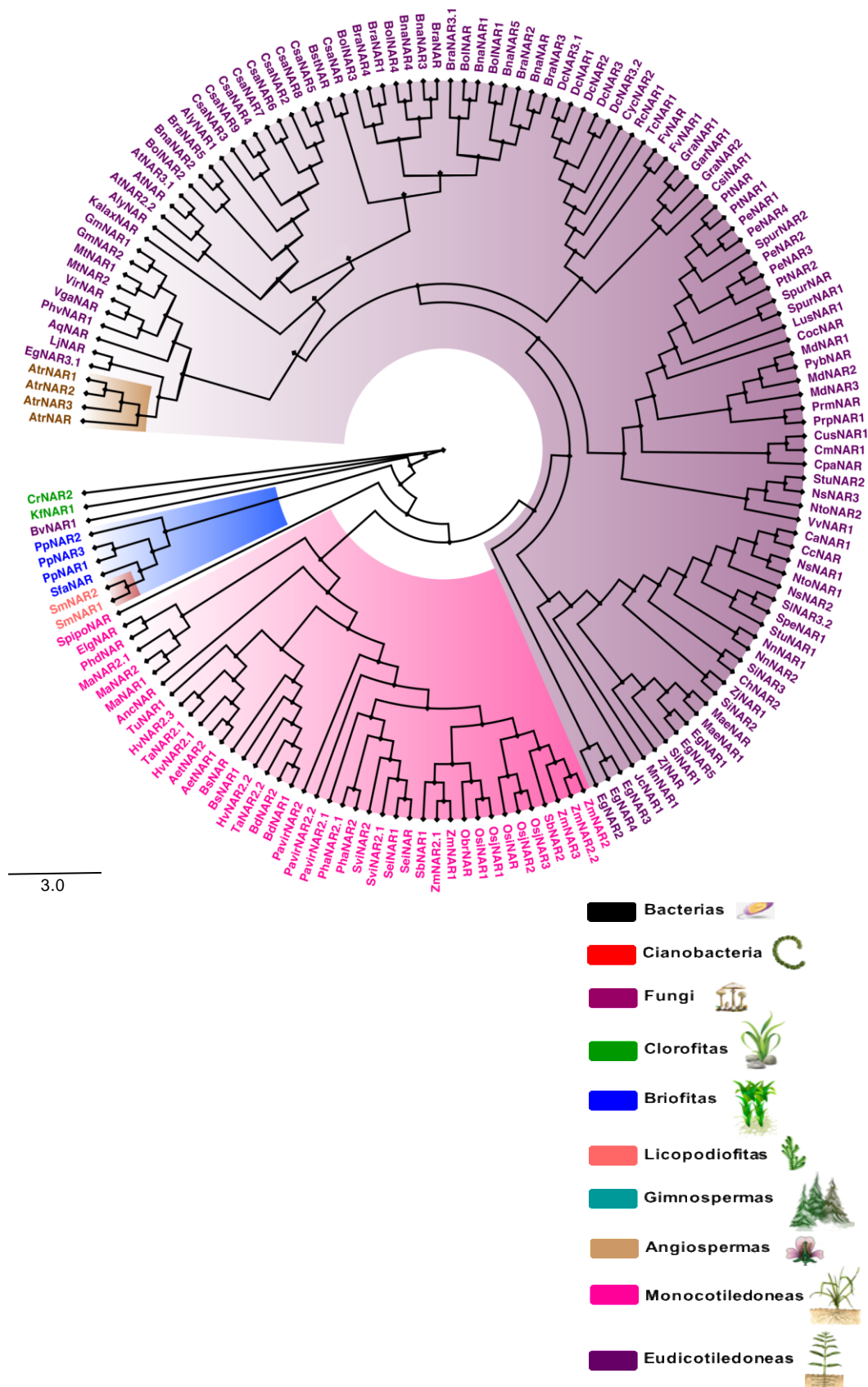


Figura. 2.2. Árboles filogenéticos de los transportadores de NO_3^- de alta afinidad (NRT2) (A) y las proteínas relacionadas con la asimilación de NO_3^- (NAR2) (B). Los porcentajes de bootstrap están dados por cada rama y la escala representa tres sustituciones por sitio. A) En el análisis se incluyeron, además de la proteína CcNRT2.1, aquellas de bacterias, cianobacterias, hongos, levaduras, algas verde, musgos y otras plantas superiores, siendo 307 secuencias que se tomaron en cuenta para el análisis. Como miembros externos se usaron las secuencias Nark y NarU de *Escherichia coli*. Los números de accesoión y el significado de la nomenclatura se presentan en el cuadro A1. B) En el análisis se incluyeron, además de la proteína CcNAR2 de chile habanero, aquellas de alga verde, musgos y otras plantas superiores, siendo 151 secuencias totales. Como miembros externos se usaron a las secuencias de la briofita *Physcomitrella patens* y la clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*. Los números de accesoión y el significado de la nomenclatura se presentan en el cuadro A2 (anexo). Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas usando el programa MUSCLE; los árboles filogenéticos se construyeron usando el programa MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) y se editaron en el programa FigTree 4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

El árbol filogenético para las proteínas NRT2 indica que todas estas proteínas provienen de un ancestro común, es decir que tienen un origen monofiletico. La reconstrucción filogénetica indica que en angiospermas hay una clara separación en dos grupos, uno formado por monocotiledóneas y otro por eudicotiledóneas. De igual manera se aprecia que hay una separación de las proteínas NRT2 pertenecientes a bacterias, cianobacterias, hongos y levaduras, con respecto a las proteínas NRT2 de *Viridiplantae*. En el clado de las briofitas, se presentan doce NRT2 de *Physcomitrella patens*, producto de una duplicación múltiple de genes. Para el clado de las licopodiofitas se presentan dos NRT2, esto como resultado de un único evento de duplicación. Hasta el día de hoy ninguno de estos genes han sido caracterizados funcionalmente. En la mayoría de las monocotiledóneas se encontraron proteínas NRT2 del tipo 2.1 hasta 2.5, con excepción de *Brachypodium distachyon* en el que hay reportado una proteína del tipo NRT2.6 y una del tipo NRT2.7. En eudicotiledóneas, a diferencia de las monocotiledóneas, se encontraron todos los tipos de proteínas NRT2 reportadas en la actualidad. La reconstrucción filogénetica sugiere que los NRT2.3, 2.5 y 2.7 son resultado de una duplicación de genes

que se dio en el mismo punto de la evolución junto con los NRT2 del tipo 2.1, 2.2, 2.4 y 2.6 de monocotiledóneas y eudicotiledóneas. Dentro de las eudicotiledóneas, más específicamente dentro de la familia de las Brassicales, se identifican dos grupos de genes paralogos en *Arabidopsis*: uno formado por AtNRT2.1, 2.2 y 2.4 y el otro formado por AtNRT2.3 y AtNRT2.6. La presencia de los diferentes tipos de proteínas NRT2 entre y dentro de los diferentes organismos sugiere funciones diferentes y particulares para cada una de estas proteínas. Así, para el caso de *Arabidopsis*, que es la especie en la que más se han estudiado estas proteínas, AtNRT2.1 y AtNRT2.2 son responsables del transporte de NO_3^- de alta afinidad en raíces. En particular, se ha reportado que AtNRT2.1 puede ser el principal componente del transporte de NO_3^- de alta afinidad en raíces bajo la mayoría de las condiciones (excepto cuando hay una limitación severa de N); ya que en mutantes knock-out de esta proteína el influjo de NO_3^- en las raíces disminuyó un 75% (Filleur *et al.*, 2001; Remans *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). AtNRT2.4 muestra una afinidad particularmente alta por NO_3^- , por lo que se cree que tiene una aportación significativa para la adquisición de NO_3^- cuando éste se encuentra a concentraciones externas muy bajas (Kiba *et al.*, 2012). De manera interesante AtNRT2.4 y ANRT2.5 se expresan en brotes, en donde contribuyen a la carga del NO_3^- en el floema (Kiba *et al.*, 2012; Lezhneva *et al.*, 2014). AtNRT2.5 es reprimido por NO_3^- , expresado en raíces y brotes, y contrario a los NRT2 de raíces, tiene una máxima expresión en ausencia de NO_3^- . Esto puede indicar una función en la remobilización del NO_3^- almacenado en las fosas de reserva (Orsel *et al.*, 2004). AtNRT2.3 y AtNRT2.6 son los menos caracterizados, sin embargo se sabe que la expresión de *AtNRT2.3* en brotes y raíces es ligeramente sensible al suministro de NO_3^- (Okamoto *et al.*, 2003) y *AtNRT2.6* tiene una expresión global muy baja, con mayor expresión en raíces. Lo que sugiere que AtNRT2.6 pudiera tener una función en la toma de NO_3^- a muy baja afinidad (Orsel *et al.*, 2004). AtNRT2.3 y AtNRT2.6 son capaces de mediar el transporte de NO_3^- en ovocitos de *Xenopus* (Kotur *et al.*, 2012); sin embargo, su función *in planta* permanece sin comprobarse. AtNRT2.7, a diferencia de los otros NRT2 que se localizan en membrana plasmática, se encuentra en el tonoplasto y tiene una importancia particular en la acumulación o almacenamiento de NO_3^- en las semillas (Chopin *et al.*, 2007). Estas diferencias en la secuencia de aminoácidos, localización y función pueden indicar que a lo largo de la evolución, estos cambios le pudieron permitir a los organismos adaptarse a cambios bruscos del medio ambiente y a nuevos nichos ecológicos, y por lo tanto sobrevivir.

El hecho de que se hayan encontrado transportadores pertenecientes a familias de plantas claramente agrupadas nos indica que entre especies de la misma familia hay un elevado porcentaje de conservación de estas secuencias. De igual manera, se encontraron secuencias de proteínas de una familia que se agruparon con proteínas de otras familias diferentes, lo cual pudiera indicar que pueden haber ocurrido cambios en sus secuencias que permitieran la adaptación de estos miembros de la familia a cambios ambientales bruscos, más sin embargo, conservan firmas que les confieren su identidad como proteínas de un grupo específico. Tal es el caso de de las musáceas, que por su secuencia se parece más a las eudicotiledoneas, siendo ésta una especie monocotiledóneas.

Interesantemente, muchos de los genes NRT2 de plantas que se agruparon dentro del clado de los que se expresan en raíces, están funcionalmente muy relacionados. Por ejemplo AtNRT2.1, AtNRT2.2 y AtNRT2.4 (Wang *et al.*, 2012).

El transportador CcNRT2.1, se ubicó distante del transportador AtNRT2.7 de *Arabidopsis thaliana*, el cual se ha podido caracterizar funcionalmente y se sabe que se encuentra en la parte aérea de la planta, específicamente en las semillas (Chopin *et al.*, 2007). De igual manera, CcNRT2.1 se encuentra más cercano a AtNRT2.1 de *Arabidopsis thaliana*, el cual ha sido caracterizado funcionalmente y se encuentra exclusivamente en raíz (Chopin *et al.*, 2007). También, se observa que CcNRT2.1 presenta una estrecha relación con los transportadores 2.1 y 2.2 de *Solanum lycopersicum*. La agrupación de estas secuencias en un mismo clado, sugiere que tienen un origen monofilético (Figura 2.2A) y que CcNRT2.1 pudiera encontrarse preferentemente en raíz que en la parte aérea de la planta.

El árbol filogenético también sugiere que esta proteína está más estrechamente relacionada a las proteínas NRT2 de plantas superiores, que al de las algas verdes o a las proteínas AtNRT2.5 y AtNRT2.7, que presentan un origen evolutivo diferente a las restantes proteínas NRT2 (Orsel *et al.*, 2002b). Estos resultados podrían indicar que algunas proteínas NRT2 de plantas tienen retenida una estructura ancestral, como se había sugerido anteriormente (Yin *et al.*, 2007).

El análisis filogenético de las proteínas NAR2 (Figura 2.2A) sugiere que las mismas tienen su origen a partir de organismos que llevan a cabo fotosíntesis (*Chlamydomonas reinhardtii*) y que su evolución en plantas superiores está dada de manera canónica, lo cual es concordante con lo reportado en la página del árbol filogenético de las angiospermas (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

A diferencia de las proteínas NRT2 que tienen a su ancestro más primitivo en las bacterias, las proteínas NAR2 aparecieron miles de años después en las clorofitas. Esto sugiere que en un principio las proteínas NRT2 tenían lo necesario para llevar a cabo la toma de nitrato de alta afinidad por sí solas; pero que debido a los cambios ambientales, a la expansión de los nichos ecológicos y a la diferenciación en los órganos de las plantas, las proteínas NRT2 perdieron esta capacidad y requirieron de la interacción y ayuda de las proteínas NAR2, por lo que su origen o aparición en la tierra se da muchos miles de años después de las primeras formas de vida unicelulares.

El análisis filogenético indica que todas las proteínas NAR2 provienen de un ancestro común, es decir que presentan un origen monofilético, a partir de las algas verdes. Se aprecia de igual manera que la clasificación de estas proteínas está muy bien delimitada de acuerdo al organismo del cual provienen. Las proteínas NAR2 de monocotiledóneas y eudicotiledóneas se agrupan en dos grandes grupos, representados en el árbol filogenético por las dos ramas principales. Dentro de estos grupos también se remarca de manera importante en clados cada una de las familias de plantas. Algo interesante de mencionar es que las NAR2 de Amborelas surgen de la misma rama que las eudicotiledóneas, lo cual resulta un poco confuso; ya que estas plantas son más primitivas que las eudicotiledóneas y por lo tanto deberían de estar en una rama anterior a las monocotiledóneas (Figura 2.2B). Este resultado podría deberse al tipo de método empleado para el diseño del árbol filogenético, el cual está basado en distancias; por lo que sería interesante probar con otros métodos basados en caracteres, como el método de inferencia bayesiana.

De igual manera se observa que la proteína NAR2_C1 de *Capsicum chinense* Jacq. se encuentra en el mismo clado que la de *Capsicum annuum*, indicando que tienen un origen monofilético, sugiriendo así una estrecha relación entre ellas. De igual manera y como era de esperarse, la proteína CcNAR2_C1 se encuentran dentro del clado correspondiente a la familia de las *Solanaceae*s.

El árbol filogenético, al igual que con las proteínas NRT2, sugiere que estas proteínas están más estrechamente relacionadas a las proteínas NAR2 de plantas superiores, que a las de algas verdes y a la de los musgos.

Este análisis también provee hipótesis concernientes de los cambios que han afectado a las proteínas NAR2 y NRT2 durante la evolución y que se ven reflejados en la manera de agruparse de estas proteínas. Es de particular interés señalar que tanto las proteínas NRT2 como NAR2 se agrupan en ramas que definen muy bien al organismo del cual provienen,

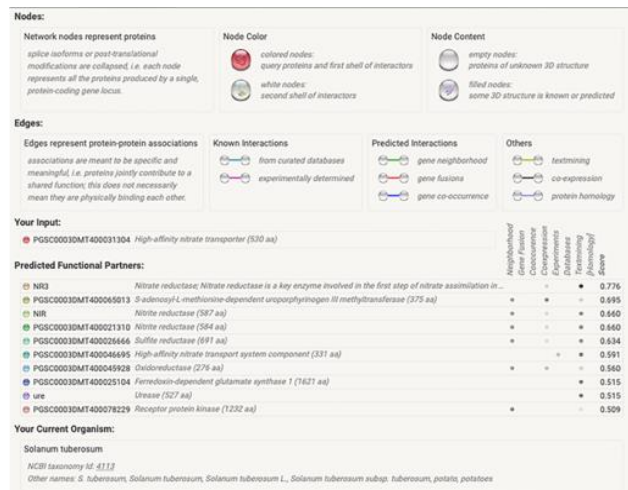
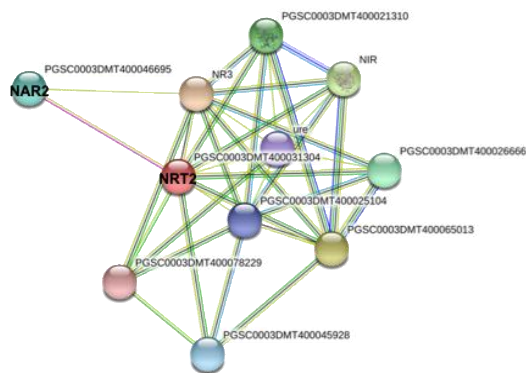
así como los clados que indican a que especies y a que familia específica pertenecen (Figura 2.2).

Este análisis nos brinda información que sugiere que ambas proteínas poseen ancestros evolutivos distintos, debido a que como indican los árboles, las proteínas NRT2 son más primitivas que las proteínas NAR2; ya que en organismos tan ancestrales como las bacterias se han encontrado proteínas de este tipo, a diferencia de las proteínas NAR2 que aparecieron a partir de los organismos que eran capaces de realizar fotosíntesis (Figura 2.2). El hecho de que hoy en día se sepa con certeza que la mayoría de las proteínas NRT2 de plantas, necesitan de la interacción con las proteínas NAR2, indica que en alguna etapa de la evolución estos dos tipos de proteínas se tuvieron que asociar para llevar a cabo la toma de nitrato de alta afinidad. Es de especial interés mencionar que al parecer los genes NRT2 que se expresan en raíces, son derivados de genes que se expresan en los brotes. Se considera que con la evolución de las plantas y la diferenciación de brotes y raíces, los sistemas de captación de NO_3^- de baja afinidad no satisfacían la necesidad de las estructuras complejas en desarrollo de las plantas superiores, lo que conllevó a la aparición de los sistemas de transporte de alta afinidad (Yin *et al.*, 2006).

2.3.1.4. Análisis bioinformático sobre la posible interacción CcNRT2.1-CcNAR2

Con el objetivo de profundizar en la posible interacción entre CcNRT2.1 y CcNAR2, se realizó un estudio *in silico*, usando ambas secuencias de chile habanero. Para este análisis se utilizó a la proteína SINAR3.2 de *Solanum lycopersicum* como referencia, ya que fue la que mejores valores de bitscore (317) y e^{-} ($1e^{-110}$) presentó con la de chile habanero. Este mismo análisis se realizó para CcNRT2.1. Para su análisis se utilizó a StuNRT2 de *Solanum tuberosum* como referencia, ya que fue la que mejores valores de bitscore (1051) y e^{-} ($1e^{-0.0}$) presentó con la de chile habanero (Figura 2.3A).

A)



B)

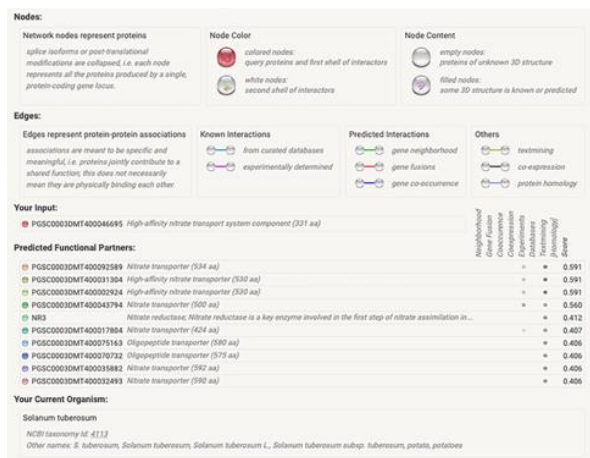
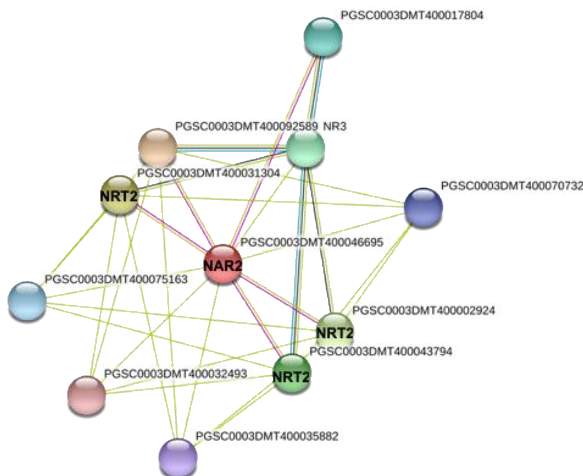


Figura 2.3. Interacción CcNRT2-CcNAR2 *in silico*. Este análisis se realizó usando el programa STRING 10 (<http://string-db.org>). A) Análisis de la posible interacción de CcNRT2.1 con otras proteínas. El análisis se hizo utilizando a la proteína StuNRT2.1 de *Solanum tuberosum*, dado que presentó los mayores valores de bitscore (1051) y e^{-1} (1 e-0.0) con la de chile habanero. En ambos casos, la mayor puntuación para que ocurra interacción se produjo entre las parejas de proteínas NRT2-NAR2. B) Análisis de la posible interacción de CcNAR2 con otras proteínas. Para este análisis se utilizó a la proteína SINAR3.2 de *Solanum*

lycopersicum como referencia, ya que fue la que presentó los mejores valores de bitscore (317) y e^{-110} con la de chile habanero.

Para la proteína CcNRT2.1, los resultados de este análisis sugieren que pudiera interactuar con diferentes proteínas que son claves en el metabolismo del N (Figura 2.3A). Entre las proteínas con las que interactúa se encuentran: las proteínas relacionadas con el transporte de NO_3^- (NAR2), la nitrato y nitrito reductasa, una metiltransferasa, la glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, la ureasa, una sulfito reductasa, un factor de transcripción de la clase de dominio GATA y una hemoglobina. El mayor valor de interacción se obtuvo con la proteína NAR2, seguido de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. Estos resultados nos sugieren que la proteína NRT2.1 de *Capsicum chinense* Jacq. pudiera ser una proteína transportadora de NO_3^- de alta afinidad debido a las importantes interacciones proteína-proteína que mantiene con proteínas del tipo NAR2, así como con proteínas que son claves en la vía de asimilación del NO_3^- .

Los resultados obtenidos para la proteína CcNAR2_C1 nos sugieren que se encuentra interactuando con diversas proteínas entre las que se observan a proteínas transportadoras de NO_3^- de alta y baja afinidad, proteínas del tipo ADP-ribosa dependiente de manganeso/CDP-alcohol difosfatasa y proteínas que contiene un dominio de caja U (Figura 2.3B). El mayor valor de interacción se obtuvo con las proteínas transportadoras de NO_3^- de alta afinidad, sugiriéndonos así, que las proteínas NAR2 de chile habanero pudieran ser proteínas acompañantes de las proteínas NRT2 en el transporte de NO_3^- de alta afinidad.

En ambos casos, la mayor puntuación de interacción se produjo entre las parejas de proteínas NRT2-NAR2. La interacción proteína-proteína entre NRT2 y NAR2 ha sido descrita ampliamente en la literatura, más sin embargo son muy pocos los trabajos donde se ha demostrado experimentalmente su interacción. En *Chlamydomonas reinhardtii* se determinó la interacción de NRT2.1 y NAR2 a través de la toma de NO_3^- en ovocitos de *Xenopus* (Zhou *et al.*, 2000). En cebada se comprobó la interacción de NRT2.1 con NAR2.3 a través de la toma de NO_3^- en ovocitos de *Xenopus* (Tong *et al.*, 2005). En 2012 Kotur *et al.*, determinaron que en *Arabidopsis thaliana* seis de las siete proteínas del tipo NRT2 (excepto AtNRT2.7) interactúan con la proteína AtNAR2.1. Esta interacción se determinó mediante el empleo de las técnicas de doble híbrido, complementación de fluorescencia

bimolecular usando la proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en ingles) en protoplastos y toma de NO_3^- en ovocitos de *Xenopus*.

En arroz esta interacción se demostró usando plantas mutantes así como de las técnicas de doble híbrido y toma de NO_3^- en ovocitos de *Xenopus* (Liu *et al.*, 2014) y en Crisantemo se empleó el sistema de doble híbrido en levaduras y de fluorescencia bimolecular usando la proteína amarillo fluorescente (YFP) en células epidérmicas de cebolla (Gu *et al.*, 2016). La similitud entre las proteínas CcNAR2 de chile habanero y las proteínas NAR2 de otras especies es mayor en la región central de su secuencia que en las regiones N y C terminales (Liu *et al.*, 2014). El residuo de aspartato correspondiente a Asp105 de AtNAR2.1, que es conservado en las proteínas NAR2 de plantas superiores, pero no en *C. reinhardtii*, se ha determinado como esencial para el transporte de NO_3^- en *A. thaliana* (Kawachi *et al.*, 2006). Este residuo de aspartato fue conservado en todas las proteínas NAR2 deducidas de *Capsicum chinense* Jacq. (Figura 4). De igual manera Kawachi y colaboradores (2006), reportaron que el remplazamiento de la Asp105 en la región media de AtNAR2.1 significativamente reduce la toma y acumulación de NO_3^- en plantas de *Arabidopsis*.

Un estudio realizado en plantas de cebada sugiere que el extremo C-terminal de HvNRT2.1 interacciona con la región central de HvNAR2.3; ésto se demostró analizando el motivo de interacción en el sistema de dos componentes, mediante experimentos en columnas de unión por afinidad y el uso de proteínas recombinantes (Ishikawa *et al.*, 2009).

En plantas de arroz se determinó que los residuos aminoácidos R100 y D109 en la secuencia de la proteína OsNAR2.1 son importantes tanto para la actividad HATS, como para la colocalización de OsNAR2.1 con OsNRT2.3a en la membrana plasmática. Debido a que estos dos aminoácidos se encuentran localizados en un motivo central conservado entre la mayoría de los miembros NAR2 de plantas estudiadas hasta el día de hoy; sería de gran interés determinar si estos aminoácidos realizan funciones similares para la interacción de otros sistemas de transporte de alta afinidad NAR2/NRT2 en estas otras especies de plantas (Figura 2.4) (Liu *et al.*, 2014).

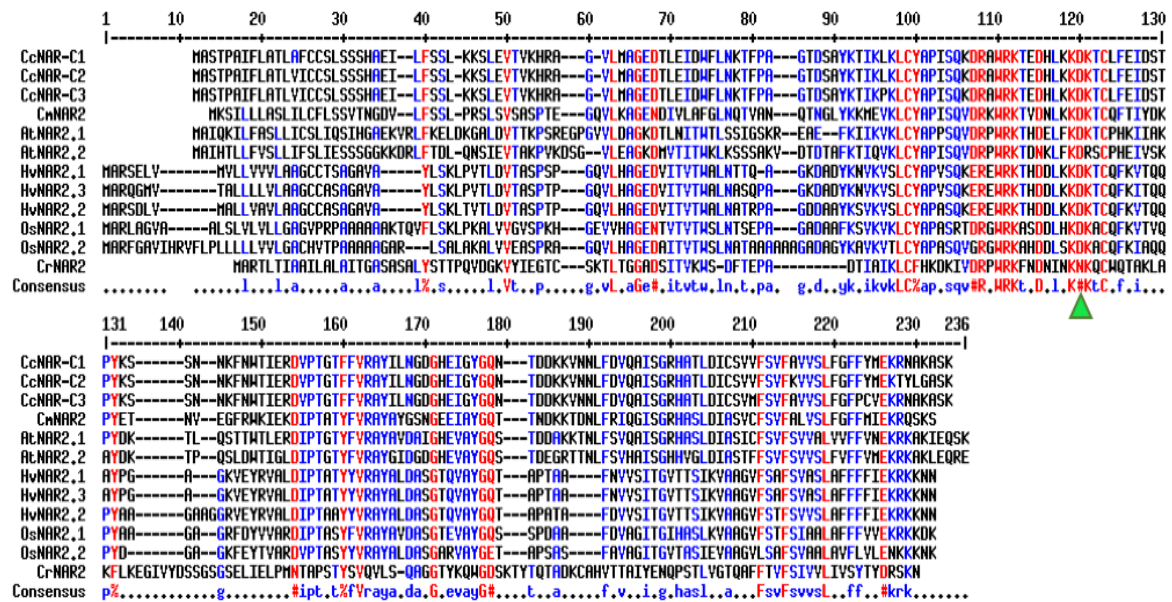


Figura. 2.4. Alineamiento de la secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas CcNAR2_C1, CcNAR2_C2 y CcNAR2_C3 con otras proteínas NAR2 en las que se ha demostrado su interacción con proteínas NRT2. El triángulo indica el residuo de aspartato (D) que se ha demostrado que es esencial para el transporte de NO₃⁻ en *Arabidopsis thaliana* (Kawachi *et al.*, 2006).

De igual manera en las secuencias de las tres clonas NAR2 de chile habanero analizadas se encontraron los motivos **K-(2)-K-(2)-LCY-(2)-S-(3)-Rx-WR-(3)-D-(4)-DK** y **YGQ**, los cuales definen a las proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas NAR2 (Tong *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2014) (Figura 2.5) . Sin embargo, los motivos de las proteínas NAR2 que interaccionan con las proteínas NRT2 para su localización en la membrana plasmática y para su actividad de transporte NO₃⁻, aún no han sido funcionalmente caracterizados en la mayoría de las especies de plantas (Liu *et al.*, 2014).

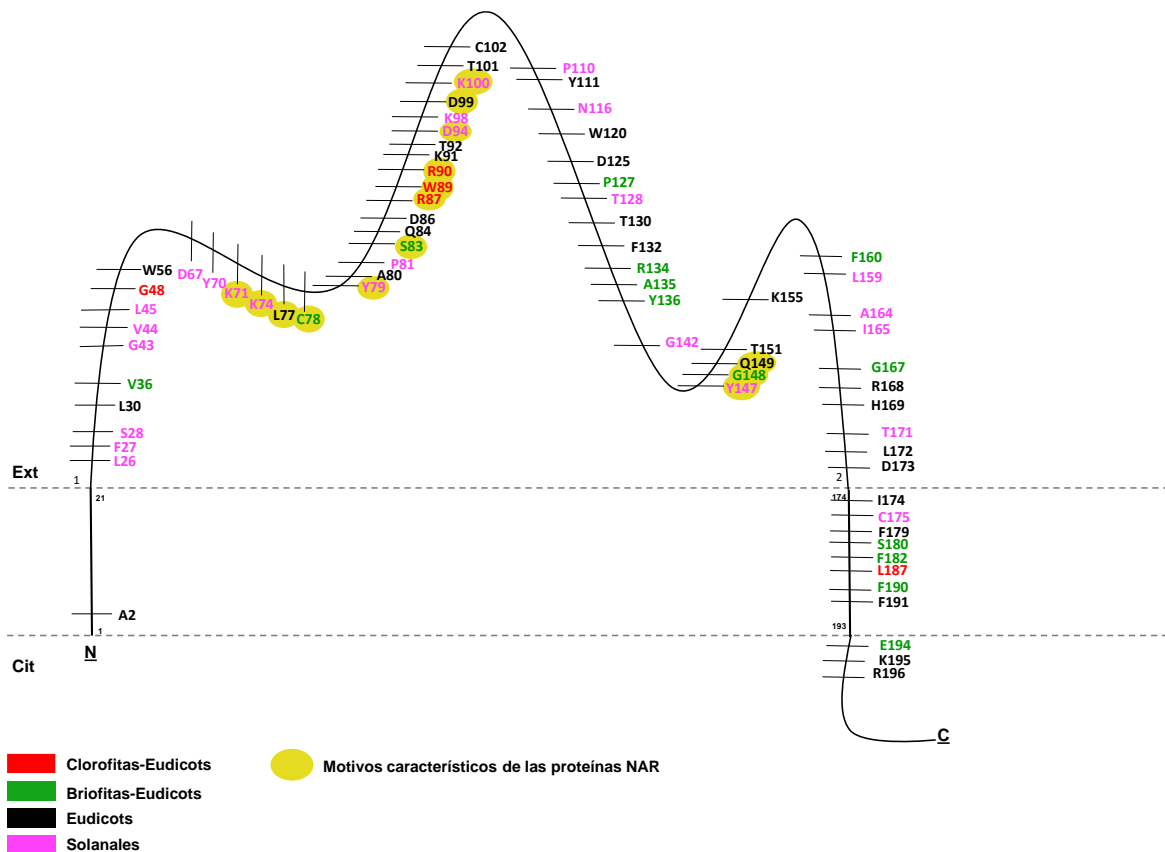


Figura. 2.5. Modelo de la topología del transportador CcNAR2_C1, presentando los aminoácidos conservados correspondientes a los motivos característicos de todas las proteínas del tipo NAR2, los cuales se encuentran en óvalos de color amarillo. De igual manera se indican los aminoácidos conservados entre las clorofitas, monocotiledoneas y eudicotiledoneas, los cuales están representados en color rojo. En color verde se representan los aminoácidos conservados en las briofitas, monocotiledoneas y eudicotiledoneas. Los aminoácidos conservados únicamente en las eudicotiledoneas se representan en color negro y los que están exclusivamente conservados en *Solanaceae* se representan en color rosa. Los números de accesoión y las especies incluidas en esta imagen son: *Chlamydomonas reinhardtii* CrNAR2 (Cre09.g410900); *Physcomitrella patens* PpNAR1 (XP_001771033), PpNAR2 (XP_001768154), PpNAR3 (XP_001755294); *Oryza sativa* OsiNAR1 (EAY86523), OsiNAR (EAY94557), OsjNAR1 (NP_001047317), OsjNAR2 (EAZ31107), OsjNAR3 (NP_001053099); *Oryza brachyantha* ObrNAR (XP_006647452); *Ananas*

comus AncNAR (OAY74736); *Sorghum bicolor* SbNAR1 (XP_002454118), SbNAR2 (XP_002448046); *Zea mays* ZmNAR1 (AFW72145), ZmNAR2.1 (NP_001105929), ZmNAR2.2 (NP_001105924), ZmNAR2 (ACG30087), ZmNAR3 (DAA37306); *Triticum aestivum* TaNAR2.1 (AAV35210), TaNAR2.2 (AAV35211); *Hordeum vulgare* HvNAR2.1 (AAP31850), HvNAR2.2 (AAP31851), HvNAR2.3 (AAP31852); *Musa acuminata* MaNAR1 (XP_009404237), MaNAR2 (XP_009379949), MaNAR2.1 (XP_009415937); *Arabidopsis thaliana* AtNAR3.1 (NP_199831) y *Capsicum chinense* Jacq. CcNAR_C1.

2.3.1.5. Diseño de las estructuras tridimensionales de las proteínas CcNRT2.1 y CcNAR2_C1

La predicción de la estructura tridimensional de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos representa uno de los problemas más importantes en biología estructural computacional. La predicción de la estructura de la proteína se refiere al esfuerzo de generar un modelo tridimensional a partir de una secuencia de aminoácidos usando algoritmos computacionales (Murzin y Bateman, 2001; Ginalski y Rychlewski, 2003). La predicción de las estructuras tridimensionales de CcNRT2.1 y CcNAR2_C1 se llevaron a cabo usando la secuencia primaria de aminoácidos y construidos por modelamiento de homología. El mejor templado proporcionado para CcNRT2.1 por la plataforma I-TASSER fue el correspondiente al de la proteína transportadora de glicerol-3-fosfato de *Escherichia coli*, GlpT (pdb: 1PW4A). La molécula de NO_3^- presente en la estructura tridimensional de CcNRT2.1 se tomó del modelo del transportador de NO_3^- de alta afinidad NarK de *Escherichia coli* (pdb: 4U4T).

Para CcNAR2_C1 el mejor templado fue el de la proteína monooxigenasa de polisacáridos dependiente de cobre PMO-2 del hongo *Neurospora crassa* (4EIR). Las estructuras tridimensionales de ambas proteínas se modelaron con la ayuda del programa PyMOL, tomando en cuenta los resultados obtenidos de la plataforma I-TASSER, así como los resultados de la predicción de sus estructuras secundarias, las cuales se realizaron con el programa TOPCONS (Figuras 2.1 y 2.6).

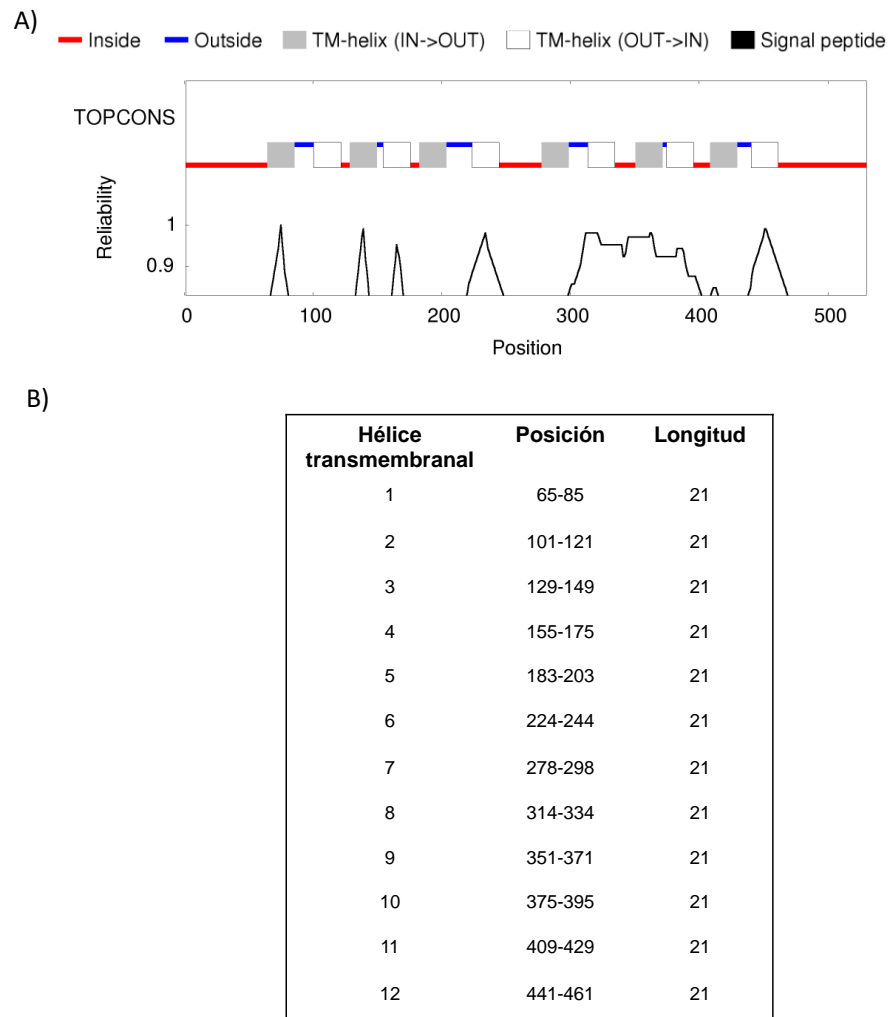


Figura 2.6. Dominios transmembranales predichos de la proteína CcNRT2.1. A). Perfil de hidrofobicidad. B). Regiones transmembranales predichas. Los números representan la posición de los residuos aminoacídicos de inicio y final de cada región transmembranal (TOPCONS).

En la Figura 2.7 se presentan los resultados obtenidos a través del modelamiento tridimensional.

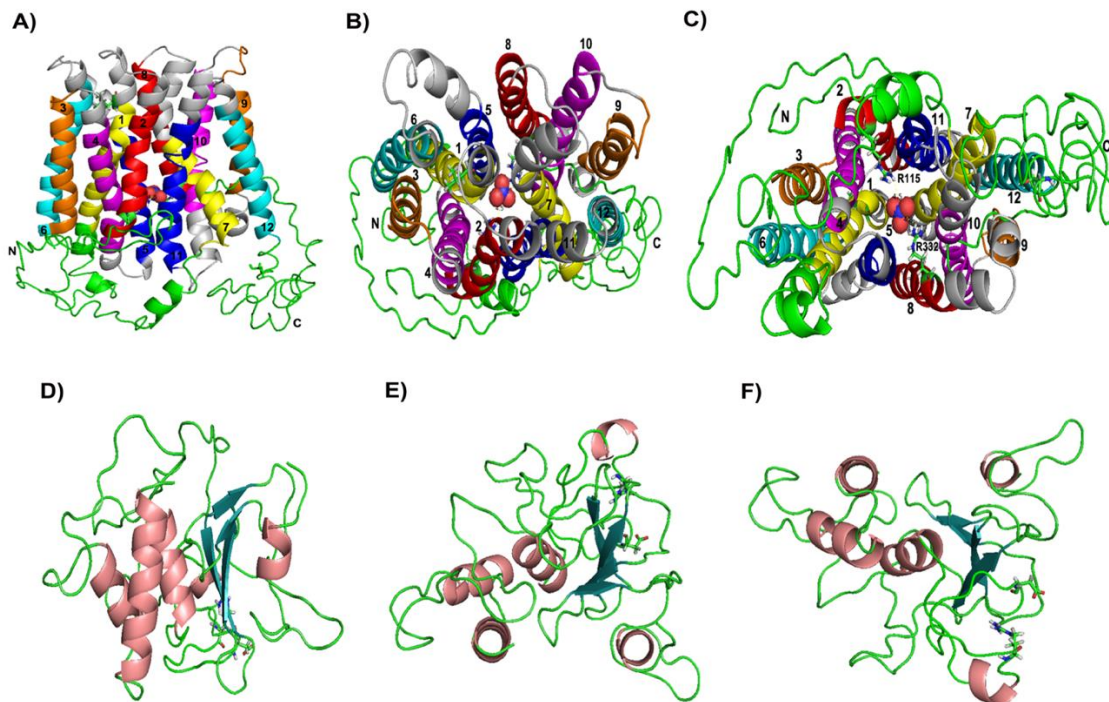


Figura 2.7. Modelamiento de la estructura tridimensional de CcNRT2.1 y CcNAR2_C1. A), B) y C), son la vista frontal, extracelular y citosólica del modelo de CcNRT2.1, respectivamente. N y C representan los dominios amino y carboxilo terminales, respectivamente. Las hélices transmembranales se indican con números del 1-12. Los residuos de arginina 115 y 332 se representan con sticks de color verde. D), E) y F) corresponden a la vista frontal, extracelular y citosólica del modelo de la proteína CcNAR2 de chile habanero. En color salmon se representan las hélices alfa y en color verde se representan las láminas beta. En A), B) y C) el modelo se construyó en presencia de NO_3^- (esferas roja + azul) (I-TASSER server).

El modelamiento indico, tal y como se predice para este tipo de transportadores, que CcNRT2.1 tiene la forma típica de los transportadores de la familia MFS, que está caracterizada por 12 hélices transmembranales (HTMs) con un loop citosólico largo, con una α -helice corta cercana a la HTM7, que relaciona el dominio amino terminal (HTM1-6) con el dominio carboxilo terminal (HTM7-12) (Sun *et al.*, 2014). Sus extremos amino y carboxilo se presentan hacia el citosol, con una longitud de ~ 62 y ~ 68 aminoácidos,

respectivamente; esta ubicación los dispone como posibles sitios blanco de modificaciones postraduccionales, como fosforilación, proteólisis y degradación en vesículas. La fosforilación se reporta como la más común de las modificaciones para este tipo de proteínas (Figura A1). Esta modificación tiene un papel importante en una variedad de procesos cruciales para la planta (Cheng *et al.*, 2014), incluyendo señalización por ABA (Kusakina y Dodd, 2012) y respuesta a estrés (Rampitsch y Bykova, 2012).

El poro a través del cual atraviesa el sustrato está formado por las HTM 1, 2, 5, 7, 8 y 11. Los residuos de arginina (R) 115 y 332, que son determinantes para el transporte de NO_3^- de alta afinidad, se situaron a una distancia de 2.3 y 4.7 Å con respecto a la molécula de NO_3^- , respectivamente. La R115 se localiza dentro de la HTM2 y la R332 dentro de la HTM8. El modelamiento tridimensional de CcNAR2_C1 indicó que estas proteínas no tienen una estructura definida, ya que como se aprecia en la Figura 2.7 (E-G) no se modela la hélice transmembranal que predice la estructura secundaria. Únicamente se presentan estructuras secundarias, cuatro hélices alfa y tres láminas beta, y la mayoría de su secuencia se presenta sin modelar. Estos resultados pueden ser debido a que en este tipo de proteínas no se han realizado cristales; por lo tanto no hay un modelo de referencia con el cual comparar. El mejor templado que nos dio el programa corresponde a una proteína monooxigenasa de polisacáridos dependiente de cobre (PMO-2) que tiene la función de escindir oxidativamente la celulosa cristalina y mejorar la eficacia de las celulasas. Pertenece a la familia de proteínas oxidoreductasas. Por lo tanto estos resultados deben ser analizarlos con mucho cuidado.

2.3.2. Niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en los diferentes órganos de la planta

Los resultados obtenidos mediante PCR punto final, indican que *CcNRT2.1* se localiza exclusivamente en las raíces de chile (Figura 2.8) . Estos resultados coinciden con lo ya reportado para *AtNRT2.1* de *Arabidopsis*, la cual se sabe que se expresa en las células de la epidermis y que es la responsable de aproximadamente el 75% de la toma de NO_3^- de alta afinidad (Chopin *et al.*, 2007). Este resultado, en conjunto con el análisis filogenético,

sugieren que CcNRT2.1 pudiera tener una función de toma de NO_3^- de alta afinidad en la raíz de chile habanero.

Para CcNAR2 los resultados obtenidos indican que ésta se expresa mayormente en raíz y ligeramente en flor y pericarpio. La presencia de un mayor nivel de expresión en raíces nos sugiere una posible interacción de CcNRT2.1 y CcNAR2 para la toma de NO_3^- de alta afinidad en las raíces de chile habanero. Con esto se refuerzan los resultados ya obtenidos a través de herramientas bioinformáticas. Los niveles de transcritos de CcNAR2 en flor y pericarpio nos sugieren que en este órgano y tejido existe la presencia de otras proteínas NRT2 con las cuales esta interaccionando para llevar a cabo el transporte de NO_3^- de alta afinidad a través de toda la planta o bien que estas proteínas puedan cumplir con otras funciones diferentes a las de ser una proteína accesoria del transporte de NO_3^- . Se ha reportado para *Arabidopsis*, a través de experimentos con mutantes *atnar2.1*, que esta proteína participa en la formación y desarrollo de RL bajo concentraciones limitantes o bajas de NO_3^- (Orsel *et al.*, 2006, 2007); ó como proteínas que se activan en respuesta a heridas (Titarenko *et al.*, 1997) y a ataques por patógenos (Marois *et al.*, 2002). Estos resultados son de mucha importancia ya que al día de hoy no hay reportes en la literatura que proporcionen información de la evaluación de los niveles de transcritos, tanto para los genes NRT2 como para los NAR2, en todos los órganos de la planta.

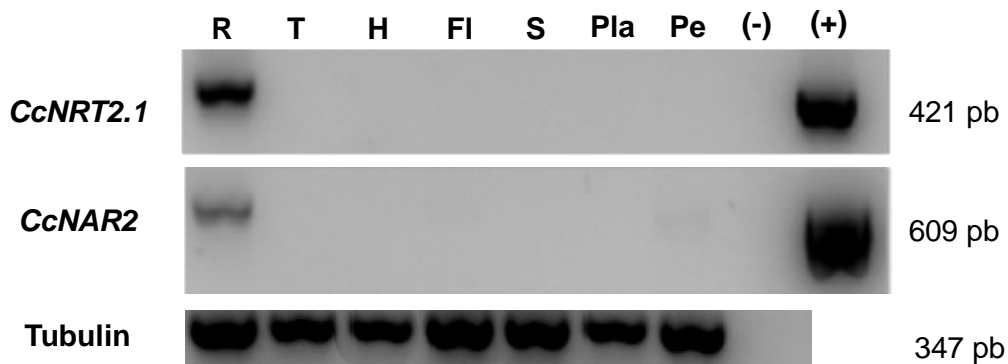


Figura 2.8. Localización de los niveles de transcritos de CcNRT2.1 y CcNAR2 en los diferentes órganos de la planta. Sección superior: expresión de CcNRT2.1. Sección media: expresión de CcNAR2. Sección inferior, gen constitutivo de la

tubulina como control. Los números en la parte superior indican: 1, raíz; 2, tallo; 3, hoja; 4, flor; 5, semilla; 6, placenta; 7, pericarpio; (-), testigo negativo, al cual no se le adicionó ADN; (+), testigo positivo, utilizando como molde para la PCR el ADN plasmídico conteniendo a *CcNRT2.1* y *CcNAR2_C1*, respectivamente. El número de ciclos en la PCR fue de 35 para *CcNRT2.1* y 37 para *CcNAR2_C1*.

2.3.3. Efecto del tiempo de fotoperíodo sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2*

Para investigar la regulación diurna de *CcNAR2* se llevó a cabo un experimento en el que las plántulas de chile habanero de aproximadamente 45 días estuvieron en presencia de un ciclo diurno de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad. En la Figura 2.9 se observan los cambios obtenidos en los niveles de transcritos de *CcNAR2* en las raíces de chile habanero. Los niveles de transcritos de *CcNAR2* presentaron ligeros cambios diurnos, con un pequeño incremento durante el período de luz, los cuales aumentaron a medida que aumentó el tiempo de exposición a la luz. La mayor expresión se alcanzó a las 11 hrs de exposición. Al inicio del período de oscuridad, es decir, a las 10 pm (0 hrs de oscuridad) hay una disminución de los niveles de transcritos en comparación con los observados a partir de las tres horas en presencia de luz, sin embargo hay una ligera recuperación de los niveles de transcritos a las 3 hrs de oscuridad, pero a un nivel menor que a la observada durante el período de luz en el mismo tiempo de exposición. Posteriormente, se observó una disminución al final de este período, donde se aprecia que los niveles de transcritos alcanzan el mismo nivel que a las 0 hrs en presencia de oscuridad (Figura 2.9).

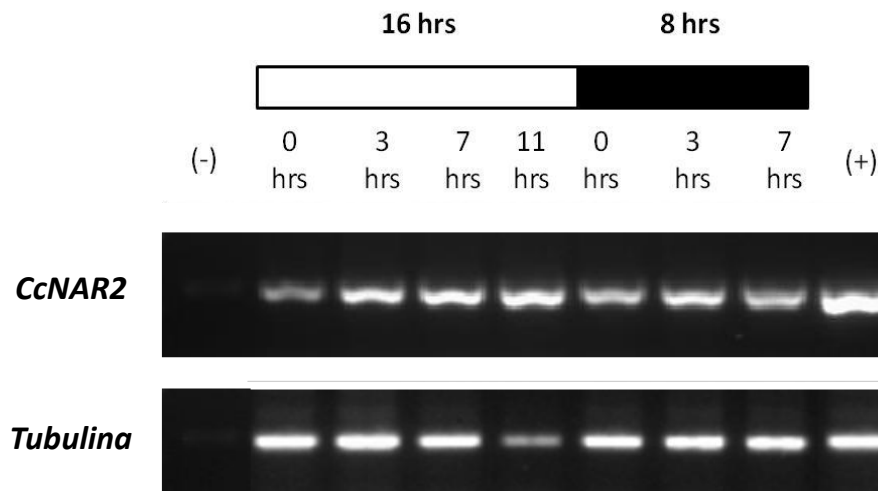


Figura. 2.9. Cambios en los niveles de transcritos de *CcNAR2* durante un período de fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad. Sección superior, cambios en la expresión de *CcNAR2_C1*. Sección inferior, gen constitutivo de la tubulina como control. (-), testigo negativo, al cual no se le adicionó ADN, (+), testigo positivo, utilizando como molde para la PCR el ADN plasmídico conteniendo a *CcNAR2_C1*. El número de ciclos en la PCR fue de 30. El esquema superior representa un período de fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad.

Estos resultados sugieren que *CcNAR2_C1* aumenta sus niveles de expresión cuando está expuesto a la luz y que por el contrario sus niveles de transcritos se ven disminuidos cuando está en ausencia de luz; por lo que se sugiere que éste se regula durante un ciclo luz/oscuridad.

2.3.4. Efecto de la fuente de N sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2*

Los resultados obtenidos indican que *CcNAR2* se indujo en presencia de NO_3^- y NH_4Cl . La inducción fue mayor en presencia de NO_3^- y ocurrió a la primera hora de exposición. A medida que aumentaba el tiempo de exposición los niveles de transcritos disminuyeron. Esto sugiere que el NO_3^- tomado pudiera estarse metabolizando, exportando hacia la parte aérea vía xilema o bien que se pudiera estar almacenando en vacuola; lo que ocasionaría una disminución en la concentración endógena del NO_3^- y por lo tanto una disminución en los niveles de transcritos de *CcNAR2*. Estos resultados demuestran que este gen se regula

de manera positiva en respuesta a NO_3^- y que dicha regulación es dependiente del tiempo de exposición (Figura 2.10).

En los tratamientos con NH_4Cl y glutamato de potasio se observó un aumento mas significativo a las 2 y 4 hrs de exposición, respectivamente. Para el caso del tratamiento con NH_4Cl , los niveles de transcritos se inducen desde la primera hora de exposición, alcanzando sus niveles máximos a las 2 hrs; sin embargo a las 4 hrs los niveles han disminuido de manera significativa, indicando con esto una variación grande de este gen en respuesta a esta fuente de N en un período de tiempo corto. Esto probablemente se deba a que esta fuente de N es tóxica para la planta, tal como se reporta en otras especies como *Oryza sativa* (Yan *et al.*, 2011).

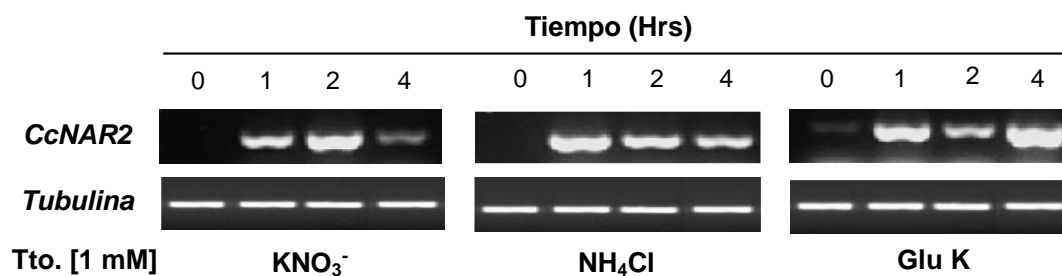


Figura. 2.10. Efecto de la fuente nitrogenada sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2*. Plántulas de *Capsicum chinense* creciendo durante 45 días en condiciones de hidroponía fueron sometidas a un período de déficit de N durante 96 hrs y posteriormente se expusieron a 1 mM de diferentes fuentes de N: KNO_3 , NH_4Cl y glutamato de potasio (Glu K). Se usó 1 mM de KCl como testigo. El ARN fue extraído a las 0, 1, 2 y 4 hrs de exposición a estas fuentes. Se presentan los resultados obtenidos a partir de 28 ciclos en la PCR. Parte inferior; gen constitutivo tubulina como testigo de carga.

Para el tratamiento con Glu K, se observa que fueron dos tiempos donde hubo mayor inducción, a las 1 y 4 hrs de exposición al tratamiento, siendo mayor a las 4 hrs. Esto probablemente se deba a que los niveles de transcritos de este gen puedan inducirce por productos de la vía metabólica del N; ya que se sabe que la toma de NO_3^- de alta afinidad se da generalmente entre las 2 primeras horas de exposición al nutriente, por lo que este aumento en el nivel de transcritos con Glu K, se puede deber a que como el NO_3^- ya ha sido

metabolizado, ahora se esten almacenando los productos de esta vía, como aminoácidos, y por lo tanto estos productos pudieran inducir al gen *CcNAR2*.

Estos resultados nos indican que las fuentes de N usadas influyen de manera significativa en la variación de los niveles de transcritos de *CcNAR2* y que es el NO_3^- la principal fuente de N que regula la expresión de este gen (Figura 2.10).

2.3.5. Efecto de la sacarosa sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2*

Debido a la ligera disminución de los niveles de transcritos de *CcNAR2* durante el período de oscuridad (Figura 2.9) y a los resultados previos donde se observó que el transportador *CcNRT2.1* era inducido por sacarosa (Lizama-Gasca, 2012), se decidió llevar a cabo un experimento donde se le adicionó sacarosa a la solución nutritiva al momento del inicio del período de oscuridad, con el objetivo de determinar si la disminución se debía a una regulación en el balance C/N.

La ligera disminución de los niveles de transcritos de *CcNAR2* durante el período de oscuridad puede ser completamente prevenida mediante la adición de sacarosa al 1% a la solución nutritiva, tal como se aprecia en la figura 2.11.

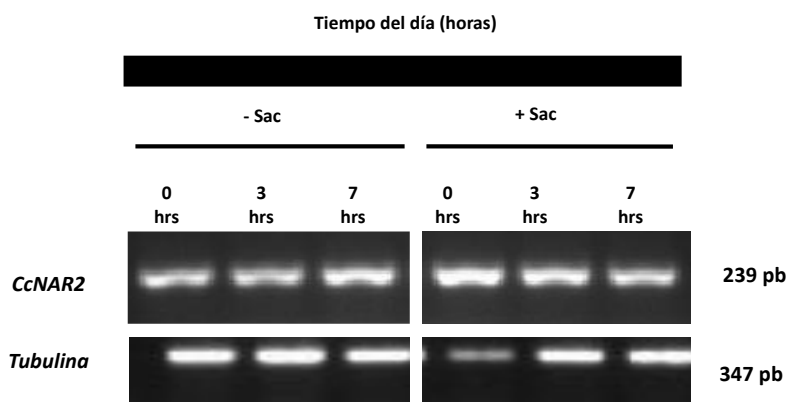


Figura 2.11. Efecto del suministro de sacarosa sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2* en las raíces de chile habanero. Las plántulas crecieron en una solución completa de nutrientes conteniendo 1 mM de NO_3^- en condiciones de fotoperíodo (16 h luz/ 8 h oscuridad). Una vez que inició el período de oscuridad (0 hrs), las plántulas fueron suplementadas con 1 % de sacarosa y antibióticos. El material

vegetal se colectó a las 0, 3 y 7 hrs de iniciado el tratamiento. El número de ciclos de la PCR fue de 26. -Sac, plántulas a las que no se le adicionó sacarosa (contenían los antibióticos), +Sac, plántulas con 1 % de sacarosa.

Desde el momento en que las plántulas se colocaron en presencia de sacarosa al inicio del período de obscuridad, los niveles de transcritos de *CcNAR2* se incrementaron y este incremento alcanza su mayor nivel a las 0 hrs del período de obscuridad, disminuyendo a medida que el tiempo pasaba (Figura 2.11). En las plántulas que se encontraban en ausencia de sacarosa al inicio del período de obscuridad, se observó que los niveles de transcritos de *CcNAR2* se mantuvieron prácticamente constantes durante todo el período, presentando un ligero aumento a las 7 hrs; sin embargo, los niveles de transcritos observados en ausencia de sacarosa, siempre fueron menores a los que se obtuvieron en presencia de sacarosa. (Figura 2.11). Estos resultados sugieren que *CcNAR2* se regula por sacarosa en presencia de oscuridad.

Se sabe que los metabolitos del carbono (C) son moléculas señales importantes que activan varios pasos regulatorios en la vía de asimilación del NO_3^- (Lam *et al.*, 1996), incluyendo la toma de este nutriente por las raíces. Lejay *et al.*, (1999) determinaron que la regulación de los transportadores de NO_3^- por el estatus de C se diferencian de manera mecánica a la regulación por el estatus de N. Esto se demuestra en los niveles de expresión de *Nrt1*, que es afectado por la transición luz/oscuridad y por el suministro de sacarosa, pero no por la deficiencia de N. Esto evita, al menos para este gen, la presencia de un mecanismo regulatorio general basado en la relación C/N en la planta (Lam *et al.*, 1996).

En muchos casos, los azúcares ejercen efectos complementarios al NO_3^- en la expresión de genes. Estos compuestos inducen a los genes *NRT1*, *NRT2*, *NIA*, *GLN1*, piruvato cinasa, *PPC* y *ICDH1* (Lejay *et al.*, 1999; Koch, 1996; Jang y Sheen, 1997) y estimula la activación postraduccional de *NIA* (Crawford, 1995; Sivasankar *et al.*, 1997; Morcuende *et al.*, 1998). Los efectos complementarios del NO_3^- y los azúcares son demostrados mediante el hecho de que ambos tienen que ser suministrados para lograr altas tasas de asimilación de NO_3^- y síntesis de aminoácidos en las hojas. Altos niveles de sacarosa estimulan la conversión de NO_3^- a glutamina, específicamente, la conversión de glicerol-3-fosfato (el primer producto de la fotosíntesis) a α -oxoglutarato (MacKintosh, 1998). Cuando los niveles de los azúcares son bajos, éstos inducen una fuerte regulación negativa de la expresión de *NIA*, que apaga las señales derivadas del metabolismo del N (Matt *et al.*, 1998). Sin embargo, aún se

desconoce si estos efectos están mediados por los mecanismos de señalización en los que está implicada la hexoquinasa, o a través de otros medios (Koch, 1996; Jang y Sheen, 1997). Estudios llevados a cabo en *Arabidopsis* soportan la hipótesis de que la coordinación de la toma de NO_3^- con la fotosíntesis es, al menos en parte, mediada a nivel transcripcional por los transportadores de NO_3^- de las raíces, los cuales a su vez, son regulados por los metabolitos del C (Lejay *et al.*, 1999). Como la absorción y uso del NO_3^- son altamente regulados por la luz y el suministro de carbono; la expresión de diversos transportadores de NO_3^- es también regulada por el ritmo circadiano y potenciado por la presencia de azúcares en el medio de cultivo (Chen *et al.*, 2016b; Feng *et al.*, 2011; Lejay *et al.*, 1999).

2.3.6. Efecto de la intensidad de luz sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2*

Debido a que en presencia de luz se observó un mayor nivel de los transcritos de *CcNAR2*, se llevó a cabo un experimento con diferentes intensidades de luz, para determinar la influencia que podría presentar en la regulación de los niveles de transcritos de este gen. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 2.12. Las figuras representan los niveles de transcritos a las 3, 7 y 11 hrs de iniciado el fotoperíodo.

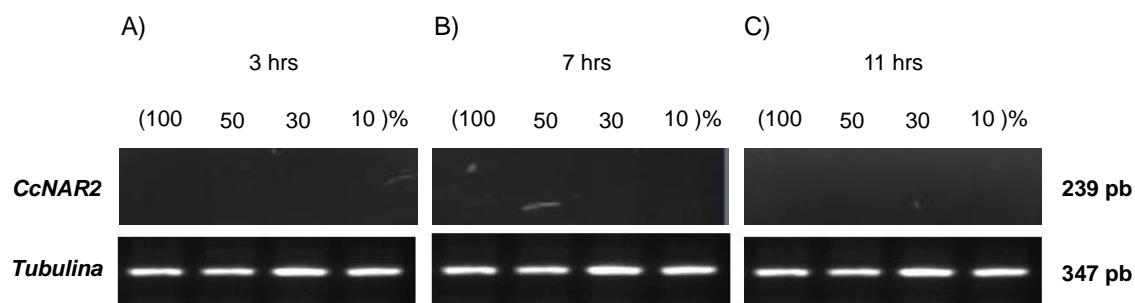


Figura. 2.12. Efecto de la intensidad de luz sobre los niveles de transcritos de *CcNAR2*. Plántulas de chile habanero de 45 días de edad fueron sometidas al inicio de un ciclo de fotoperíodo a diferentes intensidades de luz (100%, 50%, 30% y 10%). Las raíces se cosecharon a las 3 hrs (A), 7 hrs (B) y 11 hrs (C) de iniciado el tratamiento. En la figura se muestran los resultados de la PCR usando 30 ciclos.

Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de transcritos de *CcNAR2* se regulan por la intensidad de luz durante las primeras horas de exposición. En el inciso A) se observa que los niveles de transcritos aumentan ligeramente a medida que disminuye la intensidad de la luz; por lo que podemos sugerir que el aumento en los niveles de transcritos de *CcNAR2* durante las tres primeras horas de exposición a la luz, es inversamente proporcional a la intensidad de ésta.

A las 7 y 11 hrs los niveles de transcritos permanecen invariables bajo todas las intensidades de luz (Figura 2.12 B y C, respectivamente). Estos resultados indican que *CcNAR2* se regulan de manera negativa por la intensidad de luz durante un período de tiempo muy corto. Durante el período de oscuridad los niveles de esqueletos carbonados disminuye, como consecuencia de la falta de energía lumínica necesaria para que el proceso de fotosíntesis se lleve a cabo; por lo que la aplicación de energía lumínica elevada después de un período de oscuridad, puede conllevar a un estrés transitorio de la planta en el que los niveles de transcritos de genes específicos como *CcNAR2* se ven afectados. Esto se da únicamente durante tiempos cortos de exposición, ya que después de que la planta se ha aclimatado a esta transición oscuridad/luz los niveles de transcritos dejan de ser regulados por este factor (Figura 2.12 B y C). Se ha reportado que la luz puede regular directamente la expresión de genes (Lejay *et al.*, 2003), en cuya respuesta participan los fotoreceptores; por lo que la posibilidad de participación de estos no se puede descartar en este trabajo.

El efecto de todas estas variables evaluadas en este trabajo para *CcNAR2* fue evaluado anteriormente para los niveles de transcritos de *CcNRT2.1*. Los resultados obtenidos indicaron que sus niveles de transcritos se inducen por NO_3^- , sacarosa, por un ciclo de fotoperíodo y por luz.

2.3.7. Efecto de la concentración de NO_3^- sobre los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en raíces de chile habanero

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la posible interacción funcional de las proteínas NAR2 y NRT2 de chile habanero se llevó a cabo un experimento utilizando diferentes concentraciones de NO_3^- (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) para conocer si este factor pudiera estar regulando los niveles de transcritos de los genes que codifican para dichas proteínas.

En la Figura 2.13 se observa que ambos genes alcanzaron los mayores niveles de transcritos en las raíces que fueron tratadas con 0.5 mM de NO_3^- . Cuando las raíces fueron tratadas con 1 mM, los niveles de transcritos disminuyeron (Figura 2.13).

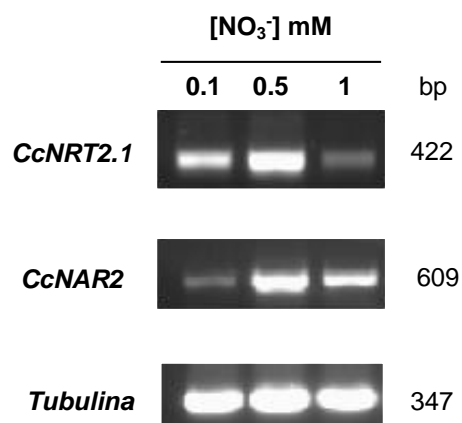


Figura 2.13. Efecto de diferentes concentraciones de NO_3^- sobre los niveles de expresión de los genes *CcNRT2.1* y *CcNAR2*. Plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. creciendo durante 45 días en condiciones de hidroponía fueron sometidas a un período de déficit de N durante 96 hrs y posteriormente se sometieron a diferentes concentraciones de NO_3^- (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) por 96 hrs. Pasado este tiempo, se les cambió el medio por uno nuevo conteniendo las mismas concentraciones de NO_3^- mencionadas anteriormente. El ARN fue extraído a las 24 hrs de exposición a esta fuente. Se usó el gen constitutivo tubulina como control de carga. En la figura se muestra el tamaño (pb) esperado para cada amplicón.

Estos resultados sugieren que tanto *CcNRT2.1* como *CcNAR2* presentan características típicas de los genes que codifican para proteínas transportadoras de NO_3^- de alta afinidad y para proteínas NAR2, respectivamente. La molécula de NO_3^- es capaz de modificar la expresión de los genes que codifican para ciertos transportadores transmembranales (Wang *et al.*, (2000), por lo que la respuesta observada en este experimento pudiera deberse al efecto de la concentración de este nutriente en las plantas de chile habanero. En un trabajo realizado en plántulas de *Arabidopsis thaliana* que se encontraban sometidas a diferentes concentraciones externas de NO_3^- , se observó que después de 20 min de estar en presencia de este nutriente, se estimulaba la expresión de genes que codificaban para

proteínas transportadoras del tipo NRT2. Orsel y colaboradores (2004), determinaron que el gen *AtNRT2.1* de *Arabidopsis thaliana* se inducía tanto a concentraciones micromolares como milimolares de NO_3^- . Sin embargo, en otros trabajos realizados con plantas de *Arabidopsis thaliana* se ha comprobado que la proteína AtNRT2.1 se induce tanto a altas (10 mM) como a bajas (0.3 mM) concentraciones de NO_3^- , pero presenta siempre una mayor inducción a concentraciones micromolares (Wirth *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos anteriormente en otras especies, tales como *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2000), *Solanum lycopersicum* (Wang *et al.*, 2001) y *Zea mays* (Liu *et al.*, 2008).

Los perfiles de expresión de los genes *CcNRT2.1* y *CcNAR2* muestran una concordancia en la inducción y expresión a 0.5 mM de NO_3^- , lo cual sugiere que ambos genes se regulan bajo esta concentración, indicando así, la posible participación funcional de los mismos bajo dicha condición.

2.3.8. Evaluación de los cambios en los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* a lo largo de la raíz primaria de chile habanero

Entre los diferentes genes pertenecientes a la familia de los *NRT2*, *NRT2.1* en interacción con las proteínas NAR2 (Orsel *et al.*, 2006), tiene un papel principal en la toma de NO_3^- en los sistemas iHATS en el sistema radical de muchas especies de plantas y a lo largo de la raíz primaria (RP) de maíz (Tong *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2006; Wirth *et al.*, 2007; Sargoná *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011). Para validar esta hipótesis, en el presente estudio, se evaluaron los niveles de expresión de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* a lo largo de la RP de chile habanero.

En este experimento, los niveles de transcritos de ambos genes se evaluaron a una única concentración de NO_3^- (0.5 mM). Los resultados obtenidos indican que la expresión de estos genes se regula de manera coordinada a lo largo de la RP, siendo máxima la expresión de transcritos en Z2, la región correspondiente entre los 2 y 4 cm por encima del ápice, en una RP de aproximadamente 7 cm de longitud (Figura 2.14). De igual manera, los niveles de transcritos de ambos genes disminuyeron drásticamente en Z3, correspondiente a la zona por encima de los 4 cm del ápice.

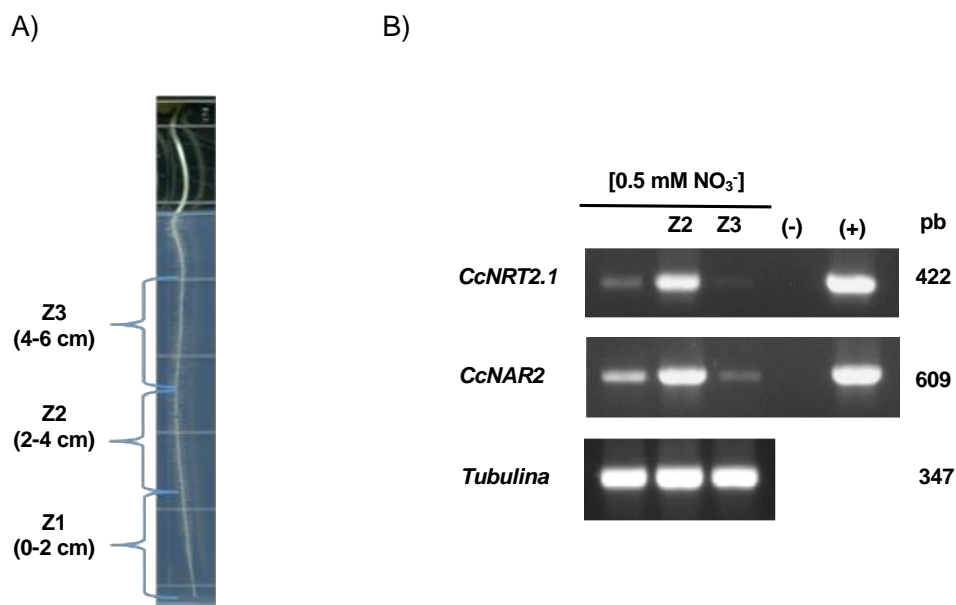


Figura. 2.14. Localización de los niveles de transcritos de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* a lo largo de la raíz primaria de chile habanero. Plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. creciendo durante 10 días en condiciones *in vitro* fueron transferidas a condiciones de hidroponía y sometidas a un período de déficit de N durante 96 hrs. Posteriormente se sometieron a una concentración de 0.5 mM de KNO_3^- por seis hrs y el ARN fue extraído a partir de tres zonas de la raíz. A), Representación esquemática de las zonas de la raíz primaria; Z1 (de 0 a 2 cm del ápice), Z2 (de 2 a 4 cm del ápice) y Z3 (de 4 a 6 cm del ápice). B), Expresión de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* en las diferentes zonas de la raíz primaria. Se usó el gen constitutivo tubulina como control de carga. En la figura se muestra el tamaño (pb) esperado para cada gen.

Estos resultados, por otro lado, sugieren que la Z2 es donde se lleva a cabo de manera más activa el transporte de NO_3^- de alta afinidad y que probablemente *CcNRT2.1* y *CcNAR2* interaccionan para llevar a cabo la toma de este nutriente.

La toma ó absorción de NO_3^- promueve la alcalinización del medio externo de la célula ó apoplasto. Los transportadores de NO_3^- cotransportan hacia el interior una molécula de NO_3^- y dos H^+ , y a la misma vez la ATPasa de membrana plasmática libera un solo H^+ , por lo que el medio extracelular se basifica (Figura. 2.15 A) (Miller y Cramer, 2004).

Con el objetivo de correlacionar, de manera indirecta, los niveles de transcritos del transportador de NO_3^- de alta afinidad CcNRT2.1 con la zona de la RP donde se lleva a cabo la mayor toma de NO_3^- de alta afinidad, se llevó a cabo un experimento usando el fluoróforo Oregon Green® 488 (ThermoFisher SCIENTIFIC). Este fluoróforo es un colorante verde fluorescente brillante con excitación ideal de 488 nm; y con una excitación y emisión máxima de 501 y 526 nm, respectivamente. Es insensible a pH fisiológico y tiene un pKa de 4.6. Se emplea como indicador de cambios de pH en organelos o vías ácidas. Su rango de pH va de 4.2 a 5.7, es decir fluoresce a pH ácido.

Los resultados obtenidos en este experimento se presentan en la Figura 2.15.

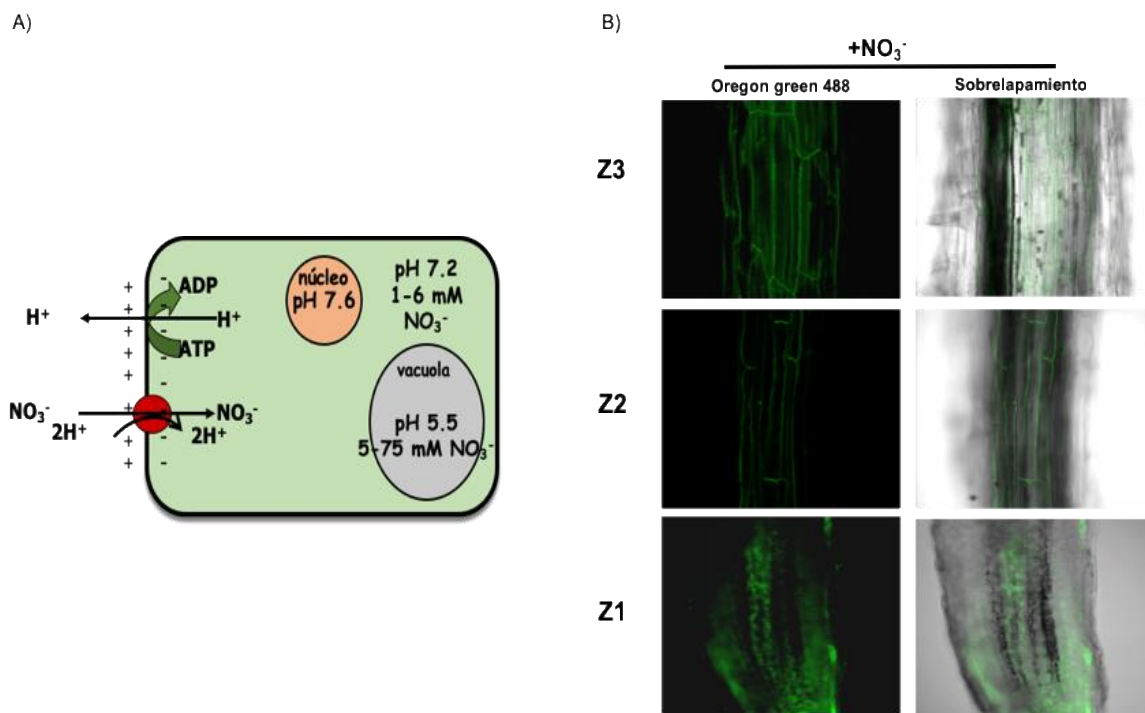


Figura. 2.15. Toma de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz. A), Modelo de la toma de NO_3^- . La entrada de NO_3^- a la célula está mediada por un mecanismo simporte. NRT2 cotransporta hacia el interior un NO_3^- y dos H^+ , mientras que la ATPasa membranal saca un solo H^+ , por lo que el medio extracelular se basifica. B) Fluorescencia del Oregon Green, Indicador de pH en el apoplasto de las células de la raíz. Raíces de chile habanero (longitud total aproximadamente 7 cm) fueron tratadas con 0.5 mM de KNO_3^- por seis hrs, separadas en tres zonas

y puestas en presencia del fluoróforo por tres minutos (ver Figura. 2.14 A). Las imágenes a la izquierda representan la fluorescencia del fluoróforo (mayor intensidad significa mayor acidez en el apoplasto) y las de la derecha es el sobrelapado de la fluorescencia con las imágenes de campo claro.

Los resultados obtenidos con el fluoróforo Oregon Green® 488 muestran que la Z2 es donde se presenta menos fluorescencia comparado con la Z1 y la Z3, esto indica que es en esta zona donde hay una menor acidez del medio extracelular. La Z1 es la que presenta mayor fluorescencia y por lo tanto una mayor acidez del medio extracelular. La Z3 presenta una mayor fluorescencia en comparación con la Z2, pero ésta fue menor que a la Z3. Estos resultados sugieren nuevamente que la Z2 es donde podría ocurrir una mayor absorción del NO_3^- , debido a una menor fluorescencia del medio extracelular, lo que indica una menor acidez ó mayor basicidad del medio celular y por lo tanto una mayor toma de NO_3^- .

Todos estos resultados nos sugieren que estas dos proteínas pudieran estar interactuando en la membrana plasmática para llevar a cabo el transporte de NO_3^- de alta afinidad, tal y como se ha reportado para otras especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Okamoto *et al.*, 2006), *Hordeum vulgare* (Tong *et al.*, 2005), *Oryza sativa* (Yan *et al.*, 2011), *Chrysanthenum morifolium* (Gu *et al.*, 2014) y *Zea mays* (Lupini *et al.*, 2016).

Recientemente Trevisan y colaboradores (2015), demostraron que la zona de transición de la raíz primaria de maíz, es la zona donde se lleva a cabo el sensado del estímulo ambiental de NO_3^- , mientras que Lupini y colaboradores (2016), consideran a la región dos (R2) como la región en la cual se lleva a cabo la toma ó absorción de NO_3^- de alta afinidad.

En resumen, en este trabajo, se clonó y caracterizó el ADNc de tres clonas NAR2 de *Capsicum chinense* Jacq. (CcNAR2_C1, CcNAR2_C2 y CcNAR2_C3). Éstas son las primeras secuencias reportadas para esta especie. Las secuencias de proteínas predichas para estas proteínas accesorias poseen el motivo K(2)K(2)LCY(2)S(3)RxWR(3)D(4)DK, característico de estas proteínas (Tong *et al.*, 2005), así como el residuo de aspartato (D) que se ha demostrado que es esencial para el transporte de NO_3^- en *Arabidopsis thaliana* (Kawachi *et al.*, 2006). De igual manera presentó una posible interacción *in silico* con proteínas transportadoras de NO_3^- de alta afinidad, ya que el valor más alto de score obtenido con el programa bioinformático STRING, fue para una proteína del tipo NRT2 (Figura 2.3). El análisis filogenético nos brinda información importante, porque permitió identificar en qué clado se localizan las proteínas CcNAR2 y que tan cercanas,

evolutivamente hablando, están con las demás proteínas NAR2 reportadas en la base de datos, así como también nos indicó en que momento de la evolución estas proteínas se volvieron parte fundamental del sistema de transporte de nitrato de alta afinidad y también nos permite determinar la importancia del nicho ecológico donde habitan.

Los variaciones en los niveles de transcritos de estos genes nos indican que las proteínas NAR2, al igual que las proteínas del tipo NRT2, son reguladas por la fuente de N, concentración de NO_3^- , fotoperíodo, sacarosa y por la intensidad de luz; y que estos cambios dependen del tipo de fuente de N, del tiempo de exposición y las horas de luz a las que están expuestas las plantas. De igual manera se puede apreciar que los niveles de transcritos de ambos genes se localizan en la misma zona de la raíz, especialmente en la zona dos. Estos resultados concuerdan con la medición del pH apoplástico, el cual tuvo un comportamiento similar, ya que fue en la zona dos de la raíz primaria donde se presentó una menor intensidad de fluorescencia del fluoróforo, indicativo de una alcalinización del medio extracelular y por lo tanto de una toma de NO_3^- de alta afinidad.

Estos resultados sugieren que la proteína CcNAR2 pudiera estar interactuando con la proteína CcNRT2.1 para tener una participación clave en el transporte de NO_3^- de alta afinidad, tal y como se ha reportado para otras especies de plantas (Cuadro 1.1).

CAPÍTULO III

Caracterización bioquímica de la proteína CcNRT2.1 y su relación con el flujo neto de H⁺ en raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

3.1. INTRODUCCIÓN

El NO₃⁻ es la principal fuente de N para las plantas, hongos, cianobacterias y numerosas bacterias, estos organismos tienen transportadores de NO₃⁻ activos (NRTs, por sus siglas en inglés) para la toma de este nutriente el cual se lleva a cabo en contra del gradiente de concentración y con el objetivo de mantener el potencial de membrana en la célula, (De Angeli *et al.*, 2006). Tres distintos NRTs que participan en la toma de NO₃⁻ celular han sido identificados y caracterizados a la fecha (Forde, 2000, Galván y Fernández, 2001, Moir y Wood, 2001, Orsel *et al.*, 2002a): los NRTs tipo ABC que han sido hallados en cianobacterias (Omata, 1995) y ciertas especies de bacterias (Wu y Stewart, 1998), la familia NRT1 que únicamente ha sido hallada en plantas vasculares y es una proteína hidrofóbica con 12 dominios transmembranales que pertenece a la familia de transportadores de péptidos de la principal familia de facilitadores (MFS, por sus siglas en inglés) (Forde, 2000, Galván y Fernández, 2001) y la NRT2 hallada en plantas y algas. Los NRT2 son cotransportadores H⁺-NO₃⁻ que poseen 12 dominios transmembranales como NRT1 (Forde, 2000, Galván y Fernández, 2001, Orsel *et al.*, 2002a), presentan alta afinidad por NO₃⁻ y tienen un papel fundamental en la toma de este ión desde el medio externo (Tsujiimoto *et al.*, 2007). La gran mayoría de las proteínas NRT2 requieren de la interacción con las proteínas NAR2 para que se lleve a cabo el transporte del sustrato (Quesada *et al.*, 1994, Galván *et al.*, 1996, Zhou *et al.*, 2000, Tong *et al.*, 2005, Okamoto *et al.*, 2006).

En este capítulo se aborda la caracterización bioquímica de una proteína transportadora de NO₃⁻ de alta afinidad en *Capsicum chinense* Jacq., llamada CcNRT2.1, por su elevado porcentaje de similitud (78 %) con la secuencia de la proteína NRT2.1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína tiene un tamaño de 1953 pb y codifica para una proteína de 530 aa. A través de análisis *in silico* se ha determinado que esta proteína pudiera ser una proteína transportadora de NO₃⁻ de alta afinidad, cuya función debe ser validada.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

En este estudio, se utilizaron plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la variedad naranja, las cuales fueron obtenidas a partir de semillas comerciales de la empresa Seminis.

3.2.2. Desinfección de semillas, germinación y crecimiento de las plántulas

La desinfección y germinación de las semillas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Celis-Arámbaro y colaboradores (2011). Una vez que ocurrió la protusión de la radícula (~5-6 días), las semillas germinadas fueron trasladadas a botes de plásticos con vermiculita previamente estéril, y humedecidas con solución Hoagland esteril a 1/5 de su fuerza iónica, (pH 6.8), que contenía: 500 μM CaCl_2 , 12.5 μM H_3BO_3 , 1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 μM ZnSO_4 , 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM de Fe-EDTA, 200 μM KH_2PO_4 , 200 μM MgSO_4 , 0.5 μM NH_4NO_3 y 1 mM KNO_3 (Richard-Molard *et al.*, 2008). Para el crecimiento de las plántulas, los botes se mantuvieron durante 30-45 días, a 25 °C en fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) y fueron regados dos veces a la semana: una vez con 50 ml de agua destilada estéril y otra con 75 a 100 ml de medio Hoagland hasta su utilización.

3.2.3. Tratamientos de NO_3^-

Se seleccionaron plántulas de igual tamaño, se lavaron con agua destilada para eliminar los residuos de vermiculita y se transfirieron a una solución en ausencia de NO_3^- , que contenía: 500 μM CaCl_2 , 12.5 μM H_3BO_3 , 1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 μM ZnSO_4 , 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM de Fe-EDTA, 200 μM KH_2PO_4 , 200 μM MgSO_4 y 1 mM KCl por cuatro días en un sistema hidropónico. En un primer experimento, al final del período de ausencia, las plántulas fueron expuestas a 0.1 mM, 1 mM y 10 mM de NO_3^- por 96 horas, en un sistema hidropónico. Estas plántulas se mantuvieron a una temperatura de 25 °C, en condiciones de fotoperíodo (16 h luz/8 h oscuridad) y con aireación constante. Al

final de este tiempo se cosechó el material vegetal. En un segundo experimento, las plántulas al final del período de ausencia, se pusieron en presencia de 0.1, 0.5, 1 y 10 mM de NO_3^- por 96 horas. Transcurrido este tiempo, fueron sustituidos por medios nuevos conteniendo las mismas concentraciones de NO_3^- y el material vegetal fue cosechado 24 horas después. Las plántulas se retiraron de los tratamientos y se secaron con un papel absorbente para eliminar residuos de agua. Se cosechó tejido de raíz, tallo y hoja. De igual manera se cosechó material vegetal de flor y fruto de plantas de aproximadamente 120 días de edad, que crecieron en condiciones de invernadero con riego cada siete días con 1 mM de KNO_3 . El fruto se dividió en pericarpio, placenta y semilla. Todo el material biológico se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para el posterior análisis de proteínas.

3.2.4. Inmunodetección de CcNRT2.1 en diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero

Se utilizaron plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. (cv.naranja), germinadas *in vitro* a partir de las semillas que comercializa la empresa Seminis.

Las semillas se desinfectaron y se colocaron en cajas de Petri para su germinación, siguiendo el protocolo descrito por Celis-Arámburo y colaboradores (2011). Cuando ocurrió la protrusión de la radícula (de 4 a 5 días), las semillas germinadas fueron transferidas al modelo *in vitro*.

En este caso, las semillas germinadas se colocaron en cajas de Petri con el siguiente medio de crecimiento: medio basal B₅: 23 mM ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 5.8, sacarosa al 0.5% (p/v), agar-agar al 1% (p/v) y las sales del medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) diluidas 1:50, al cual se le eliminó la fuente de N y se le adicionó 1 mM de KNO_3 como única fuente de N. Las cajas fueron colocadas verticalmente, en condiciones de oscuridad, hasta que la RP alcanzó una longitud de aproximadamente 7 ± 0.5 cm (aproximadamente de 10 a 12 días). Posteriormente, fueron colocadas durante cuatro días (96 hr) en solución Hoagland sin N, pasado este tiempo se sometieron a una concentración de 0.5 mM KNO_3 por 6 hrs. Al término de este tiempo, se colectó el material biológico (raíz, tallo y hoja). La raíz se seccionó en tres regiones de acuerdo a la distancia desde el ápice: 0-20 mm, 21-41 mm y 42-62 mm; estas secciones se nombraron como Z1, Z2 y Z3, respectivamente. El material biológico se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.2.5. Extracción y cuantificación de proteínas

El tejido se maceró con N líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se recuperó en un vial de cristal colocado en hielo y se le adicionó un amortiguador de extracción (2 ml/g de tejido fresco) que contenía: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM de NaCl, 1 mM EGTA, 250 mM sacarosa, 10% de glicerol, 1mM de PMSF, 10mM de Na₄P₂O₇, 0.2 mM de Na₃VO₄, 1mM β-mercaptoetanol, 1 µg/µl aprotinina y 1 µg/µl leupeptina. Se homogenizó con un politrón durante 1.5 minutos en hielo. El extracto se centrifugó a 14000 x g durante 30 min, en una centrifuga refrigerada a 4 °C, para eliminar los restos celulares. Para la separación de las fracciones citosólicas y membranales, el extracto se volvió a centrifugar a 100,000 x g durante 50 min, en una ultracentrifuga refrigerada a 4°C. Se colectó el sobrenadante (extracto citosólico) y la pastilla (extracto membranal) se resuspendió en el mismo amortiguador de extracción.

Para los tejidos de raíz seccionados en tres zonas el material vegetal se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se recuperó en un tubo falcon de 15 ml y se le adicionó el amortiguador de extracción (10 ml/0.25g) que contenía: 50% v/v fenol pH 8.8, 0.9 M sacarosa, 10 mM EDTA, 0.4% β-mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 µg/µl aprotinina y 1 µg/µl leupeptina. El extracto se agitó por 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm (10,000 g)x 15 min a 4°C. Se descartó la pastilla (fase orgánica) y al sobrenadante se le agregó cinco volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol al 100% y se dejó a -80 °C por 2 hrs para precipitar las proteínas. Pasado este tiempo el extracto se centrifugó a 4000 rpm (10,000 g) x 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con 10 ml del amortiguador de lavado (acetato de amonio 0.1 M en metanol al 100% y acetona al 80%) y por último se lavó con etanol al 70% (v/v) por 10 min. Después de cada uno de los lavados el extracto se centrifugó a 4000 rpm (10,000 g) x 10 min a 4 °C. Seguidamente, la pastilla se dejó secando por 5 min a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de isoelectroenfoco que contenía: 8 M de urea, 4% (p/v) CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato), 2% (v/v) Triton X-100, 50 mM DTT, 1 µg/µl aprotinina y 1 µg/µl leupeptina, por pipeteo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm (18,000 g) por 20 min, para remover la materia insoluble. La cuantificación de proteínas se realizó según el

sistema Bio-Rad Protein Assay Kit, empleando como referencia una curva patrón de albumina de suero bovino, basado en el método de Bradford (1976).

3.2.6. Solubilización de las proteínas con detergente

Para este experimento se usó extracto citosólico y membranal (soluble y microsomal) de raíces de plántulas que estuvieron en presencia de 0.5 y 1 mM de KNO_3 . En un primer experimento, los extractos citosólicos y membranales (soluble y microsomal) de las plántulas que estuvieron en presencia de 0.5 mM de KNO_3 se les adicionaron tres diferentes tipos de detergentes: 1) iónico: desoxicolato de sodio, 2) no iónico: Tritón X-100 y 3) zwitteriónico: CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato). Estos detergentes se adicionaron dentro del rango de su concentración micelar crítica (CMC) [desoxicolato de sodio: 0.083-0.249 % (p/v); Tritón X-100: 0.02 % (p/v) y CHAPS: 0.49-0.61 % (p/v)] y el extracto expuesto al detergente se incubó 30 min a 4° C y en agitación. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 100,000 g (33,000 rpm) por 60 minutos. El sobrenadante fue usado como el extracto proteico y las proteínas se desnaturalizaron a 100 °C por 5 min y se separaron en una electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v). En un segundo experimento, a los extractos citosólico y membranal (soluble y microsomal) de las plántulas que estuvieron en presencia de 1 mM de KNO_3 se les adicionaron diferentes concentraciones de Tritón X-100 (0.1, 0.5 y 1 %, v/v), se dejaron en agitación por 30 min a 4° C y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

3.2.7. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida conteniendo Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a Laemmli (1970). Para ello se prepararon geles de separación al 10% (v/v) de poliacrilamida y geles de concentración al 4% (v/v) de poliacrilamida. La cantidad de proteína aplicada a los geles se especifica en cada experimento. En algunos casos, las proteínas fueron detectadas en el gel por tinción con Coomassie R-250 (Bio-Rad Laboratories) y en otros por tinción con plata.

3.2.8. Inmunodetección de CcNRT2.1

Las proteínas separadas en gel de SDS-PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) a 40 V durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la membrana fue bloqueada por 1 h con BSA al 5 % (p/v), diluida en TBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween 20) (NaCl 0.9%, tris 10 mM, tween-20, pH 7.4). La membrana se lavó tres veces en agitación por 10 minutos con TBS-T y se incubó 2 hrs a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo primario contra CcNRT2.1, anti-4557. La dilución que se utilizó del anticuerpo varió desde 1:8000 hasta 1:5000 y se especifica en los resultados. Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBS-T, la membrana fue incubada 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-IgG) conjugado con peroxidasa (dilución 1/5000). La detección se realizó por quimioluminiscencia (Amersham ECL), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.9. Inmunolocalización de CcNRT2.1 en la raíz de chile habanero

Para determinar tanto la localización celular como subcelular de CcNRT2.1 en las raíces de chile habanero, se llevó a cabo un experimento en el que se realizaron criocortes longitudinales y transversales de la raíz (entre 3-5 μm) y se determinó la localización de esta proteína mediante el uso de un anticuerpo primario específico levantado contra CcNRT2.1, el anti-4557, y un anticuerpo secundario acoplado al fluoroforo Fluoresceína (FITC, Thermo Fisher). El anticuerpo primario anti-4557 se utilizó a una dilución de 1:500 y el anticuerpo secundario a una dilución de 1:100.

Así mismo se utilizó el marcador de membranas plasmática, FM4-64 (Molecular Probes, Invitrogen detection technologies). Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas mediante el uso del microscopio confocal FV-1000 (Olympus, Tokio, Japón) a una longitud de onda de excitación/emisión máxima de 515/640 nm para el colorante FM4-64 y una longitud de onda de excitación/emisión máxima de 490/525 nm para el fluoroforo FITC.

3.2.10. Absorción neta de NO_3^-

Para evaluar la absorción neta de NO_3^- , 40 plántulas de chile habanero *Capsicum chinense* Jacq. (cv.naranja) de 12 días de edad y con ~ 8 cm de longitud de la raíz primaria, fueron colocadas durante cuatro días (96 hr) en solución Hoagland a la mitad de su fuerza iónica sin N, posteriormente se sometieron a una concentración de 0.5 mM KNO_3 por 24 hrs. Al término de este tiempo, la raíz se seccionó en tres regiones de acuerdo a la distancia desde el ápice: 0-20 mm, 21-41 mm y 42-62 mm; estas secciones se nombraron como Z1, Z2 y Z3, respectivamente. Posteriormente cada una de las regiones de la raíz se colocaron por separado en solución Hoagland nueva a la mitad de su fuerza iónica con 0.5 mM KNO_3 por 24 hrs. El contenido de NO_3^- en el medio fue medido antes y después de la incubación con este nutriente, siguiendo el protocolo descrito por Cawse (1967). Se tomaron 1.5 ml de la solución nutritiva a los cuales se les agregó 100 μl de ácido sulfámico al 20%, posteriormente se mezcló y se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente, después se mezcló de nuevo y se le adicionó 400 μl de ácido perclórico al 10%, se mezcló de nuevo y por último se leyó a una longitud de onda de 210 nm en el espectrofotómetro Genesys 10uv (ThermoSpectronic). La tasa de absorción neta de NO_3^- ($\mu\text{g NO}_3^-/\text{g}^{-1}\text{ PF}/\text{h}^{-1}$) se calculó basándose en la diferencia entre el contenido inicial y final de NO_3^- en la solución nutritiva. Se usaron 30 plántulas, de las cuales se obtuvieron 30 Z1, 30 Z2 y 30 Z3; las cuales se dividieron en tres replicas para cada zona (10 secciones de raíz por replica). El material biológico se congeló con N líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

3.2.11. Contenido de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero

Para determinar el contenido de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria se utilizó el material biológico recolectado en el apartado 3.2.10. El tejido de cada una de las réplicas por zonas se unió y se realizó la extracción de proteínas tal y como se describe en el apartado 3.2.5.

El contenido de NO_3^- en cada una de las zonas de la raíz se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cawse (1967), detallado anteriormente. El contenido de NO_3^- ($\mu\text{g NO}_3^-/\text{g}^{-1}\text{ PF}$) se calculó dividiendo los microgramos totales de proteínas obtenidos de cada extracto, entre los gramos de tejido fresco de cada una de las zonas de la raíz.

3.2.12. Estimación del flujo neto de H^+ en raíces de chile habanero en presencia de bajas concentraciones de NO_3^- mediante estimación de flujo de iones por microelectrodos (MIFE)

Se utilizaron semillas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) de la variedad naranja (Seminis®). Las semillas se desinfectaron con etanol al 80% (v/v) por 5 min y se realizaron continuos lavados con agua estéril. Posteriormente se incubaron con hipoclorito de sodio de marca comercial (Cloralex, 5% NaOCl) al 30% (v/v) por 15 min, se realizaron continuos lavados y se dejaron embebiendo con agua estéril durante 48 h a 4°C en condiciones de oscuridad. Después del tiempo de estratificación, las semillas fueron incubadas (oscuridad) en cajas Petri con papel filtro humedecido con agua estéril hasta la aparición de la radícula. Las semillas con emergencia de la radícula fueron transferidas a cajas de Petri con medio de crecimiento Gamborg-B5 (Sales B5, Sigma) modificado a la mitad de su fuerza iónica (B5/2). El medio B5/2 fue adicionado con sacarosa 0.5% (w/v) y agar al 1% (w/v); el pH fue ajustado a 5.8. Las plántulas de 10 días de edad y que presentaban una raíz primaria de 8 a 10 cm de longitud fueron empleadas para la medición del flujo de iones usando microelectrodos selectivos.

El flujo neto de H^+ sobre la superficie de las raíces de chile se midió en forma no invasiva mediante la técnica de MIFE (Newman, 2001). Para los estudios con MIFE, las plántulas cultivadas *in vitro* cuyas raíces medían 8-10 cm fueron transferidas y fijadas a una cámara de medición en posición horizontal. Inmediatamente, se agregaron 30 mL de la solución de medición para el H^+ (0.5 mM KCl y 0.1 mM $CaCl_2$, sin amortiguadores) y se esperó una hora para su estabilización. Se utilizaron dos microelectrodos selectivos para cada medición en una raíz por cada experimento. Para los experimentos se determinó medir en tres diferentes zonas de la raíz, una para la zona uno que fue desde la parte del ápice (desde el inicio del ápice hasta los 2 cm), la zona dos (desde los 2-4 cm) y la zona 3 (desde 4-6 cm). En la figura 2.14A se muestran de manera gráfica las zonas de la raíz que se midieron.

Se aplicó una concentración de 0.5 mM de KNO_3 a la cámara de medición (30 mL). Antes del experimento, los microelectrodos fueron llenados con 0.15 mM NaCl + 0.04 mM KH_2PO_4 para la medición de H^+ y enseguida se llenó la punta de cada electrodo con la resina ion selectiva (intercambiador ión-líquido, LIX; Fluka, Sigma-Aldrich) para el ion de interés (H^+). Después, los electrodos fueron montados en un micromanipulador y se localizaron

perpendiculares al eje de la raíz primaria a 50 μM de cada zona antes mencionada. Las mediciones se iniciaron moviendo los microelectrodos 50 μm hacia atrás y luego hacia adelante y de nuevo hacia atrás cada 8 s. El software CHART registró las diferencias de potencial entre los dos puntos de medición y las convirtió en diferencias de potencial electroquímico, utilizando la pendiente de Nernst. Al inicio, los flujos de iones se midieron por un periodo de 5 minutos, al cumplirse el minuto 5 se aplicó la concentración de KNO_3 mencionada y se hicieron las mediciones por un período de 30 min.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Inmunodetección de CcNRT2.1 en las raíces de chile habanero en respuesta a NO_3^-

CcNRT2.1 fue detectado usando dos anticuerpos policlonales, llamados anti-4547 y anti-4548, obtenidos a partir de conejo (dos conejos), los cuales fueron inmunizados con un péptido sintético contra CcNRT2.1 localizado en el extremo C-terminal (KGMHQNSLKFAENCR) (Figura 3.1). Este péptido se diseñó tomando en cuenta el péptido anti-NRT2.1, diseñado para la proteína NRT2.1 de *Arabidopsis thaliana*, (Wirth *et al.*, 2007).

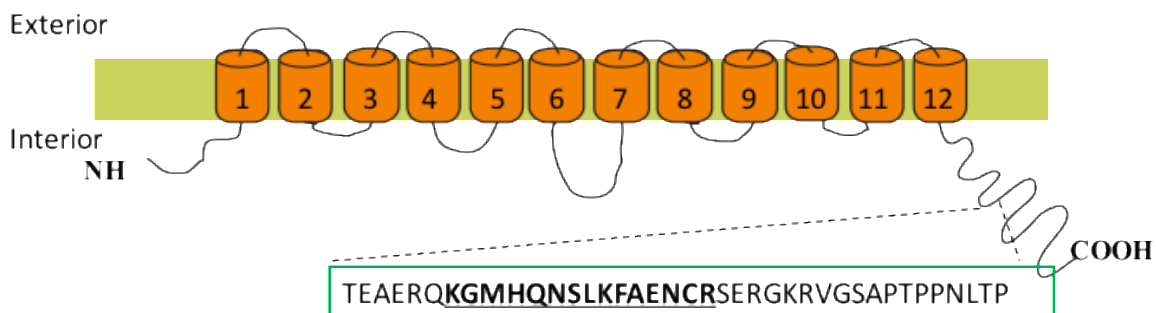


Figura. 3.1. Secuencia del péptido sintético diseñado para generar anticuerpos contra CcNRT2.1. Topología de membrana de CcNRT2.1 predicha por análisis *in silico* con la secuencia del péptido usada para generar los anticuerpos contra CcNRT2.1, llamados anti-4557 y anti-4558 (indicado con negritas y subrayado). NH y COOH son los extremos amino y carboxilo terminales, respectivamente.

Los anticuerpos anti-4557 y anti-4558 fueron probados mediante Western blot usando extracto citosólico y extracto membranal de raíz y hoja (ECR, ECH, EMR y EMH, respectivamente) de plántulas creciendo en presencia de 0.1 mM de NO_3^- (Figura 3.2).

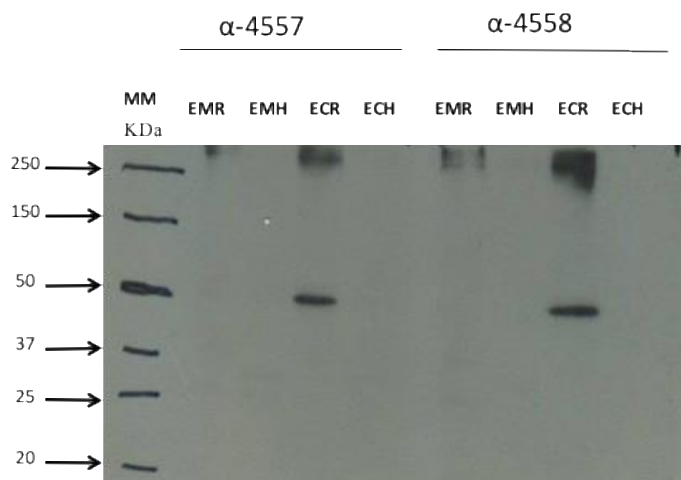


Figura. 3.2. Inmunodetección de CcNRT2.1 en tejido de chile habanero. Plántulas de chile habanero de seis semanas de edad fueron sometidas a un déficit de N por 96 hrs y expuestas a 0.1 mM de KNO_3 por igual tiempo. El extracto proteico (34 μg de proteína) provenientes de la fracción citosólica (ECH y ECR) y membranal (EMH y EMR) de hoja (H) y raíz (R) fue separado por SDS-PAGE, electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectado usando los anticuerpos contra CcNRT2.1 anti-4557 y anti-4558 (dilución: 1:8000). MM: Marcador de masa molecular.

Ambos anticuerpos revelaron una banda de ~50 kDa. Esta banda fue detectada solo en raíz, específicamente para el extracto citosólico. Ambas bandas tuvieron una similar intensidad, por lo que se decidió continuar los estudios únicamente con un anticuerpo, el anti-4557 y con extracto proteico proveniente de raíz.

En el siguiente experimento se utilizó el extracto citosólico y membranal de raíz de plántulas tratadas con diferentes concentraciones de NO_3^- . El estudio reveló varias bandas positivas a la detección por el anticuerpo en el ECR a ~74, ~66, ~60 y ~57 kDa y una banda de ~20 en el EMR. La banda de ~74 kDa resultó ser prácticamente indetectable a 0.1 mM y más intensa a 0.5 y 1 mM, comparado con la banda obtenida a 10 mM de NO_3^- . Estos resultados nos sugieren una posible interacción con una proteína de una masa molecular de alrededor de 25 kDa, siendo la candidata más fuerte una proteína del tipo NAR2. Orsel y colaboradores (2006), determinaron que AtNRT2.1 y AtNAR2.1 formaban un complejo proteína-proteína para llevar a cabo la toma de NO_3^- de alta afinidad. De igual manera los

reportes en la literatura indican que las proteínas NAR2 tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa (Barbier y Brigo, 2011), lo cual concuerda con lo encontrado en este experimento. La banda de ~66 kDa fue más intensa a medida que aumentaba la concentración de NO_3^- , presentando su mayor intensidad a 1 mM, y siendo prácticamente indistinguible a 10 mM de NO_3^- . La banda de ~60 kDa presentó una regulación muy variable. Su mayor y menor inmunodetección se dio a 1 mM y a 0.5 mM de NO_3^- , respectivamente. La banda de ~57 kDa únicamente se detectó a dos concentraciones, a 0.1 y 1 mM de NO_3^- . La banda de ~20 kDa detectada en el EMR no presentó cambios significativos en su abundancia entre las diferentes concentraciones de NO_3^- . Los resultados obtenidos nos indican que la proteína CcNRT2.1 se regula por la concentración de NO_3^- y sugieren que ésta pudiera estar presente en forma monomérica, formando complejos con otras proteínas ó incluso pudieran estar presentes en forma parcial. Esta hipótesis sostendría la explicación de los diferentes tamaños observados en los films. (Figura 3.3).

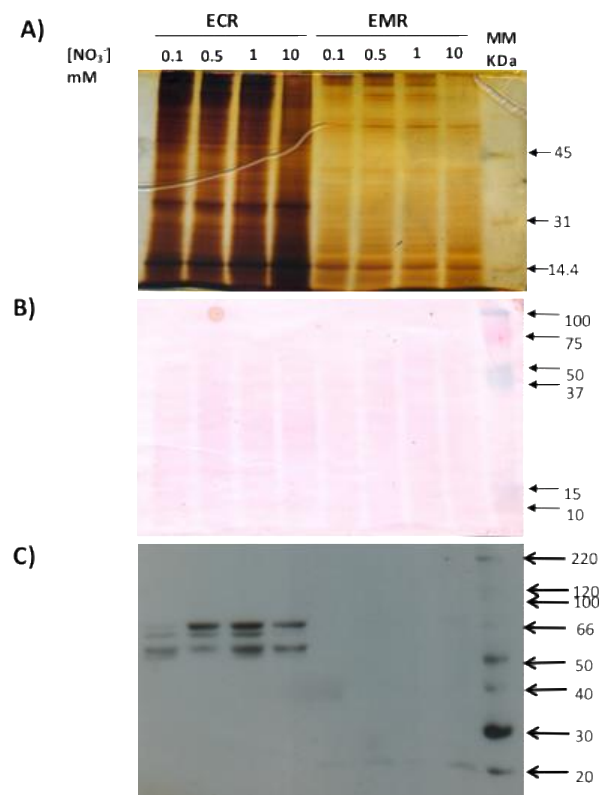


Figura. 3.3. Regulación de los niveles de CcNRT2.1 en respuesta a diferentes concentraciones de NO_3^- . (A) Perfil de proteínas teñidas con plata. (B) Membrana

de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. (C) Inmunodetección de CcNRT2.1 a partir de extracto citosólico y membranal de raíz (ECR y EMR, respectivamente) de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. de seis semanas de edad creciendo en condiciones de hidroponía. Los ECR y EMR se extrajeron de plantas creciendo a las mismas condiciones descritas en la figura 3.2, solo que posterior al tratamiento de N por 96 hrs, las plántulas se sometieron a diferentes concentraciones de NO_3^- (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) por 96 hrs. Pasado este tiempo, se les cambió el medio por uno nuevo conteniendo las mismas concentraciones de NO_3^- mencionadas anteriormente y a las 24 hrs se realizó la cosecha del material vegetal. Se aplicó 25 μg de proteína por carril. Diluciones: α -1°4557- (1:5000), α -2° (1:2000). Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 %. Marcador de molecular (MM).

Con el objetivo de comprobar la especificidad del anticuerpo primario α -4557, se llevó a cabo una inmunodetección, en donde se omitió el uso de éste anticuerpo, y en su lugar se uso agua. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.4.

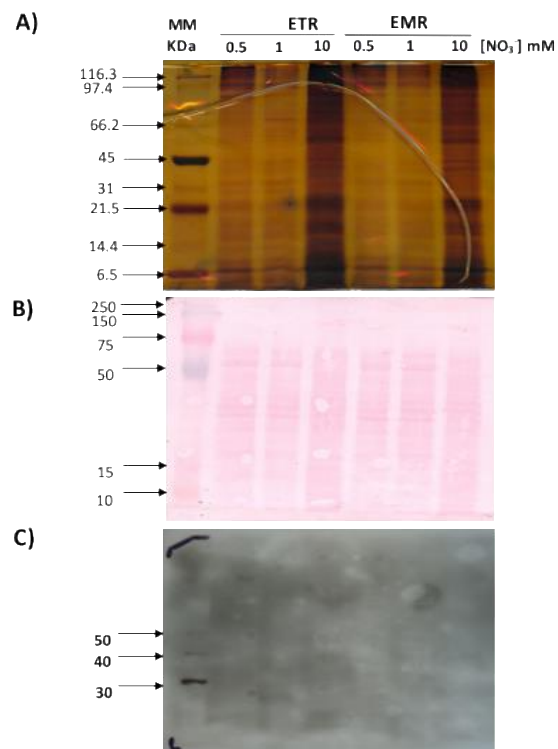


Figura. 3.4. Determinación de la especificidad del α -1°4557. (A) Perfil de proteínas teñidas con plata. (B) Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de

Ponceau. (C) Inmunodetección de CcNRT2.1 usando extracto total y membranal de raíz (ETR y EMR, respectivamente) de Plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. de seis semanas de edad sometidas a las mismas condiciones descritas en la figura 3.3. Se aplicó 25 µg de proteína para el ETR y 46 µg proteína para el EMR por carril. En este experimento no se incubó con el anticuerpo primario. Diluciones: α-2° (1:2000). Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 %. Marcador de masa molecular (MM). 0.5, 1 y 10, corresponde a las diferentes concentraciones de NO₃⁻ usadas en cada tratamiento.

Los resultados indicaron que el anticuerpo primario α-4557 reconoce específicamente al anticuerpo secundario α-conejo acoplado a peroxidasa, ya que en la película no se detectó ninguna señal.

En los resultados obtenidos en la Figura 3.3, se observa que las bandas proteicas inmunodetectadas presentaron una mayor masa molecular a la esperada (~57.5 kDa); esto podría deberse a la presencia de complejos proteicos que se están formando con CcNRT2.1. Debido a esto, se llevó a cabo un experimento en el que al extracto citosólico de raíz sometido a una concentración de 0.5 mM de NO₃⁻ se le trató con tres diferentes tipos de detergentes: iónico-Desoxicolato de sodio, no iónico-Tritón X-100 y zwitterionico-CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato; con el objetivo de romper estos complejos que posiblemente se pudieran estar formando con CcNRT2.1 (Figura 3.5).

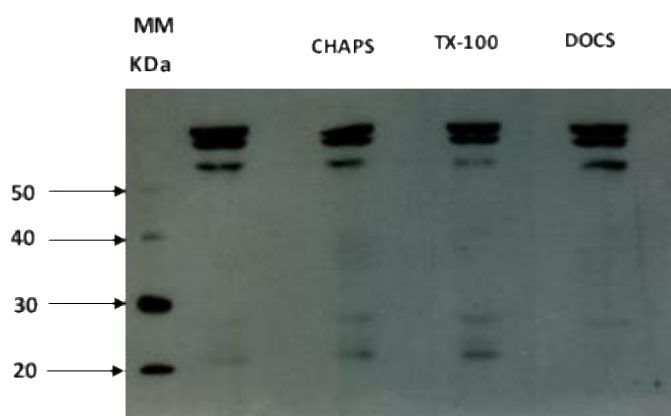


Figura. 3.5. Efecto de la aplicación de diferentes clases de detergentes sobre la inmunodetección de CcNRT2.1 a partir de extracto citosólico de raíz. En este experimento se usó el extracto proteico de raíz proveniente de la fracción citosólica (47 μ g de proteína). Al extracto citosólico, se le adicionaron diferentes concentraciones de detergentes: CHAP (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato , 0.49-0.61 % p/v), Tritón X-100 (0.02 % p/v) y Desoxicolato de sodio (DOCS, 0.083-0.249 % p/v). Diluciones de los anticuerpos: α -1 $^{\circ}$ 4557- (1:5000), α -2 $^{\circ}$ (1:2000). Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 %. Marcador Molecular (MM).

En las muestras tratadas tanto con CHAPS como con TRITON X-100, se aprecia que se liberaron dos bandas de \sim 30 y \sim 20 kDa, siendo más intensa la señal obtenida en ambas bandas con TRITON X-100. Las bandas de \sim 66 y \sim 77 kDa permanecieron invariables en todos los tratamientos. La única que presentó una disminución en su intensidad fue la de \sim 60 kDa en presencia de TRITON X-100. En el caso de los extractos tratados con desoxicolato de sodio (DOCS) solo se aprecia muy tenuemente la banda de \sim 30 kDa. Para el extracto que se encontraba sin detergente, la única banda que se aprecia de manera débil es la de \sim 20 kDa.

Estos resultados sugieren que las bandas de mayor masa molecular detectadas (\sim 74, \sim 66, \sim 60 kDa), podrían estar formando complejos proteicos en los cuales se encuentra involucrada CcNRT2.1 ó bien que el anticuerpo primario está reconociendo a otra u otras proteínas que tengan un péptido con un alto porcentaje de identidad al de CcNRT2.1, que correspondan a las masas moleculares observada.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió usar el detergente TRITON X-100 para los futuros experimentos de solubilización de proteínas citosólicas.

De igual manera se llevó a cabo un experimento donde el extracto membranal de raíz (EMR) fue tratado con los tres detergentes anteriormente mencionados. Como se observó anteriormente, de manera sorprendente en el extracto membranal no había posible observar alguna señal que indicara la presencia de esta proteína en el mismo. Esto se pudiera deber a que el sitio de reconocimiento del anticuerpo se podría encontrar enmascarado debido a interacciones proteicas y/o cambios estructurales en las proteínas asociadas a la membrana. Este experimento se realizó con el objetivo de determinar con que detergente se liberaban los complejos proteicos presentes en las membranas de los extractos de raíces tratadas con 0.5 mM de NO_3^- .

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.6.

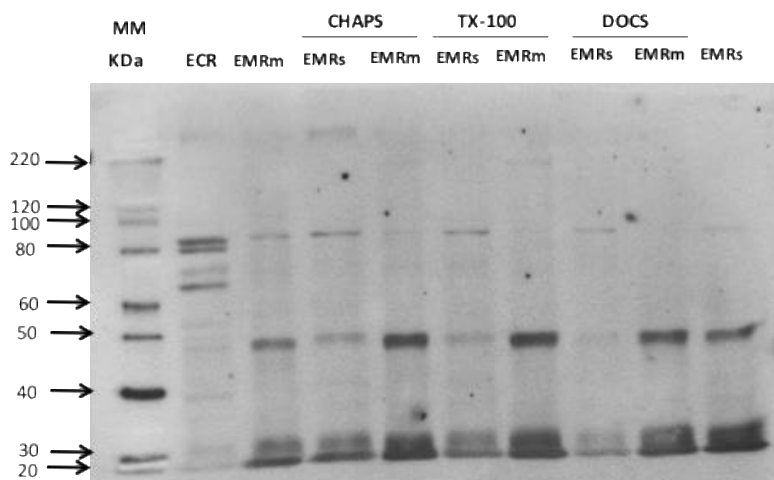


Figura. 3.6. Efecto de la solubilización de las proteínas membranales con diferentes clases de detergentes sobre la inmunodetección de CcNRT2.1. En este experimento se utilizó el extracto citosólico y membranal de raíz (ECS y EMR, respectivamente) de plántulas sometidas a 0.5 mM de KNO_3 bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El EMR total fue separada en fracciones y a cada una se le añadieron los diferentes detergentes. Una fracción del EMR fue sometida a las mismas condiciones, pero sin la adición de detergente. Las proteínas (19 μg) se recuperaron en la fracción soluble (EMRs)

y aquellas que quedaron asociadas a la fracción microsomal (EMRm) después de una ultracentrifugación fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 10 %.

Los resultados obtenidos indican que CcNRT2.1 se encuentra en menor cantidad en todos los EMRs tratados con detergentes en comparación con los EMRm tratados con detergentes. El EMRs donde hubo una menor liberación de proteínas es el que se trató con DOCS y el que mayor liberación presentó es el que se trató con CHAPS. La señal detectada en el EMRs tratado con TX-100 es ligeramente menos intensa que el detectado con CHAPS. El EMRs sin detergente muestra una señal baja de todas las bandas (~20, ~30, ~50 y ~80 kDa), comparadas con la de los EMRs tratados con los detergentes. Esto puede deberse a las propiedades químicas de DOCS. Estos resultados nos indican que DOCS no es un detergente adecuado para liberar las proteínas que se encuentran en las membranas de extracto soluble y que pudieran interactuar con CcNRT2.1 ó bien que la concentración de detergente usada no es la suficiente para disociar estos complejos de proteínas.

El EMRm que menor señal y liberación de proteínas presenta es el tratado con DOCS. La liberación de proteínas en el EMRm es ligeramente mayor en los extractos tratados con TX-100 en comparación con los tratados con CHAPS. El EMRm sin tratar muestra una mayor intensidad de la banda de ~80 kDa y una menor intensidad de las bandas de menor tamaño (~20, ~30 y ~50 kDa), en comparación con los extractos tratados con los diferentes detergentes. Estos resultados sugieren que el empleo de detergentes favorece la liberación de complejos de proteínas que se encuentran asociadas a las membranas, permitiendo que el anticuerpo pueda reconocer a la región específica en el transportador. Los mejores resultados se presentan en el EMRm tratado con TX-100.

Los tres detergentes liberaron bandas de ~50, ~30 y ~20 kDa en los EMR solubles y microsomales, siendo más intensa la señal de éstas en el EMRm tratado con TX-100. Sin embargo, estas proteínas aún se encuentran integradas en las membranas, es decir que no se están disociando lo suficiente. Esto pudiera deberse a que la concentración de los detergentes usados no fue suficiente para romper estos complejos. A la par de la aparición de estas bandas, la intensidad de la banda de ~80 kDa fue disminuyendo, indicando que los complejos formados se están disociando debido a la acción de los detergentes, dando como resultado la liberación de proteínas de menor masa molecular. Debido a estos resultados se decidió usar TX-100 a mayores concentraciones para futuros experimentos de solubilización de proteínas membranales solubles y microsomales.

Para el ensayo del efecto de diferentes concentraciones de detergente se seleccionó las raíces tratadas con 1 mM de NO_3^- y se les trató con tres diferentes concentraciones de TX-100 (0.1, 0.5 y 1 %). Los resultados se presentan en la Figura 3.7.

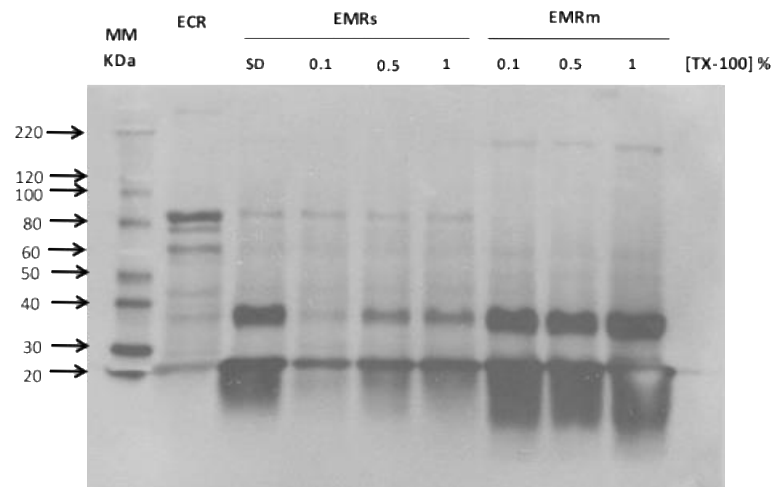


Figura. 3.7. Efecto de la dosis de Tritón X-100 sobre la solubilización y detección de CcNRT2.1 a partir de extractos membranales de raíz. El experimento fue similar al descrito en la Figura 3.6, pero en esta ocasión las fracciones del EMR fueron tratadas con concentraciones crecientes de Tritón X-100 (TX-100, 0.1, 0.5 y 1 %). El EMR que se utilizó en este experimento fue el proveniente de plántulas sometidas a 1 mM de KNO_3 y la cantidad de proteína aplicada al gel fue de 22 μg . ECR: extracto citosólico de raíz, SD: extracto membranaral de raíz sin detergente.

Los resultados muestran que todas las concentraciones usadas de TX-100 son capaces de liberar proteínas que forman complejos en las membranas de todos los extractos (EMRs y EMRm). Las bandas que se liberan son dos, una de ~ 40 y otra de ~ 20 kDa, de un complejo de ~ 80 y ~ 220 kDa en el EMRs y EMRm, respectivamente. La mayor intensidad de la señal se presenta en EMRm. En el EMRs tratado con 0.1% de TX-100 se da la menor intensidad de la señal y por lo tanto una menor liberación de proteínas. Con 0.5 y 1% no hay diferencia significativa en la señal detectada. El EMRs sin detergente indica que hay una mayor cantidad de proteína inmunodetectada en comparación con el EMRs tratado con las

diferentes concentraciones de TX-100. La banda de ~80 kDa aparentemente se encuentra solo en EMRs.

En los EMRm la mayor señal se detecta con 1% de TX-100. La señal inmunodetectada de ~220 kDa en EMRm sugiere que CcNRT2.1 se encuentra formando complejos con otras proteínas en las membranas y no así en la fracción membranal soluble.

Los resultados también indican que una parte de las proteínas aún se encuentran integradas en la membrana, esto pudiera deberse a que la concentración de los detergentes usados no es suficiente para deshacer estos complejos proteicos. A medida que aumentó la concentración del detergente, la intensidad de la banda de ~80 kDa fue disminuyendo en los extractos membranales solubles, mientras que las de las bandas de ~40 y ~20 kDa aumentaron, indicando que los complejos formados se están dissociando debido a la acción de los detergentes, dando como resultado la liberación de proteínas de menor masa molecular. El mismo comportamiento se observó para las bandas del extracto soluble microsomal, en donde a medida que la banda de ~220 kDa perdió intensidad, las bandas de ~40 y ~20 kDa ganaron en intensidad, siendo mayor la señal a medida que aumentó la concentración del detergente. Sin embargo, a pesar de la cantidad de detergente usada, las proteínas aún siguen inmersas en la membrana, lo cual nos indica que están unidas muy fuertemente a este compartimento y que se requiere de una mayor concentración de detergente para poder liberarlas.

3.3.2. Inmunodetección de CcNRT2.1 en todos los órganos de la planta de chile habanero

Para determinar la localización de CcNRT2.1 en la planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) se llevó a cabo un experimento a partir de extracto total (ET) de raíz, tallo, hoja, flor y fruto (pericarpio, placenta y semilla) tratadas tal y como se indica en el apartado 3.2.3.

Los resultados indican que el anticuerpo específico para CcNRT2.1, detecta una banda de aproximadamente 60 kDa en el extracto total de raíz (ETR). Esto nos sugiere que dicha banda pudiera ser la correspondiente a CcNRT2.1, la cual tiene una masa molecular predicha de aproximadamente 57.5 kDa.

De igual manera, en el mismo extracto, se detectó una banda de aproximadamente 80 kDa. Esta banda pudiera tratarse de la asociación entre CcNRT2.1 y CcNAR2, ya que como se ha mencionado anteriormente, las proteínas del tipo NRT2 requieren de la asociación con proteínas tipo NAR2 para llevar a cabo la toma de NO_3^- de alta afinidad. Estas proteínas NAR2 presentan una masa molecular aproximada de 25 kDa, por lo que sugerimos que esta banda detectada corresponde al dímero de CcNRT2.1 y CcNAR2. Por lo tanto, podemos inferir que bajo concentraciones milimolares de NO_3^- , tanto la forma monomérica, como la forma dimerica (NRT2/NAR2) pudieran estar llevando a cabo el transporte de NO_3^- de alta afinidad en raíces de chile habanero.

En los restantes órganos de la planta se detectaron difentes bandas con masas moleculares entre los 70 y 90 kDa, las cuales pudieran tratarse de inespecificidades por parte del anticuerpo, debido a que las masas moleculares no corresponden con las formas que la proteína pudiera estar tomando, como la forma monomérica, dimerica ó heterotetramérica (Figura 3.8).

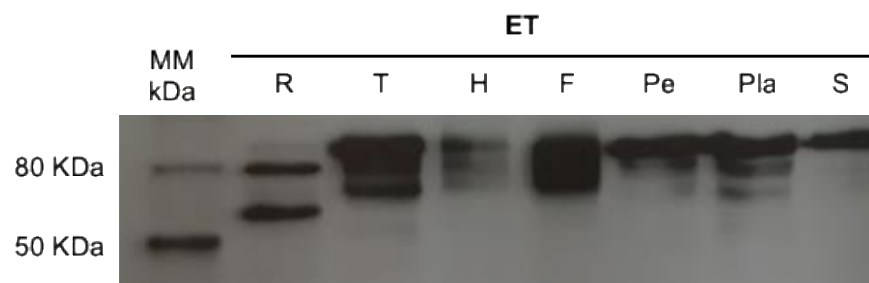


Figura. 3.8. Inmunodetección de CcNRT2.1 en todos los órganos de la planta de chile habanero. Plántulas de chile habanero de seis semanas de edad fueron sometidas a un déficit de N por 96 hrs y expuestas a 0.5 mM de KNO_3 por igual tiempo (raíz; tallo y hoja). Para los extractos de flor (F), pericarpio (Pe), placenta (Pla) y semilla (S) se usaron plantas de chile habanero de aproximadamente 120 días de edad expuesta a 1 mM de KNO_3^- . Los extractos proteicos (35 μg de proteína) provenientes del extracto total de raíz (ETR), tallo (ETT), hoja (ETH), flor (ETF), pericarpio (ETPe), placenta (ETPla) y semilla (ETS) fueron separados por SDS-PAGE, electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectados usando el anticuerpo contra CcNRT2.1 anti-4557 (dilución: 1:5000). MM: Marcador de masa molecular.

3.3.3. Inmunodetección de CcNRT2.1 en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero

Para determinar en que zona específica de la raíz primaria de chile habanero se localiza CcNRT2.1, se llevó a cabo un experimento usando extracto total de las tres zonas de la raíz primaria (Z1, Z2 y Z3, respectivamente) (ver Figura 2.14.A). Las plántulas crecieron y se trataron como se indica en el apartado 3.2.4.

Los resultados obtenidos mediante western blot indican que el anticuerpo específico contra CcNRT2.1 no detectó ninguna banda en la Z1 (0-2 cm) de la raíz. Contrario a esto en la Z2 (2-4 cm) de la raíz se detecta una banda de aproximadamente 60 kDa, la cual coincide con los resultados obtenidos en el experimento anterior (ver Figura 3.8). De igual manera se detecta una banda de aproximadamente 80 kDa, reafirmando los resultados obtenidos anteriormente (ver Figura 3.8). En la Z3 (4-6 cm), al igual que en la Z2, se detectó una banda de aproximadamente 80 kDa. Estos resultados nos sugieren que la banda de 60 kDa podría tratarse de la proteína CcNRT2.1 en su forma monomérica y que ésta se localiza de manera exclusiva en la Z2 de la raíz primaria. Así mismo los resultados obtenidos sugieren que la banda de 80 kDa podría tratarse de un complejo proteico que incorpora a CcNRT2.1 y CcNAR2 y que esta forma dimerica se encuentra tanto en la Z2 como en la Z3 de la raíz; sugiriendo que este complejo proteico no es exclusivo de una zona específica de la raíz (Figura 3.9). En mutantes knock out de *Arabidopsis* (*nar2.1-1*) se ha demostrado que la ausencia de NAR2.1 reduce en más del 90% el flujo de entrada de NO_3^- de alta afinidad, aunque AtNRT2.1 se exprese de manera normal (Orsel *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2006). En este mismo trabajo se determinó a través del sistema de división de ubiquitina, que AtNRT2.1 y AtNAR2.1 interaccionan a nivel de proteína.

Estos resultados pueden confirmar lo que se ha observado en los experimentos anteriores realizados en este capítulo y refuerzan la hipótesis de que CcNRT2.1 interacciona CcNAR2 a nivel de proteína; y que por lo tanto la banda con masa molecular de 80 kDa detectada en los experimentos de western blot podría ser el resultado de la interacción de estas dos proteínas (Figura 3.9).

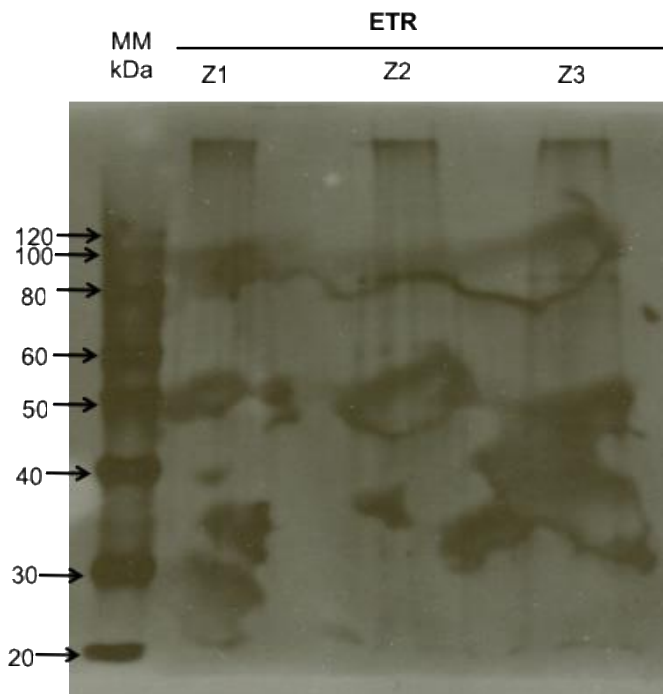


Figura 3.9. Inmunodetección de CcNRT2.1 en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero. Plántulas de chile habanero de seis semanas de edad fueron sometidas a un déficit de N por 96 hrs, seccionadas en tres zonas llamadas Z1 (0-2 cm), Z2 (2-4 cm) y Z3 (4-6 cm) y expuestas a 0.5 mM de KNO_3 por igual tiempo. Los extractos proteicos (20 μg de proteína) provenientes del extracto total de raíz (ETR) fueron separados por SDS-PAGE, electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectados usando el anticuerpo contra CcNRT2.1 anti-4557 (dilución: 1:2000). MM: Marcador de masa molecular.

Es de destacar que en la literatura no existen resultados en donde se haya inmunodetectado a esta proteína, al realizar una separación entre extractos proteicos provenientes de citosol y de membrana; por lo tanto, los resultados presentados acá aportan a la complejidad de este tipo de proteínas y a la posible presencia de complejos funcionales conteniendo la misma en la membrana.

3.3.4. Localización celular y subcelular de CcNRT2.1

Con el objetivo de determinar la localización celular y subcelular de CcNRT2.1 en raíces de plantas crecidas *in vitro* se llevó a cabo un estudio a través de microscopia confocal, utilizando un anticuerpo secundario acoplado al fluoroforo FITC (Thermo Fisher) que reconoce al anticuerpo primario específico levantado contra CcNRT2.1 y el marcador específico de membrana plásmatica FM4-64. La fluorescencia de FITC fue principalmente detectada en células de epidermis y corteza de la raíz primaria (Figura 3.10A). La fluorescencia de FM4-64 fue detectada, despues de un corto tiempo de incubación (10 min), en la membrana plasmática de las células de epidermis y de corteza (Figura 3.10B). Al sobrelapar ambas imágenes se obtiene la colocalización de la fluorescencia de FITC y de FM4-64, dando como resultado una fluorescencia amarilla de la membrana plásmatica (Figura 3.10.D), lo cual nos indica que CcNRT2.1 se localiza en la membrana plasmática de células de epidermis y corteza en la raíz primaria de chile habanero (Figura 3.10).

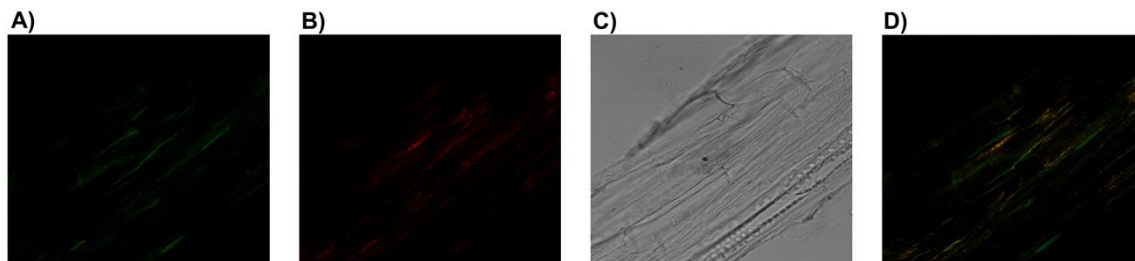


Figura 3.10. Localización celular y subcelular de CcNRT2.1 en la raíz primaria de chile habanero. Plántulas de chile habanero de seis semanas de edad sometidas a un déficit de N por 96 hrs y expuestas a 0.5 mM de KNO_3 por igual tiempo. A) Fluorescencia de FITC. B) Fluorescencia de FM4-64. C) Imagen de campo claro. D) Sobrelapamiento de FITC y de FM4-64. Todas las imágenes corresponden a la vista longitudinal de la raíz. Las abreviaciones son e: epidermis; c: corteza y tv: tejido vascular.

3.3.5. Absorción neta de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria

Mediante la tasa de absorción neta de NO_3^- se determinó cual de las diferentes zonas de la raíz primaria (Z1, Z2 y Z3) era la responsable de llevar a cabo la mayor absorción neta de dicho nutriente, cuando las plántulas se encontraban en presencia de 0.5 mM de NO_3^- y durante un período de 24 hrs. Los resultados indican que la Z1 (0-2 cm) es donde se llevó a cabo la mayor absorción neta de NO_3^- , $\sim 700 \mu\text{g NO}_3^- / \text{g}^{-1} \text{PF} / \text{h}^{-1}$, seguido por la Z3 (4-6 cm) con una absorción de $\sim 190 \mu\text{g NO}_3^- / \text{g}^{-1} \text{PF} / \text{h}^{-1}$ y por último, presentando el menor valor, la Z2 (2-4 cm) con $\sim 50 \mu\text{g NO}_3^- / \text{g}^{-1} \text{PF} / \text{h}^{-1}$. Los resultados se presentan en la figura 3.11.

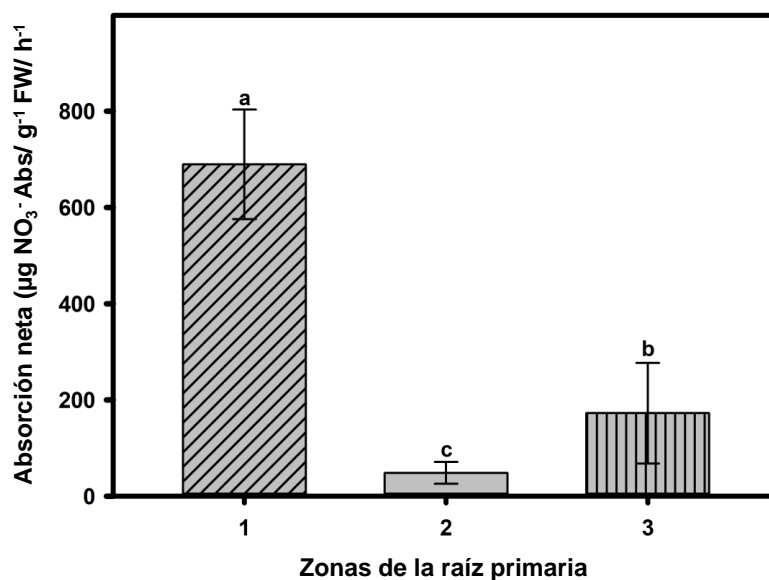


Figura 3.11. Absorción neta de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero. Plántulas de chile habanero de aproximadamente 12 días de edad fueron sometidas a un déficit de N por 96 hrs, posteriormente fueron puestas en presencia de 0.5 mM de KNO_3 por un período de 24 hrs, se seccionaron las raíces en tres zonas llamadas Z1 (0-2 cm), Z2 (2-4 cm) y Z3 (4-6 cm) y se expusieron a la misma concentración de KNO_3 por el mismo período de tiempo. La tasa de absorción neta de este nutriente fue calculada restandole a la concentración inicial la concentración resultante después de 24 hrs. La gráfica

muestra los datos de un experimento representativo con tres repeticiones. Los datos representan el valor de la media de cada tratamiento y la barra de error indica la desviación estándar ($n= 9$), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre cada una de las zonas de raíz evaluadas ($P < 0.050$, prueba de Tukey).

Este resultado no concuerda con los obtenidos previamente acerca de la expresión y localización del transportador de NO_3^- . Sin embargo, se debe tener en cuenta que la absorción neta es el balance que ocurre entre el flujo de entrada y el de salida; y previamente en el laboratorio, en el trabajo realizado por Santiago-Antonio y colaboradores (2014), se demostró que la raíz de chile habanero tiene un flujo de salida de NO_3^- , aunque no se ha descrito en cuál zona se presenta en mayor cantidad.

3.3.6. Contenido de NO_3^- en las diferentes zonas de la raíz primaria

Con el objetivo de determinar la relación entre la zona de la raíz primaria y el contenido total de NO_3^- se llevó a cabo un experimento en el que tanto a plántulas testigo (sin NO_3^-) como a plántulas que estuvieron en presencia de 0.5 mM de NO_3^- por un período de 24 hrs, se le seccionó su raíz primaria en tres zonas (ver Figura 2.14.A) y se evaluó el contenido endógeno total de este nutriente en el extracto total proteico correspondiente a cada una de las diferentes zonas de la raíz. Los resultados indican que la Z2 de la raíz es donde hay una mayor concentración de este nutriente ($\sim 6800 \mu\text{g NO}_3^- / \text{g}^{-1} \text{PF}$), seguido por la Z1 ($\sim 6000 \mu\text{g NO}_3^- / \text{g}^{-1} \text{PF}$) y la Z3 ($\sim 5200 \mu\text{g NO}_3^- / \text{g}^{-1} \text{PF}$), respectivamente. Estos resultados indican la gran capacidad de asimilación que tiene la Z2 para este nutriente.

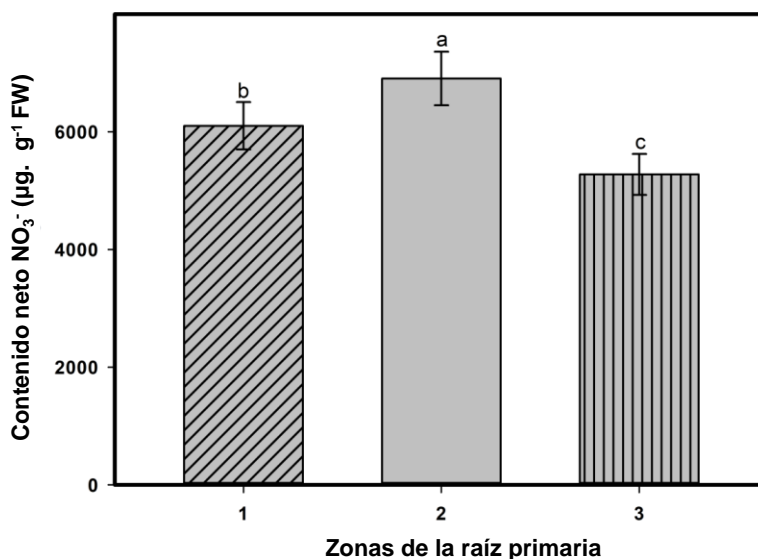


Figura 3.12. Contenido total de NO₃⁻ en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero. Plántulas de chile habanero de aproximadamente 12 días de edad fueron sometidas a un déficit de N por 96 hrs, posteriormente fueron puestas en presencia de 0.5 mM de KNO₃ por un período de 24 hrs, se seccionaron las raíces en tres zonas llamadas Z1 (0-2 cm), Z2 (2-4 cm) y Z3 (4-6 cm) y se expusieron a la misma concentración de KNO₃ por el mismo período de tiempo. El contenido neto de NO₃⁻ se evaluó mediante la diferencia obtenida entre el contenido de NO₃⁻ de las plántulas que estuvieron en presencia de este nutriente y las plántulas testigo. Los datos representan el valor de la media de cada tratamiento y la barra de error indica la desviación estándar (n= 5), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre cada una de las zonas de raíz evaluadas (P <0.050, prueba de Tukey).

3.3.7. Efecto del NO₃⁻ sobre el flujo de H⁺ en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) mediante estimación de flujo de iones por microelectrodos (MIFE)

En este estudio se empleó la técnica de la estimación del flujo de iones por microelectrodos (MIFE, por sus siglas en inglés) para evaluar el flujo de protones en las diferentes zonas de la raíz primaria de chile habanero. La técnica de MIFE se basa en un método electrofisiológico que mide el flujo de iones específicos de manera no invasiva. El objetivo

de este experimento fue determinar en que zona específica de la raíz primaria (ver Figura 2.14.A) es donde se lleva a cabo el mayor flujo de entrada de H^+ ; y por lo tanto, de manera indirecta en que zona de la raíz es donde se lleva a cabo una mayor absorción de NO_3^- .

Los resultados obtenidos indican que en la Z1 (0-2 cm, relativo al ápice de la raíz) al momento de aplicar 0.5 mM KNO_3^- , se observó un ligero flujo de entrada de H^+ entre el minuto 5 y 7.5; después de ese tiempo los valores de los flujos se mantuvieron en el rango de -1; muy similares a los valores encontrados antes de la aplicación del tratamiento, lo cual nos sugiere que no hay ni flujo de entrada ni de salida.

En la Z2 (2-4 cm, relativo al ápice de la raíz) se observó un flujo de entrada de H^+ después de la aplicación de 0.5 mM de KNO_3^- , a partir del minuto 7 y hasta el minuto 17. Después de este tiempo los valores disminuyen prácticamente hasta alcanzar los valores presentados antes de la aplicación del tratamiento. Esto nos indica que la absorción de NO_3^- de alta afinidad sucede durante los primeros minutos de exposición (~10 min.). El transporte de NO_3^- es un transporte del tipo activo secundario, lo cual indica que se requiere de energía en forma de ATP para que pueda ingresar al interior de la célula. Para que este ión pueda entrar a la célula se requiere de un mecanismo simporte, en el que a la misma vez entra una molécula de NO_3^- y dos H^+ . Al mismo tiempo la ATPasa de membrana plásmática saca un H^+ para que de esta manera se mantenga el balance electroquímico de la membrana. Por lo tanto el mayor flujo de entrada de H^+ ocurre en esta zona de la raíz, cuando ésta se encuentra en presencia de KNO_3^- , Esto nos corrobora que la mayor absorción de este nutriente ocurre en el área comprendida entre los 20 a 40 mm desde el ápice de la raíz.

Por último en la Z3 (4-6 cm, relativo al ápice de la raíz), los resultados obtenidos indican que al momento de aplicar el tratamiento de KNO_3^- existe una respuesta rápida de salida y entrada. Esto se observa del minuto 5 al 6, posterior a estos tiempos los valores se mantuvieron en 0, lo cual nos indica que en esta zona evaluada los flujos de H^+ son de valores nulos o muy escasos. Los resultados se presentan en la Figura 3.13.

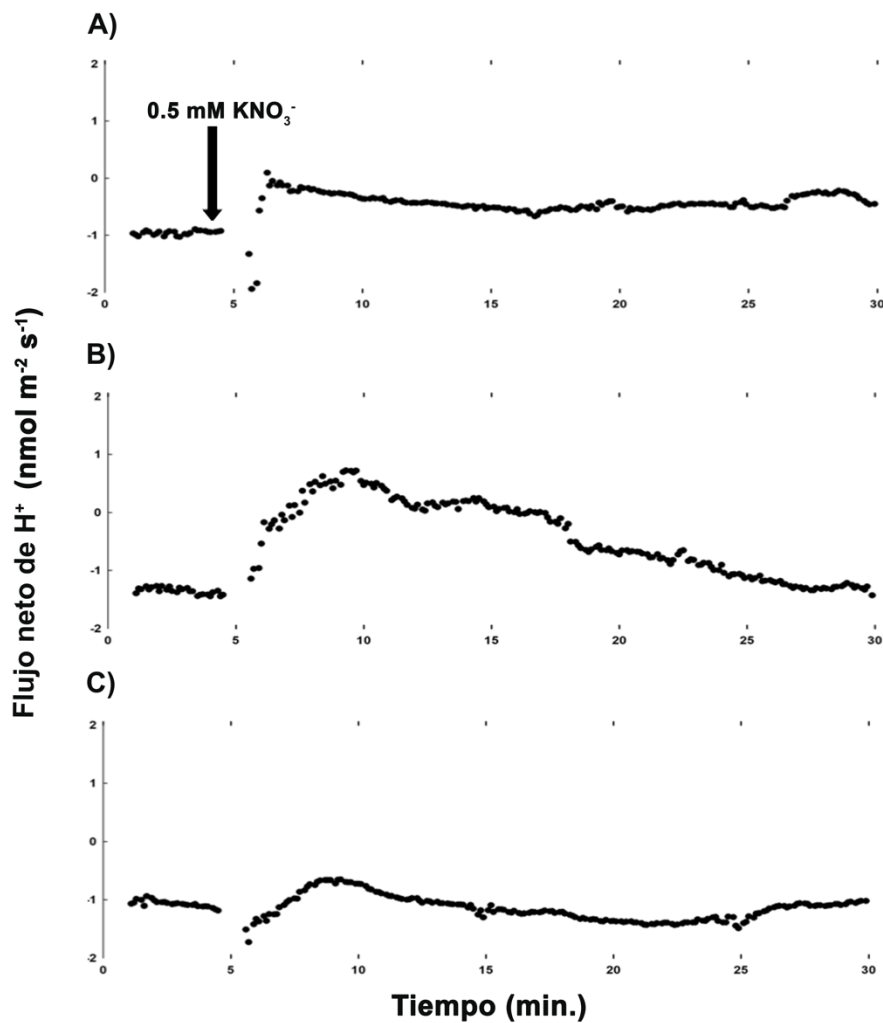


Figura 3.13. Efecto del KNO_3^- sobre el flujo neto de H^+ en las diferentes zonas de las raíces de *Capsicum chinense* Jacq. Cinética del flujo neto de H^+ medido en raíces de plántulas de 10 días de edad de la variedad naranja (seminis) después de agregar 0.5 mM de KNO_3^- (la flecha indica el momento de la adición del tratamiento). A) zona uno (Z1), B) zona dos (Z2) y C) zona 3 (Z3). Las mediciones se realizaron en un total de 5 plántulas. Valores positivos indican flujo neto de entrada. Valores negativos indican flujo neto de salida.

DISCUSIÓN GENERAL

Para enfrentar las concentraciones de NO_3^- variables en el ambiente, las plantas expresan funcionalmente múltiples transportadores de NO_3^- en sus tejidos y células con diferentes afinidades. De todos los miembros NRT2/ NAR2 en plantas, únicamente unos pocos han sido probados para ser transportadores de NO_3^- (Fan *et al.*, 2017). La gran mayoría de los estudios se han llevado a cabo en la planta modelo *Arabidopsis* y muy poco se conoce en plantas cultivables. En el presente estudio, nosotros demostramos que *CcNRT2.1* de chile habanero presenta una alta identidad con aquellos transportadores de NO_3^- de alta afinidad de plantas superiores, particularmente con los que se expresan en raíz, mientras que *CcNAR2* presenta una alta identidad con la proteína acompañante NAR2 (Figura 2.1-2.2). Los análisis de interacción *in silico* (Figura 2.3), estructura 3-D (Figura 2.7), expresión y regulación por NO_3^- (Figura 2.13), toma de NO_3^- en la raíz (Figura 3.11-3.13), así como de la localización de *CcNRT2.1* (Figura 3.10), sugieren que *CcNRT2.1/CcNAR2* son un HATS que participan en este proceso en la raíz de chile habanero. Este es el primer reporte donde un miembro NRT2/ NAR2 ha sido caracterizado en el género *Capsicum*.

Análisis de las secuencias de *CcNRT2.1* y *CcNAR2*

CcNRT2.1 presentó las características estructurales típicas de las proteínas NRT2, con las 12 hélices transmembranales, el loop citosólico largo que une a las regiones transmembranales 6 y 7 (Sun *et al.*, 2014) y los dominios característicos de las proteínas NRT2/NNP (Forde, 2000) y de las MFS (Pao *et al.*, 1998) (Figura 1.4). La conservación del dominio AGWGNMG relacionado con el sitio de reconocimiento del sustrato (Charrier *et al.*, 2015), y los residuos R115 y R332, indispensables para el transporte de NO_3^- por CRTA de *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al.*, 2004), colocan a *CcNRT2.1* como un posible transportador de NO_3^- .

La conservación de los sitios putativos de fosforilación en la proteína sugieren que la actividad de la misma podría regularse por eventos de fosforilación en respuesta a claves ambientales. Se ha demostrado que la S28, la cual se conserva en *CcNRT2.1* como un sitio probable de fosforilación (Figura A1), puede fosforilarse *in vivo* de una manera dependiente de la concentración de NO_3^- (Engelsberger y Schulze, 2012). Los niveles de fosforilación

en este residuo se mantuvieron altos cuando las células fueron sometidas a una ausencia o a bajas concentraciones (0.3 mM) de NO_3^- , mientras que a altas concentraciones (3 o 10 mM), la fosforilación disminuyó. Siendo AtNRT2.1 un transportador de alta afinidad que funciona cuando las concentraciones de NO_3^- son bajas, se puede especular que la fosforilación en la S28 puede regular negativamente la actividad de este transportador cuando aumentan las concentraciones del nutriente. También, se ha sugerido a la fosforilación como un mecanismo que regula la interacción NRT2-NAR2, la dimerización de NRT2 y el marcaje para la degradación de esta proteína (Engelsbeeger y Schulze, 2012), lo cual permanece aún sin ser demostrado.

Por otro lado, CcNAR2 presentó los dominios característicos de las proteínas NAR2 (Tong *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2014), así como la topología estructural típica para este tipo de proteínas, como se ha reportado para *Chlamydomonas reinhardtii* y otras especies de plantas superiores (Tsujiimoto *et al.*, 2007), con una región transmembranal cercana al extremo C-terminal (Figura 2.1). La presencia del residuo D99 en CcNAR2 que corresponde con el residuo D105 en AtNAR2.1, el cual se ha demostrado que es imprescindible para la toma de NO_3^- de alta afinidad en *Arabidopsis* (Kawachi *et al.*, 2006) sugiere que CcNAR2 es una proteína relacionada con el transporte de NO_3^- .

Análisis filogenético e inferencias funcionales de CcNRT2.1 y CcNAR2

CcNRT2.1 perteneció al clado donde se ubicaron las familias de NRT2.1, 2.2 y 2.4, con excepción de SINRT2.3, ChmNRT2.3 y el ChmNRT2.6. Este clado se ubicó dentro de los eucariotes superiores, a diferencia de las familias NRT2.5 y NRT2.7, las cuales se ubicaron en un clado más cercano a procariontes y eucariotes inferiores.

Dentro de los miembros más cercanos a esta proteína, se encontró a SINRT2.1, SINRT2.2. Estos genes fueron aislados de una biblioteca de cDNA de pelos radicales y ambos fueron inducidos en la raíz por NO_3^- y se regularon por cambios diurnos (Ono *et al.*, 2000). Los otros dos miembros más cercanos pertenecen al género *Nicotiana*. NpNRT2.1 de *N. plumbaginifolia* es el miembro más cercano a CcNRT2.1 que ha sido caracterizado funcionalmente y se demostró que es un transportador de NO_3^- de alta afinidad que se expresa en la raíz y que es inducible por NO_3^- e inhibido por NH_4^+ (Fraisier *et al.*, 2000; Krapp *et al.*, 1998). De igual manera, NtNRT2.1 de *N. tabacum* fue expresado en raíz, especialmente en condiciones normales de N, y fue inducido por luz y por sacarosa.

Del resto de los miembros cercanos a CcNRT2.1 que pertenecen a las solanaceas un caso interesante resultó ser SINRT2.3, el cual también ha sido caracterizado funcionalmente. SINRT2.3 igualmente fue inducido en la raíz por NO_3^- , e inhibido por NH_4^+ pero no por glutamina (Hildebrandt *et al.*, 2002). Se demostró que SINRT2.3 se localiza en la membrana plasmática, y que la expresión del gen ocurrió en las células rhizodermal y del periciclo de la raíz. Además, también se expresó en flores, tallos y hoja. También, fue inducido por bajas (0.5 mM) y altas (5 mM) concentraciones de NO_3^- y los autores sugieren que SINRT2.3 tiene un papel dual, participando tanto en la toma de NO_3^- por la raíz como en el transporte a larga distancia (Abenavoli *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2015). Fu y colaboradores (2015), demostraron que SINRT2.3 se comportó como un transportador de NO_3^- de baja afinidad al expresarlo en oocitos de *Xenopus*. Sin embargo, estos autores sugieren que SINRT2.3 puede requerir a una proteína NAR2 para su función como transportador de alta afinidad, la cual no fue expresada en este sistema heterólogo. A diferencia de CcNRT2.1, que tiene una mayor identidad con AtNRT2.1, SINRT2.3 presentó mayor identidad con AtNRT2.4, el cual se expresa mayoritariamente en raíz, pero también en brotes (Kiba *et al.*, 2012; Lezhneva *et al.*, 2014).

Haciendo un resumen de las otras proteínas más estudiadas a nivel funcional que se ubican en el clado de CcNRT2.1 se destaca que AtNRT2.1, 2.2, 2.4 y 2.5, asociados a NAR2.1 (Kotur y Glass, 2012; Kotur *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2012) en *Arabidopsis*, CmNRT2.1 asociada con CmNAR2 en chrysanthemum (Gu *et al.*, 2016), TaNRT2.1 en trigo (Taulemesse *et al.*, 2015) y OsNRT2.1, OsNRT2.2 y su proteína compañera OsNAR2.1 en arroz (Feng *et al.*, 2011b; Liu *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2011) funcionan en el influjo de NO_3^- en la raíz como componentes principales de HATS. Sin embargo, aquellas proteínas que se ubicaron más lejanas evolutivamente a CcNRT2.1, como AtNRT2.7 y OsNRT2.3b, se ha reportado que son expresadas en la parte aérea (AtNRT2.7 en la semilla y OsNRT2.3b en los brotes) y que no interactúan con NAR2 (Chopin *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2011).

El análisis filogenético de las proteínas NAR2 muestra claramente una concordancia con la evolución de las especies. CcNAR2 se ubicó cercana a SINAR3.2 de tomate y a ChmNAR2 de *Crysanthemum* (Figura 2.2B). De estas proteínas, la más estudiada ha sido ChmNAR2, la cual se ha reportado que se localiza en toda la célula, e interacciona con CmNRT2 contribuyendo a la toma de NO_3^- en esta especie. Como se describió anteriormente, varios miembros de esta familia presentes en plantas cultivables, como OsNAR2.1 (Feng *et al.*,

2011; Liu *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2011) y HvNAR3 (Tong *et al.*, 2005) participan en los HATS.

De acuerdo a las cercanías evolutivas presentadas por CcNRT2.1 y por CcNAR2 en los árboles filogenéticos, se sugiere fuertemente que CcNRT2.1 es un transportador de NO_3^- de alta afinidad inducible por NO_3^- , que se localiza exclusiva o mayoritariamente en la raíz y que se asocia a CcNAR2 para llevar a cabo la función de transporte. Los análisis de interacción *in silico* (Figura 2.3) refuerzan esta sugerencia.

De igual manera, los análisis a partir de la estructura 3-D parecen inferir que CcNRT2.1 pudiera transportar NO_3^- de una manera similar a como lo hace AtNRT2.1, aunque se observaron distancias ligeramente menores en CcNRT2.1 entre el NO_3^- y los residuos de R115 y R332, así como el motivo de reconocimiento del sustrato. El efecto que estos cambios en las distancias pudieran tener sobre la afinidad del transportador por NO_3^- y su eficiencia en el transporte, aún queda por esclarecerse.

El estudio de la estructura tridimensional de CcNRT2.1 indicó que ésta adopta una organización topológica típica de los MFS, con 12 hélices transmembranales con un pseudo eje doble que relaciona el dominio amino terminal (HTM1-6) con el dominio carboxilo terminal (HTM7-12) (Sun *et al.*, 2014). Esta arquitectura estructural les permite transportar el sustrato de diferentes maneras a través de un mecanismo de interruptor basculante en el que los transportadores pueden orientarse hacia fuera, ocluidos y hacia adentro (Dang *et al.*, 2010, Solcan *et al.*, 2012).

Análisis de expresión

CcNRT2.1 se expresó exclusivamente en las raíces de chile habanero (Figura 2.8), lo cual coincide con lo reportado para AtNRT2.1 (Filleur y Daniel-Vedele, 1999; Filleur *et al.*, 2001). En cambio, *CcNAR2* se expresó mayormente en la raíz y ligeramente en flor y pericarpio (Figura 2.8). Hasta nuestro conocimiento, la presencia de proteínas NAR2 no ha sido identificada en fruto. Una explicación es que ella participe en el transporte de NO_3^- en conjunto con otro tipo de NRT2 de chile habanero, el cual participe en este proceso en el fruto. En Arabidopsis, sólo se ha detectado el AtNRT2.7 y en menor cantidad al AtNRT2.5 en el fruto (Chopin *et al.*, 2007).

Haciendo una búsqueda en el genoma de chile habanero (Kim *et al.*, 2017), para detectar posibles ortólogos de estos genes en esta especie, se logró identificar una proteína

(PHU28624.1) que presentó una identidad del 60.69% con AtNRT2.5 y otra (PHU25562.1) con un 63.60% de identidad con AtNRT2.7. Queda por demostrar si estas proteínas se encuentran en este órgano y si son capaces de interactuar con CcNAR2. Es necesario mencionar, que AtNRT2.7 es la única de las siete proteínas de *Arabidopsis* que no requiere interacción con NAR2 en esta especie y que se localiza en el tonoplasto en lugar de la membrana plasmática (Kotur *et al.*, 2012) por lo que éste no sería el mejor candidato para explicar la presencia de NAR2 en el fruto aunque se tendría que confirmar si el ortólogo en Chile tampoco requiere de su interacción con NAR2.

Otra explicación es que CcNAR2 se encuentre involucrada en otro proceso en este órgano, independiente del de toma de NO_3^- de alta afinidad. Por ejemplo, se ha demostrado que AtNAR2.1 regula el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis* únicamente en condiciones de baja cantidad de NO_3^- y de una manera independiente a la toma de NO_3^- (Orsel *et al.*, 2006; 2007). La presencia de elementos regulados por NO_3^- en el promotor *OsNAR2.1* que no se encuentran en los genes *OsNRT2* (Feng *et al.*, 2011a) condujo a pensar que *OsNAR2.1* podría funcionar como el sensor directo de NO_3^- en lugar de los *OsNRT2s* (Feng *et al.*, 2011b). Sin embargo, dado que no se ha confirmado un dominio responsable del sensado de NO_3^- en las proteínas NRT2, como ya se conoce para las proteínas NRT1 (Ho *et al.*, 2009), es muy difícil en estos momentos que se pueda determinar cuál de las dos proteínas podría estar funcionando como el sensor de NO_3^- .

También, se ha reportado que las proteínas NAR2 se activan en respuesta a herida (Titarenko *et al.*, 1997) y a ataques por patógenos (Marois *et al.*, 2002). Sería muy interesante estudiar el papel de CcNAR2 en el fruto, desde esta perspectiva.

Los análisis de western blot revelan que al menos cuatro formas de CcNRT2.1, detectadas con anti-4557, se encuentran en la fracción citosólica: tres formas principalmente detectadas de ~74 y ~66 y ~60 kDa y una forma mucho menos abundantes de ~57 kDa (Figura 3.3). Esto sugiere que, en el citosol, CcNRT2.1 pudiera estar formando parte de un complejo de dos proteínas.

Cabe señalar que en la literatura no hay reportes de resultados obtenidos para extracto citosólico, ya que lo único que se ha presentado son resultados usando extracto total y membranal. Por lo tanto estos resultados resultan ser innovadores y de gran importancia, ya que nos brindan un conocimiento más amplio sobre estas proteínas y su regulación. De igual manera en análisis realizados *in silico* se predice que este tipo de proteínas, a pesar de su estructura hidrofóbica, pudieran localizarse en el citosol (von Wittgenstein *et al.*,

2014). Otro trabajo que demuestra que proteínas que poseen 12 dominios transmembranales y que por lo tanto son proteínas hidrofóbicas, pudieran estarse localizando en el citosol, es el realizado por Bouguyon y colaboradores, (2015). En este trabajo demostraron que la proteína hidrofóbica NRT1.1 de *Arabidopsis thaliana* se puede localizar en el citosol, esto debido a propiedades intrínsecas de la proteína.

Los resultados obtenidos en la inmunodetección indican que en la fracción membranal existen al menos seis formas de CcNRT2.1: cuatro formas principales de ~80, ~50, ~30 y ~20 kDa y dos formas menos abundantes de ~220 y ~40 kDa (Figura 3.7). Las proteínas de este tipo, debido a su naturaleza hidrofóbica, pueden presentar una masa molecular de menor tamaño tal como se ha reportado para transportadores de azúcares (Schneidereit *et al.*, 2003), NH_4^+ (Loqué *et al.*, 2006) y otros transportadores de NO_3^- (Guo *et al.*, 2001; Liu y Tsay, 2003); en los que en todos los experimentos de western blot presentan una masa molecular menor a la predicha (Wirth *et al.*, 2007). Por lo que sugerimos que la banda de ~50 kDa es la correspondiente a la forma monomérica de CcNRT2.1.

Esto indica, al igual que en citosol, que CcNRT2.1 pudiera estar formando parte de un complejo de dos ó más proteínas, que a su vez pudieran formar dímeros, trímeros ó tetrameros. La proteína candidata más obvia posiblemente involucrada en la formación del complejo con CcNRT2.1, es CcNAR2. Estudios han demostrado que en *Arabidopsis*, así como en *Chlamydomonas reinhardtii* y cebada, NRT2.1 necesita interactuar con la proteína NAR2.1 para ser funcional (Orsel *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2000, Okamoto *et al.*, 2006, Quesada y Fernandez, 1994).

Orsel y colaboradores (2006), demostraron que la interacción entre NRT2.1 y NAR2.1 ocurre a nivel de proteína. Estos datos claramente sugieren que NAR2.1 está involucrado en una interacción proteína-proteína con NRT2.1, por lo que las bandas de mayor masa molecular detectadas en los western blots, pudieran ser el resultado del complejo entre estas dos proteínas.

Los resultados obtenidos en las inmunodetecciones indican que el anticuerpo reconoce bandas de mayor masa molecular (Figura 3.3), lo cual sugiere que CcNRT2.1 esta formando parte de un complejo con otras proteínas y que evidentemente el dodecil sulfato de sodio (SDS) usado en la electroforesis no es suficiente para romper estos complejos que se encuentran en la membrana. Este fenómeno no es extraño para las proteínas integrales de membrana, como lo son las NRT2, que son fuertemente hidrofóbicas debido a la topología

estructural que presenta (12 dominios transmembranales) (Orsel *et al.*, 2002). Para estudiar este tipo de proteínas el uso de detergentes es de gran importancia (Bordier, 1981; le Maire *et al.*, 2000; Garavito y Ferguson-Miller, 2001; Seddon *et al.*, 2004; González de la Vara y Lino Alfaro, 2009).

Los detergentes son una clase de compuestos caracterizados por su estructura anfifílica, es decir que poseen un extremo hidrofílico (cabeza) y otro extremo hidrofóbico (cola) (Garavito y Ferguson-Miller, 2001). Existen tres tipos: iónicos, no iónicos y zwitteriónicos. Los detergentes iónicos contienen cabezas con cargas positivas (catiónicas) o cargas negativas (aniónicas) (Allen *et al.*, 2004; Sehgal *et al.*, 2005). Los no iónicos presentan una cabeza hidrofílica no cargada (Seddon *et al.*, 2004; le Maire *et al.*, 2000) y los del tipo zwitteriónico contienen cabezas con grupos cargados tanto de manera positiva como de manera negativa (Zhou *et al.*, 2001; Shultis *et al.*, 2006).

Los western blot utilizando diferentes detergentes indican que hubo una liberación de bandas con menor masa molecular, pero que sin embargo aún quedaron complejos en la membrana sin liberar (Figuras 3.5-3.7). Esto confirma que este tipo de proteínas son muy difíciles de aislar. De igual manera el anticuerpo detectó una banda de ~20 kDa en el extracto membranal de raíz (Figura 3.3), sugiriendo que CcNRT2.1 pudiera estar sufriendo una proteólisis cuando se encuentra en la membrana plasmática; tal y como se han reportado para AtNRT2.1 (Wirth *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en el experimento de inmunolocalización indican que CcNRT2.1 se localiza en la membrana plasmática de células de epidermis y corteza de raíces de chile habanero (Figura 3.10). Esto es de gran importancia, ya que como se ha mencionado anteriormente, estas proteínas NRT2 se localizan predominantemente en la membrana plasmática de células de la epidermis y de corteza y requieren de la proteína NAR2 para que puedan ser funcionales (Wirth *et al.*, 2007; Chopin *et al.*, 2007; Bertoni, 2012).

La presencia de una banda de ~58-60 kDa exclusiva en los extractos proteicos de raíz (Figura 3.8), la cual coincide con el tamaño esperado para CcNRT2.1, sugiere fuertemente que esta proteína está presente en este órgano en chile habanero. En estos extractos, también fue detectada una banda de ~80 kDa; dado que la masa molecular de CcNAR2 es de ~25 kDa, nosotros sugerimos que esta banda inmunodetectada en la raíz puede ser el dímero formado por CcNRT2.1/CcNAR2.

La presencia de bandas con esa misma masa molecular en geles de poliacrilamidas, indicando esta dimerización, fue previamente reportada en una inmunodetección usando

un anticuerpo anti-AtNRT2.1, aunque se sugirió que la forma monomérica fue la más relevante en el transporte (Wirth *et al.*, 2007). La presencia de un oligomero de 150 kDa ha sido detectada también en geles de poliacrilamidas, que al caracterizarlo coincidió con un tetramero formado por dos proteínas AtNRT2.1 y dos proteínas AtNAR2.1 (Yong *et al.*, 2010). Estos autores sugieren que este oligómero es el más activo en la toma de NO_3^- . Además, se ha demostrado la interacción de estas proteínas en ensayos *in vivo*, como por ejemplo para AtNRT2.1 y AtNAR2.1 de *Arabidopsis* (Orsel *et al.*, 2006), OsNRT2.1, 2.2 y 2.3a y OsNAR2.1 en arroz (Yan *et al.*, 2011), HvNRT2.1 y HvNAR2.3 en cebada (Ishikawa *et al.*, 2009) y CmNRT2.1 y CmNAR2 en *chrysanthemum* (Gu *et al.*, 2016), proteínas cercanas filogenéticamente a las de chile habanero (Figura 2.2).

A partir de los resultados de inmunodetección hipotetizamos que tanto la forma monomérica CcNRT2.1 como el dímero CcNRT2.1/CcNAR2 pudieran llevar a cabo el transporte de NO_3^- de alta afinidad en la raíz de chile habanero y que al parecer estas formas coexisten en igual proporción en la raíz (Figura 3.8). Dado que la forma tetramérica no fue inmunodetectada, se sugiere que ésta no es relevante en la raíz de chile habanero para mediar la toma de NO_3^- de alta afinidad, bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo.

La inducibilidad de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* por bajas concentraciones de NO_3^- (Figura 2.13), por el ciclo diurno (Figura 2.8) y por sacarosa (Figura 2.11) soporta que CcNRT2.1 es un homólogo funcional a AtNRT2.1, participando en el sistema de transporte de alta afinidad inducible por NO_3^- en chile habanero (Orsel *et al.*, 2004), al igual que NpNRT2.1 en *N. plumbaginifolia* (Fraisier *et al.*, 2000) y CmNRT2.1 en *chrysanthemum* (Gu *et al.*, 2014; 2016). Sin embargo, la inducción por NH_4^+ y por glutamato que presentaron ambos genes de chile habanero es un comportamiento poco frecuente. Por el contrario, se ha reportado que varios miembros de la familia NRT2 y NAR2 son reprimidos por NH_4^+ y por metabolitos reducidos de N como aminoácidos, tal como AtNRT2.1/2.2 y OsNRT2.1 (Feng *et al.*, 2011b), incluyendo miembros de la familia de las solanaceas como NpNRT2.1 (Quesada *et al.*, 1997). CmNRT2, muy cercano evolutivamente a CcNRT2.1 (Figura 2.2A), también fue inducido por NH_4^+ , no así CmNAR2 (Gu *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que la regulación (inducción/represión) por NH_4^+ de NRT2 y NAR2 es dependiente del gen y de la especie. De igual manera, la inducción para estas fuentes de N fue dependiente del tiempo de exposición. Estas especificidades de acuerdo al tipo de transportador y a la especie

resultan muy interesante para estudiar, dado el efecto que éstos tienen en la eficiencia en el uso de N por los cultivos.

Se sabe que los metabolitos del carbono (C) son moléculas señales importantes que activan varios pasos regulatorios en la vía de asimilación del NO_3^- (Lam *et al.*, 1996), incluyendo la toma de este nutriente por las raíces. En muchos casos, los azúcares ejercen efectos complementarios al NO_3^- en la expresión de genes. Estos compuestos inducen a los genes *NRT1*, *NRT2*, *NIA*, *GLN1*, piruvato cinasa, *PPC* y *ICDH1* (Lejay *et al.*, 1999; Koch, 1996; Jang y Sheen, 1997) y estimula la activación postraducciona de *NIA* (Crawford, 1995; Sivasankar *et al.*, 1997; Morcuende *et al.*, 1998). Altos niveles de sacarosa estimulan la conversión de NO_3^- a glutamina, específicamente, la conversión de glicerol-3-fosfato (el primer producto de la fotosíntesis) a α -oxoglutarato (MacKintosh, 1998). Cuando los niveles de los azúcares son bajos, éstos inducen una fuerte regulación negativa de la expresión de *NIA*, que apaga las señales derivadas del metabolismo del N (Matt *et al.*, 1998). Estudios llevados a cabo en *Arabidopsis* soportan la hipótesis de que la coordinación de la toma de NO_3^- con la fotosíntesis es, al menos en parte, mediada a nivel transcripcional por los transportadores de NO_3^- de las raíces, los cuales, a su vez, son regulados por los metabolitos del C (Lejay *et al.*, 1999). Como la absorción y uso del NO_3^- son altamente regulados por la luz y el suministro de carbono; la expresión de diversos transportadores de NO_3^- es también regulada por el ritmo circadiano y potenciado por la presencia de azúcares en el medio de cultivo (Chen *et al.*, 2016b; Feng *et al.*, 2011b; Lejay *et al.*, 1999). De igual manera, resulta interesante el reporte de una secuencia de 150 pb en el promotor de *AtNRT2.1* donde co-localizan elementos en *cis* responsables para la estimulación por NO_3^- , represión por metabolitos de N y estimulación por azúcar de la expresión de *AtNRT2.1* (Girin *et al.*, 2007).

CcNRT2.1/CcNAR2 HATS putativo en raíces de chile habanero

Los datos descritos anteriormente, así como la colocalización de la expresión de *CcNRT2.1* y *CcNAR2* principalmente en la zona de la raíz primaria comprendida entre los 2 y 4 cm a partir del ápice (Figura 2.14), brindan evidencias de que ambas proteínas están involucradas en un iHATS que funciona en la absorción de NO_3^- en la raíz de chile habanero. La correlación de estos resultados con la actividad de transporte de NO_3^-

(Figuras 2.15, 3.11-3.13) y la localización de CcNRT2.1 en las células epidérmicas y corticales (Figura 3.10) en la misma zona de la raíz sustentan esta hipótesis.

Los datos de toma de NO_3^- de alta afinidad a lo largo de la raíz primaria de chile habanero, evaluado a través de los contenidos endógenos de NO_3^- (Figura 3.12), la alcalinización del medio usando el fluoróforo sensible a pH Oregon Green 488 (Figura 2.15), y el influjo de H^+ por la técnica MIFE (Figura 3.13), parecen indicar fuertemente que la Z2 de la raíz es la que más contribuye a este proceso. Este resultado no concuerda con los datos de absorción neta, donde las Z1 y Z2 fueron las de mayor y menor valor, respectivamente (Figura 3.11). Nosotros sugerimos que esta discrepancia puede ser explicada debido a que en la Z2 también pudiera estar ocurriendo un eflujo de NO_3^- mayor que en el resto de las zonas. El eflujo de NO_3^- en la raíz es un componente de la toma neta de NO_3^- y puede aún exceder el influjo en respuesta a varios estreses. Este comportamiento fue detectado previamente en las raíces de chile habanero (Santiago-Antonio *et al.*, 2014), indicando como una de las posibles causas para la inducción del eflujo de NO_3^- , el aumento en la concentración citosólica de este nutriente debido a su removilización desde la vacuola cuando las plántulas se sometieron a un déficit de N. En nuestro caso, un mayor influjo de NO_3^- en la Z2, como lo reflejan las tres metodologías descritas en un principio, podría inducir una acumulación transitoria de NO_3^- en el citosol, la cual exceda la capacidad para su asimilación o almacenamiento, y por lo tanto active el eflujo del mismo hacia el medio exterior en esta zona. En *Arabidopsis*, se ha identificado al transportador de excreción de baja afinidad de NO_3^- 1 (NAXT1) como el responsable de este proceso (Segonzac *et al.*, 2007), pero se desconoce si otro transportador o canales aniónicos estarían participando en el eflujo de NO_3^- en la raíz y cuál sería su papel fisiológico en las plantas estresadas y normales. Usando la secuencia de NAXT1 hicimos una búsqueda en el genoma de chile habanero recientemente reportado (Kim *et al.*, 2017), y nos arrojó la presencia de una secuencia con una identidad de 51.38% al de NAXT1 de *Arabidopsis*, lo cual podría soportar la presencia de este tipo de transportador de eflujo en chile habanero, siendo interesante el estudio del mismo bajo estas condiciones.

Interesantemente, se ha descubierto que los transportadores AtNRT2.1 (Remans *et al.*, 2006) y OsNRT2.1 (Huang *et al.*, 2015) también juegan un papel funcional en la regulación de la arquitectura radical dependiente de las condiciones de N, por lo que sería importante explorar esta función adicional en CcNRT2.1, teniendo en cuenta las condiciones limitantes de N en las que crece el cultivo de chile habanero. Nosotros, hemos reportado que la

arquitectura de la raíz de chile habanero se regula por condiciones heterogéneas de NO_3^- en el medio (Celis-Arámburo *et al.*, 2011).

5.1. CONCLUSIONES

1. Mediante análisis *in silico* se determinó que CcNRT2.1 presenta una topología con 12 dominios transmembranales y se localiza en la membrana plasmática; tal y como se espera para este tipo de proteínas y que presenta las firmas y dominios característicos de este tipo de proteínas.

2. CcNAR2 presentó una topología con un péptido señal del aminoácido 1 al 20 y un dominio transmembranal ubicado cercano al extremo C-terminal. Los análisis bioinformáticos indicaron que presenta las firmas y dominios característicos para este tipo de proteínas.

3. Se estableció, a través de análisis *in silico* que CcNRT2.1 interacciona con proteínas del tipo NAR2 así como con otras proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, como la nitrato reductasa y la nitrito reductasa.

4. El análisis filogenético determinó que CcNRT2.1 tiene un ancestro común a partir de las bacterias y presenta un origen monofilético a partir de las clorófitas; se localiza dentro del grupo de las proteínas del tipo NRT2.1, 2.2 y 2.4, se encuentra dentro del clado de la familia de las solanáceas y que por la ubicación en el árbol filogenético ésta presenta mayor parecido con las proteínas NRT2 localizadas en la parte radicular que de aquellas que se encuentran en la parte aérea, como el caso de las proteínas del tipo NRT2.7.

5. Los análisis filogenéticos indican que las proteínas del tipo NRT2.5 y NRT2.7 de monocotiledóneas y eudicotiledóneas surgen a partir de un evento de duplicación de genes.

6. En el análisis filogenético CcNAR2 se localizó en el mismo clado que las proteínas de solanáceas.

7. La estructura tridimensional de CcNRT2.1 presentó la topología característica de las proteínas NRT2 conformado por 12 hélices transmembranales divididas por un loop citosólico largo, con los residuos de arginina R115 y R332, posicionados a 2.3 Å y 4.7 Å respectivamente de distancia de la molécula de NO₃⁻.

8. La estructura tridimensional de CcNAR2 indicó que esta proteína no tiene una estructura tridimensional ordenada, únicamente presenta estructuras secundarias alfa hélices y beta plegadas.

9. Los transcritos de *CcNRT2.1* se localizan exclusivamente en raíces. Los transcritos de *CcNAR2* se localiza principalmente en la raíz, aunque se observó una ligera señal en flor y pericarpio.

10. Los niveles de transcritos de *CcNAR2* se regulan por luz y oscuridad, presentando un mayor nivel de expresión en presencia de luz. También, se regulan por la fuente de nitrógeno, principalmente por NO_3^- , siendo esta regulación dependiente del tiempo de exposición (tiempos cortos) y de la dosis (mayoritariamente a concentraciones micromolares).

11. *CcNRT2.1* y *CcNAR2* se localizan en la raíz, específicamente en los 2-4 cm por encima del ápice de la raíz primaria. De acuerdo a los resultados de microscopía confocal y de la técnica MIFE, esta zona parece ser la de mayor absorción de NO_3^- a lo largo de la raíz primaria de chile habanero.

12. El anticuerpo contra CcNRT2.1 reconoció bandas de proteínas específicas en extractos proteicos de raíz de chile habanero y no de hojas.

13. Los análisis de western blot parecen indicar la presencia de diferentes complejos proteicos en los que participa CcNRT2.1, dado por la presencia de bandas de proteínas de diferentes tamaños moleculares y por los resultados obtenidos en los tratamientos con detergentes.

14. CcNRT2.1 se localiza en membrana plasmática de células epidérmicas y de corteza de la raíz.

5.2. PERSPECTIVAS

Los datos presentados en esta tesis sugieren que CcNRT2.1 y CcNAR2 actúan en conjunto formando un sistema de transporte de NO_3^- de alta afinidad que participan en este proceso en la raíz de chile habanero. Por ello, como perspectivas a corto plazo se propone: determinar la función de CcNRT2.1 como proteína transportadora de NO_3^- de alta afinidad a través de su expresión en un sistema heterólogo y determinar la interacción física y funcional de CcNRT2.1 con CcNAR2. Sería novedoso además, estudiar los posibles dominios responsables de esta interacción en cada proteína, lo cual aún no se conoce.

A largo plazo, es importante estudiar la función biológica de este sistema de transporte de NO_3^- de alta afinidad en chile habanero. Obtener mutantes de chile habanero que presenten defectos en estas proteínas y evaluar su fenotipo bajo diferentes condiciones, como son concentración de NO_3^- y condiciones diferenciales de luz que modifiquen el balance C/N de la planta, sería muy importante.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar, N., Karabika, E., Kinghorn, J. R., Glass, A. D. M., Unkles, S. E., & Rouch, D. A. (2015). High-affinity nitrate/nitrite transporters NrtA and NrtB of *Aspergillus nidulans* exhibit high specificity and different inhibitor sensitivity. *Microbiology (Reading, England)*, 161(7), 1435–1446. doi.org/10.1099/mic.0.000088
- Abenavoli, M. R., Longo, C., Lupini, A., Miller, A. J., Araniti, F., Mercati, F., Princi, M. P., & Sunseri, F. (2016). Phenotyping two tomato genotypes with different nitrogen use efficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 21–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.021>
- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C., & Truong, H. N. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 28(4), 500–512. doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01292.x
- Allen, S. J., Curran, A. R., Templer, R. H., Meijberg, W., & Booth, P. J. (2004). Folding Kinetics of an α Helical Membrane Protein in Phospholipid Bilayer Vesicles. *Journal of Molecular Biology*, 342(4), 1279–1291. doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.040
- Almagro, A., Lin, S. H., & Tsay, Y. F. (2008). Characterization of the *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *The Plant Cell*, 20(12), 328-3299. www.plantcell.org/content/20/12/3289.abstract
- Anjana, A., Umar, S., & Iqbal, M. (2007). Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 2007, 27 (1), pp.45-57. doi.org/10.1051/agro:2006021 (Vol. 27).
- Araki, R., & Hasegawa, H. (2006). Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High-Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction. *Breeding Science* (Vol. 56). doi.org/10.1270/jsbbs.56.295

- Aslam, M., Travis, R. L., & Huffaker, R. C. (1994). Stimulation of Nitrate and Nitrite Efflux by Ammonium in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. *Plant Physiology*, *106*(4), 1293-1301. www.plantphysiol.org/content/106/4/1293.abstract
- Aslam, M., Travis, R. L., & Rains, D. W. (1996). Evidence for Substrate Induction of a Nitrate Efflux System in Barley Roots. *Plant Physiology*, *112*(3), 1167-1175. www.plantphysiol.org/content/112/3/1167.abstract
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W., & Huffaker, R. C. (2018). Effect of root perturbation and excision on nitrate influx and efflux in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, *97*(3), 425–432. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00499.x
- Ávila, J., González, C., Brito, N., Machín Félix, M., Pérez, D., & Siverio, J. M. (2002). A second Zn(II)2Cys6 transcriptional factor encoded by the YNA2 gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, *19*(6), 537–544. doi.org/10.1002/yea.847
- Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J. M., Gambale, F., Thomine, S., & Wege, S. (2011). Anion Channels/Transporters in Plants: From Molecular Bases to Regulatory Networks. *Annual Review of Plant Biology*, *62*(1), 25–51. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103741
- Bertoni, G. (2012). A Nitrate Transporter for Both Roots and Shoots. *The Plant Cell*, *24*(1), 1-1. www.plantcell.org/content/24/1/1.abstract
- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., Lacombe, B., Krouk, G., Guiderdoni, E., Zažímalová, E., Hoyerová, K., Nacry, P., & Gojon, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transceptor NRT1.1. *Nature Plants*, *1*, 15015. doi.org/10.1038/nplants.2015.15
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(4), 1604–1607. www.jbc.org/content/256/4/1604.abstract

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248–254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmölling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, *44*(2), 314–333. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02530.x
- Brito, N., Avila, J., Perez, M. D., Gonzalez, C., & Siverio, J. M. (1996). The genes YNI1 and YNR1, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha*, are clustered and co-ordinately regulated. *The Biochemical Journal*, *317* (Pt 1(Pt 1), 89–95. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8694791
- Brownlee, A. G., & Arst, H. N. (1983). Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *Journal of Bacteriology*, *155*(3), 1138-1146. jb.asm.org/content/155/3/1138.abstract
- Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1983). An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *Journal of General Microbiology*, *129*(4), 965–971. doi.org/10.1099/00221287-129-4-965
- Cai, C., Wang, J. Y., Zhu, Y. G., Shen, Q. R., Li, B., Tong, Y. P., & Li, Z. S. (2008). Gene Structure and Expression of the High-affinity Nitrate Transport System in Rice Roots. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(4), 443–451. doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00642.x
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). *The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle*. *Science (New York, N.Y.)* (Vol. 330). doi.org/10.1126/science.1186120
- Celis-Arámburo, T. de J., Carrillo-Pech, M., Castro-Concha, L. A., Miranda-Ham, M. de L., Martínez-Estévez, M., & Echevarría-Machado, I. (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant*

Physiology and Biochemistry, 49(12), 1456–1464.
doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.09.003

Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Muños, S., Daniel-Vedele, F., & Gojon, A. (2001). Major Alterations of the Regulation of Root NO₃⁻ Uptake Are Associated with the Mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 Genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 127(1), 262-271.
www.plantphysiol.org/content/127/1/262.abstract

Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009). Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 265–285. doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134148

Charrier, A., Bérard, J. B., Bougaran, G., Carrier, G., Lukomska, E., Schreiber, N., Fournier, F., Charrier, A. F., Rouxel, C., Garnier, M., Cadoret, J. P., & Saint-Jean, B. (2015). High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (Nrt2) in *Tisochrysis lutea*: identification and expression analyses reveal some interesting specificities of Haptophyta microalgae. *Physiologia Plantarum*, 154(4), 572–590.
https://doi.org/10.1111/ppl.12330

Chen, X., Yao, Q., Gao, X., Jiang, C., Harberd, N. P., & Fu, X. (2016b). Shoot-to-Root Mobile Transcription Factor HY5 Coordinates Plant Carbon and Nitrogen Acquisition. *Current Biology*, 26(5), 640–646. doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.066

Cheng, H., Deng, W., Wang, Y., Ren, J., Liu, Z., & Xue, Y. (2014). dbPPT: a comprehensive database of protein phosphorylation in plants. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014, bau121. doi.org/10.1093/database/bau121

Chiu, C. C., Lin, C. S., Hsia, A. P., Su, R. C., Lin, H. L., & Tsay, Y. F. (2004). Mutation of a Nitrate Transporter, AtNRT1:4, Results in a Reduced Petiole Nitrate Content and Altered Leaf Development. *Plant and Cell Physiology*, 45(9), 1139–1148.
dx.doi.org/10.1093/pcp/pch143

Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M. F., Chardon, F., Truong, H. N., Miller, A. J., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F. (2007). The Arabidopsis ATNRT2.7 Nitrate Transporter Controls

- Nitrate Content in Seeds. *The Plant Cell*, 19(5), 1590-1602. www.plantcell.org/content/19/5/1590.abstract
- Chopin, F., Wirth, J., Dorbe, M. F., Lejay, L., Krapp, A., Gojon, A., & Daniel-Vedele, F. (2007). The Arabidopsis nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 630–635. doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.007
- Cooper, H. D., & Clarkson, D. T. (1989). Cycling of Amino-Nitrogen and other Nutrients between Shoots and Roots in Cereals- A Possible Mechanism Integrating Shoot and Root in the Regulation of Nutrient Uptake. *Journal of Experimental Botany*, 40(216), 753–762. www.jstor.org/stable/23692332
- Crawford, N. M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*, 7(7), 859-868. www.plantcell.org/content/7/7/859.abstract
- Crawford, N. M., & Arst, H. N. (1993). The Molecular Genetics of Nitrate Assimilation in Fungi and Plants. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 115–146. doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.000555
- Crawford, N. M., & Forde, B. G. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis Book*, 1, e0011. doi.org/10.1199/tab.0011
- Crawford, N. M., & Glass, A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3(10), 389–395. [doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01311-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01311-9)
- Dang, S., Sun, L., Huang, Y., Lu, F., Liu, Y., Gong, H., Wang, J., & Yan, N. (2010). Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature*, 467, 734. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature09406>
- Daniel-Vedele, F., Filleur, S., & Caboche, M. (1998). Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 235–239. [doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80110-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80110-6)

- David LC, Berquin P, Kanno Y, Seo M, Daniel-Vedele F, Ferrario-Méry S (2016) N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in Arabidopsis. *Planta* 244(6): 1315–1328
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomine, S., Gambale, F., & Barbier-Brygoo, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 442, 939. doi.org/10.1038/nature05013
- Dechorgnat, J., Nguyen, C. T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S., & Daniel-Vedele, F. (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1349–1359. dx.doi.org/10.1093/jxb/erq409
- Eddy, A. A., & Hopkins, P. G. (1985). The putative electrogenic nitrate-proton symport of the yeast *Candida utilis*. Comparison with the systems absorbing glucose or lactate. *The Biochemical Journal*, 231(2), 291–297. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2998345
- Engelsberger, W. R., & Schulze, W.X. (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved Arabidopsis seedlings. *Plant Journal*, 69(6), 978–995
- Fan, S. C., Lin, C. S., Hsu, P. K., Lin, S. H., & Tsay, Y. F. (2009). The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *The Plant Cell*, 21(9), 2750-2761. www.plantcell.org/content/21/9/2750.abstract
- Fan, X., Tang, Z., Tan, Y., Zhang, Y., Luo, B., Yang, M., [Lian X.](#), [Shen Q.](#), [Miller A. J.](#), & Xu, G. (2016). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 113). doi.org/10.1073/pnas.1525184113
- Fan, X., Naz, M., Fan, X., Xu, G., Xuan, W., & Miller, A. J. (2017). Plant nitrate transporters: from gene function to application. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2463–2475. doi:10.1093/jxb/erx011

-
- FAO, 2015. World fertilizer trends and outlook to 2018. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791. doi.org/10.2307/2408678
- Feng, H., Fan, X., Yan, M., Liu, X., Miller, A. J., & Xu, G. (2011a). Multiple roles of nitrate transport accessory protein NAR2 in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(9), 1286–1289. doi:10.4161/psb.6.9.16377
- Feng, H., Yan, M., Fan, X., Li, B., Shen, Q., Miller, A. J., & Xu, G. (2011b). Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), 2319–2332. dx.doi.org/10.1093/jxb/erq403
- Fernandez, E., & Galvan, A. (2008). Nitrate Assimilation in Chlamydomonas. *Eukaryotic Cell*, 7(4), 555-559. ec.asm.org/content/7/4/555.abstract
- Fernandez, E., & Galvan, A. (2007). Inorganic nitrogen assimilation in Chlamydomonas. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2279–2287. dx.doi.org/10.1093/jxb/erm106
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340, 245. doi.org/10.1038/340245a0
- Filleur, S., & Daniel-Vedele, F. (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from Arabidopsis thaliana by differential display. *Planta*, 207(3), 461–469. doi.org/10.1007/s004250050505
- Filleur, S., Dorbe, M. F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., & Daniel-Vedele, F. (2001). An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters*, 489(2–3), 220–224. doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02096-8
- Forde, B. G. (2002). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 203–224. doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135256

- Forde, B. G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1), 219–235. doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00140-1
- Forde, B. G., & Clarkson, D. T. (1999). Nitrate and Ammonium Nutrition of Plants: Physiological and Molecular Perspectives. In J. A. B. T.-A. in B. R. Callow (Ed.) (Vol. 30, pp. 1–90). Academic Press. doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60226-8
- Fu, Y., Yi, H., Bao, J., & Gong, J. (2015). LeNRT2.3 functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato. *FEBS Letters*, 589(10), 1072–1079. doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.016
- Fraisier, V., Gojon, A., Tillard, P., & Daniel-Vedele, F. (2000). Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *The Plant Journal*, 23(4), 489–496. doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00813.x
- Galván, A., & Fernández, E. (2001). Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(2), 225–233. doi.org/10.1007/PL00000850
- Galván, A., Quesada, A., & Fernández, E. (1996). Nitrate and Nitrite Are Transported by Different Specific Transport Systems and by a Bispecific Transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2088–2092. doi.org/10.1074/jbc.271.4.2088
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., & Forde, B. G. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 222(4), 730. doi.org/10.1007/s00425-005-0020-3

- Gansel, X., Muños, S., Tillard, P., & Gojon, A. (2001). Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal*, 26(2), 143–155. doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01016.x
- Garavito, R. M., & Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 32403–32406. doi.org/10.1074/jbc.R100031200
- Ginalski, K., & Rychlewski, L. (2003). Protein structure prediction of CASP5 comparative modeling and fold recognition targets using consensus alignment approach and 3D assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(S6), 410–417. doi.org/10.1002/prot.10548
- Girin, T., Lejay, L., Wirth, J., Widiez, T., Palenchar, P. M., Nazoa, P., Touraine, B., Gojon, A., & Lepetit, M. (2007). Identification of a 150 bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant, Cell & Environment*, 30(11), 1366–1380. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01712.x
- Girin, T., El-Kafafi, E. S., Widiez, T., Erban, A., Hubberten, H. M., Kopka, J., Rainer, H., Gojon, A., & Lepetit, M. (2010). Identification of Arabidopsis Mutants Impaired in the Systemic Regulation of Root Nitrate Uptake by the Nitrogen Status of the Plant. *Plant Physiology*, 153(3), 1250-1260. www.plantphysiol.org/content/153/3/1250.abstract
- Glass, A., & Siddiqi, M. Y. (1995). Nitrogen absorption by plant roots. In H. S. Srivastava & R. P. Singh (Eds.), *Nitrogen Nutrition in Higher Plants* (pp. 21-56). New Delhi: Associated Publishing Company.
- Gojon, A., Nacry, P., & Davidian, J. C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 328–338. doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.015

- González de la Vara, L. E., & Alfaro, B. L. (2009). Separation of membrane proteins according to their hydrophathy by serial phase partitioning with Triton X-114. *Analytical Biochemistry*, *387*(2), 280–286. doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.035
- Gu, C., Song, A., Zhang, X., Wang, H., Li, T., Chen, Y., Jiang, J., Chen, F., & Chen, S. (2016). Cloning of chrysanthemum high- affinity nitrate transporter family (CmNRT2) and characterization of CmNRT2.1. *Scientific Reports* (Vol. 6). doi.org/10.1038/srep23462
- Gu, C., Zhang, X., Jiang, J., Guan, Z., Zhao, S., Fang, W., Liao Y., Chen S. & Chen, F. (2014). Chrysanthemum CmNAR2 interacts with CmNRT2 in the control of nitrate uptake. *Scientific Reports*, *4*, 5833. doi.org/10.1038/srep05833
- Guan, P. (2017). Dancing with Hormones: A Current Perspective of Nitrate Signaling and Regulation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1697. doi.org/10.3389/fpls.2017.01697
- Guo, F. Q., Wang, R., Chen, M., & Crawford, N. M. (2001). The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell*, *13*(8), 1761–1777. doi.org/10.1105/TPC.010126
- Henriksen, G. H., Raman, D. R., Walker, L. P., & Spanswick, R. M. (1992). Measurement of Net Fluxes of Ammonium and Nitrate at the Surface of Barley Roots Using Ion-Selective Microelectrodes. *Plant Physiology*, *99*(2), 734 LP-747. doi.org/10.1104/pp.99.2.734
- Hildebrandt, U., Schmelzer, E., & Bothe, H. (2002). Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Physiologia Plantarum*, *115*(1), 125–136. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150115.x
- Hinze, H., & Holzer, H. (1985). Accumulation of nitrite and sulfite in yeast cells and synergistic depletion of the intracellular ATP content. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, *180*(2), 117–120. doi.org/10.1007/BF01042634

- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C., & Tsay, Y. F. (2009). CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell*, 138(6), 1184–1194. doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004
- Ho, C. H., & Tsay, Y. F. (2010). Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 604–610. doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.005
- Huang, N. C., Chiang, C. S., Crawford, N. M., & Tsay, Y. F. (1996). CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type-specific expression in roots. *The Plant Cell*, 8(12), 2183–2191. doi.org/10.1105/tpc.8.12.2183
- Huang, N. C., Liu, K. H., Lo, H. J., & Tsay, Y. F. (1999). Cloning and Functional Characterization of an Arabidopsis Nitrate Transporter Gene That Encodes a Constitutive Component of Low-Affinity Uptake. *The Plant Cell*, 11(8), 1381-1392. www.plantcell.org/content/11/8/1381.abstract
- Huang, S., Chen, S., Liang, Z., Zhang, C., Yan, M., Chen, J., Xu, G., Fan, X., & Zhang, Y. (2015). Knockdown of the partner protein OsNAR2.1 for high-affinity nitrate transport represses lateral root formation in a nitrate-dependent manner. *Scientific Reports*, 5, 18192. doi.org/10.1038/srep18192
- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. (2012). Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 353–380. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503
- Ishikawa, S., Ito, Y., Sato, Y., Fukaya, Y., Takahashi, M., Morikawa, H., Ohtake N., Ohyama T., & Sueyoshi, K. (2009). Two-component high-affinity nitrate transport system in barley: Membrane localization, protein expression in roots and a direct protein-protein interaction. *Plant Biotechnology*, 26(2), 197–205. doi.org/10.5511/plantbiotechnology.26.197
- Jackson, L. E., Burger, M., & Cavagnaro, T. R. (2008). Roots, Nitrogen Transformations, and Ecosystem Services. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 341–363. doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092932

- Jang, J. C., & Sheen, J. (1997). Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science*, 2(6), 208–214. doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89545-3
- Johnstone, I. L., McCabe, P. C., Greaves, P., Gurr, S. J., Cole, G. E., Brow, M. A. D., Unkles, S. E., Clutterbuck, A. J., Kinghorn, JR., & Innis, M. A. (1990). Isolation and characterisation of the crnA-niiA-niaD gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 90(2), 181–192. doi.org/10.1016/0378-1119(90)90178-T
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9653–9658. doi.org/10.1073/pnas.1203567109
- Kanno, Y., Kamiya, Y., & Seo, M. (2013). Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(12), e26624. doi.org/10.4161/psb.26624
- Kawachi, T., Sunaga, Y., Ebato, M., Hatanaka, T., & Harada, H. (2006). Repression of Nitrate Uptake by Replacement of Asp105 by Asparagine in AtNRT3.1 in Arabidopsis thaliana L. *Plant and Cell Physiology*, 47(10), 1437–1441. dx.doi.org/10.1093/pcp/pcl010
- Kiba, T., Feria-Bourrellier, A. B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Bréhaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H., & Krapp, A. (2012). The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *The Plant Cell*, 24(1), 245–258. www.plantcell.org/content/24/1/245.abstract
- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1399–1409. dx.doi.org/10.1093/jxb/erq410

-
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H., & Mizuno, T. (2005). Combinatorial Microarray Analysis Revealing Arabidopsis Genes Implicated in Cytokinin Responses through the His→Asp Phosphorelay Circuitry. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), 339–355. [dx.doi.org/10.1093/pcp/pci033](https://doi.org/10.1093/pcp/pci033)
- Kim, S., Park, J., Yeom, S.-I., Kim, Y.-M., Seo, E., Kim, K.-T., Kim, M. S., Lee, J. M., Cheong, K., Shin, H. S., Kim, S. B., Han, K., Lee, J., Park, M., Lee, H. A., Lee, H. Y., Lee, Y., Oh, S., Lee, J. H., Choi, E., Choi, E., Lee, S. E., Jeon, J., Kim, H., Choi, G., Song, H., Lee, J., Lee, S. C., Kwon, J. K., Lee, H. Y., Koo, N., Hong, Y., Kim, R. W., Kang, W. H., Huh, J. H., Kang, B. C., Yang, T. J., Lee, Y. H., Bennetzen, J. L., & Choi, D. (2017). New reference genome sequences of hot pepper reveal the massive evolution of plant disease-resistance genes by retroduplication. *Genome Biology*, 18(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1341-9>
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 509–540. doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.509
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers — A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35–48. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.08.005
- Kotur, Z., & Glass, A. D. M. (2015). A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*, 38(8), 1490–1502. doi.org/10.1111/pce.12496
- Kotur, Z., Mackenzie, N., Ramesh, S., Tyerman, S. D., Kaiser, B. N., & Glass, A. D. M. (2012). Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytologist*, 194(3), 724–731. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04094.x
- Krapp, A., Fraiser, V., Scheible, W.-R., Quesada, A., Gojon, A., Stitt, M., Caboche, M., & Daniel-Vedele, F. (1998). Expression studies of Nrt2:1Np, a putative high-affinity
-

-
- nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *The Plant Journal*, 14(6), 723–731. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00181.x>
- Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., & Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 789–798. [dx.doi.org/10.1093/jxb/eru001](https://doi.org/10.1093/jxb/eru001)
- Krouk, G., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., & Tsay, Y. F. (2010). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 265–272. doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.003
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., & Gojon, A. (2010). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell*, 18(6), 927–937. doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008
- Krouk, G., Tillard, P., & Gojon, A. (2006). Regulation of the high-affinity NO₃⁻ uptake system by NRT1.1-mediated NO₃⁻ demand signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142(3), 1075–1086. doi.org/10.1104/pp.106.087510
- Kusakina, J., & Dodd, A. N. (2012). Phosphorylation in the plant circadian system. *Trends in Plant Science*, 17(10), 575–583. doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.008
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680. doi.org/10.1038/227680a0
- Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., & Coruzzi, G. M. (1996). The Molecular-Genetics of Nitrogen Assimilation Into Amino Acids in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 569–593. doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.569

-
- le Maire, M., Champeil, P., & Møller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1508(1), 86–111. doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00010-1
- Lea, P. J., & Leegood, R. C. (1993). Nitrogen metabolism, en: Plant Biochemistry and Molecular Biology, Lea, P. J., & Leegood, R. C. (eds). Wiley. New York, USA. pp. 155–180.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Müller, C., Krapp, A., von Wirén, N., Daniel-Vedele, F., & Gojon, A. (2003). Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis: Functional Importance and Relation with Hexokinase. *The Plant Cell*, 15(9), 2218 LP-2232. www.plantcell.org/content/15/9/2218.abstract
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F. D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., & Gojon, A. (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *The Plant Journal*, 18(5), 509–519. doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00480.x
- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J. M.-F., Tillard, P., & Gojon, A. (2008). Oxidative Pentose Phosphate Pathway-Dependent Sugar Sensing as a Mechanism for Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis. *Plant Physiology*, 146(4), 2036-2053. www.plantphysiol.org/content/146/4/2036.abstract
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.-C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J. M., Halkier, B. A., Harris, J. M., Hedrich, R., Limami, AM., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y. F., Zhang, M., Coruzzi, G., & Lacombe, B. (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*, 19(1), 5–9. doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.008
- Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., Sakakibara, H., Daniel-Vedele, F., & Krapp, A. (2014). The Arabidopsis nitrate

- transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *The Plant Journal*, 80(2), 230–241. doi.org/10.1111/tpj.12626
- Li, J. Y., Fu, Y. L., Pike, S. M., Bao, J., Tian, W., Zhang, Y., Li, H. M., Huang, J., Li, L. G., Schroeder, J. I., Gassmann, W., & Gong, J. M. (2010). The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *The Plant Cell*, 22(5), 1633–1646. doi.org/10.1105/tpc.110.075242
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N. M., Siddiqi, M. Y., & Glass, A. D. M. (2007). Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology*, 143(1), 425–433. doi.org/10.1104/pp.106.091223
- Li, Y., Li, J., Yan, Y., Liu, W., Zhang, W., Gao, L., & Tian, Y. (2018). Knock-Down of CsNRT2.1, a Cucumber Nitrate Transporter, Reduces Nitrate Uptake, Root length, and Lateral Root Number at Low External Nitrate Concentration. *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). doi.org/10.3389/fpls.2018.00722
- Lin, S. H., Kuo, H. F., Canivenc, G., Lin, C. S., Lepetit, M., Hsu, P. K., Tillard, P., Lin, H. L., Wang, Y. Y., Tsai, C. B., Gojon, A., & Tsay, Y. F. (2008). Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell*, 20(9), 2514–2528. doi.org/10.1105/tpc.108.060244
- Lipton, S. A., Choi, Y.-B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H. S. V., Sucher, N. J., Loscalzo, J., Singel, D. J., & Stamler, J. S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364, 626. doi.org/10.1038/364626a0
- Little, D. Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., & Malamy, J. E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13693–13698. doi.org/10.1073/pnas.0504219102
- Liu, J., Han, L., Chen, F., Bao, J., Zhang, F., & Mi, G. (2008). Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root

- development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Science*, 175(3), 272–282. doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.04.009
- Liu, K. H., Huang, C. Y., & Tsay, Y. F. (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell*, 11(5), 865–874. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330471
- Liu, K. H., & Tsay, Y. F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22(5), 1005–1013. doi.org/10.1093/emboj/cdg118
- Liu, X., Huang, D., Tao, J., Miller, A. J., Fan, X., & Xu, G. (2014). Identification and functional assay of the interaction motifs in the partner protein OsNAR2.1 of the two-component system for high-affinity nitrate transport. *The New Phytologist*, 204(1), 74–80. doi.org/10.1111/nph.12986
- Loqué, D., Yuan, L., Kojima, S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H., & von Wirén, N. (2006). Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 48(4), 522–534. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02887.x
- Luo, J., Qin, J., He, F., Li, H., Liu, T., Polle, A., Peng, C., & Luo, Z. B. (2013). Net fluxes of ammonium and nitrate in association with H⁺ fluxes in fine roots of *Populus popularis*. *Planta*, 237(4), 919–931. doi.org/10.1007/s00425-012-1807-7
- Lupini, A., Mercati, F., Araniti, F., Miller, A., Sunseri, F., & Abenavoli, M. (2016). NAR2.1/NRT2.1 functional interaction with NO₃⁻ and H⁺ fluxes in high-affinity nitrate transport in maize root regions. *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 102). doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.022
- Macduff, J. H., & Jackson, S. B. (1992). Influx and Efflux of Nitrate and Ammonium in Italian Ryegrass and White Clover Roots: Comparisons Between Effects of Darkness and Defoliation. *Journal of Experimental Botany*, 43(4), 525–535. dx.doi.org/10.1093/jxb/43.4.525

- MacKintosh, C. (1998). Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 224–229. doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80108-8
- Magasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1), 1–18. doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00558-9
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (2002). The Xanthomonas Type III Effector Protein AvrBs3 Modulates Plant Gene Expression and Induces Cell Hypertrophy in the Susceptible Host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), 637–646. doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.637
- Martín, Y., González, Y. V., Cabrera, E., Rodríguez, C., & Siverio, J. M. (2011). Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27225–27235. doi.org/10.1074/jbc.M111.265116
- Martín, Y., Navarro, F. J., & Siverio, J. M. (2008). Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* nitrate transporter CHL1 in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Plant Molecular Biology*, 68(3), 215. doi.org/10.1007/s11103-008-9363-z
- Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(1), 17–32. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106362
- Matt, P., Schurr, U., Klein, D., Krapp, A., & Stitt, M. (1998). Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the Nia transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. *Planta*, 207(1), 27–41. doi.org/10.1007/s004250050452
- Medina-Lara, F., Echevarría-Machado, I., Pacheco-Arjona, R., Ruiz-Lau, N., Guzmán-Antonio, A., & Martínez-Estevez, M. (2008). Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on Fruiting and Capsaicin Content in Habanero Pepper (*Capsicum*

-
- chinense Jacq.). *HortScience*, 43(5), 1549–1554.
hortsci.ashspublications.org/content/43/5/1549.abstract
- Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. *Plant and Soil*, 274(1), 1–36. doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2297–2306. dx.doi.org/10.1093/jxb/erm066
- Miller, A., & Cramer, M. (2004). Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. *Plant and Soil* (Vol. 274). doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1
- Moir, J. W. B., & Wood, N. J. (2001). Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(2), 215–224. doi.org/10.1007/PL00000849
- Monforte-González, M., Guzmán-Antonio, A., Uuh-Chim, F., & Vázquez-Flota, F. (2010). Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(5), 764–768. doi.org/10.1002/jsfa.3880
- Montanini, B., Viscomi, A. R., Bolchi, A., Martin, Y., Siverio, J. M., Balestrini, R., Bonfante, P., & Ottonello, S. (2006). Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *The Biochemical Journal*, 394(Pt 1), 125–134. doi.org/10.1042/BJ20051199
- Morcuende, R., Krapp, A., Hurry, V., & Stitt, M. (1998). Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta*, 206(3), 394–409. doi.org/10.1007/s004250050415
- Muller, B., & Touraine, B. (1992). Inhibition of NO_3^- Uptake by Various Phloem-Translocated Amino Acids in Soybean Seedlings. *Journal Of Experimental Botany* (Vol. 43). doi.org/10.1093/jxb/43.5.617
-

- Muños, S., Cazettes, C., Fizames, C., Gaymard, F., Tillard, P., Lepetit, M., Lejay, L., & Gojon, A. (2004). Transcript Profiling in the chl1-5 Mutant of Arabidopsis Reveals a Role of the Nitrate Transporter NRT1.1 in the Regulation of Another Nitrate Transporter, NRT2.1. *The Plant Cell*, 16(9), 2433-2447. www.plantcell.org/content/16/9/2433.abstract
- Murzin, A. G., & Bateman, A. (2001). CASP2 knowledge-based approach to distant homology recognition and fold prediction in CASP4. *Proteins* (Vol. Suppl 5). doi.org/10.1002/prot.10037
- Navarro, F. J., Machín, F., Martín, Y., & Siverio, J. M. (2006). Down-regulation of Eukaryotic Nitrate Transporter by Nitrogen-dependent Ubiquitinylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13268–13274. doi.org/10.1074/jbc.M601253200
- Navarro, F. J., Martín, Y., & Siverio, J. M. (2008). Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 31208–31217. doi.org/10.1074/jbc.M802170200
- Navarro, M. T., Guerra, E., Fernández, E., & Galván, A. (2000). Nitrite Reductase Mutants as an Approach to Understanding Nitrate Assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 122(1), 283-290. www.plantphysiol.org/content/122/1/283.abstract
- O'Brien, J. A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., & Gutiérrez, R. A. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant*, 9(6), 837–856. doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.004
- Okamoto, M., Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Crawford, N. M., & Glass, A. D. M. (2006). High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiology*, 140(3), 1036–1046. doi.org/10.1104/pp.105.074385

-
- Okamoto, M., Vidmar, J. J., & Glass, A. D. M. (2003). Regulation of NRT1 and NRT2 Gene Families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to Nitrate Provision. *Plant and Cell Physiology*, *44*(3), 304–317. [dx.doi.org/10.1093/pcp/pcg036](https://doi.org/10.1093/pcp/pcg036)
- Omata, T. (1995). Structure, Function and Regulation of the Nitrate Transport System of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant and Cell Physiology*, *36*(2), 207–213. [dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078751](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078751)
- Ono, F., Frommer, W. B., & von Wirén, N. (2000). Coordinated Diurnal Regulation of Low- and High-Affinity Nitrate Transporters in Tomato. *Plant Biology*, *2*(1):17-23. [doi:10.1055/s-2000-297](https://doi.org/10.1055/s-2000-297)
- Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S. J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., & Miller, A. J. (2007). Nitrate signaling and the two component high affinity uptake system in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, *2*(4), 260–262. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704673
- Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S. J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., & Miller, A. J. (2006). Characterization of a Two-Component High-Affinity Nitrate Uptake System in *Arabidopsis*. Physiology and Protein-Protein Interaction. *Plant Physiology*, *142*(3), 1304-1317. www.plantphysiol.org/content/142/3/1304.abstract
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F. (2004). Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta*, *219*(4), 714–721. doi.org/10.1007/s00425-004-1266-x
- Orsel, M., Filleur, S., Fraissier, V., & Daniel-Vedele, F. (2002). Nitrate transport in plants: which gene and which control?. *Journal of Experimental Botany*, *53*(370), 825–833. [dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.370.825](https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.825)
- Orsel, M., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology*, *129*(2), 886–896. doi.org/10.1104/pp.005280

- Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier Jr, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(1), 1–34. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529885
- Parker, J. L., & Newstead, S. (2014). Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature*, 507, 68. doi.org/10.1038/nature13116
- Pérez, M. D., González, C., Avila, J., Brito, N., & Siverio, J. M. (1997). The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *The Biochemical Journal*, 321(Pt 2), 397–403. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020872
- Plants, Roots and the Soil. (2007, November 16). *Plant Roots*. [doi.org/doi:10.1002/9780470995563.ch1](https://doi.org/10.1002/9780470995563.ch1)
- Plassar, D. C., Guérin-Laguette, E. A., VézY, A. A., Casarin, V., & Thibaud, J.B. (2002). Local measurements of nitrate and potassium fluxes along roots of maritime pine. Effects of ectomycorrhizal symbiosis. *Plant, Cell & Environment*, 25(1), 75–84. doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00810.x
- Quesada, A., & Fernández, E. (1994). Expression of nitrate assimilation related genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*, 24(1), 185–194. doi.org/10.1007/BF00040584
- Quesada, A., Hidalgo, J., & Fernández, E. (1998). Three Nrt2 genes are differentially regulated in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics MGG*, 258(4), 373–377. doi.org/10.1007/s004380050743
- Quesada, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (1994). Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 5(3), 407–419. doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00407.x
- Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L. J., Daniel-Vedele, F., Fernández, E., Forde, B. G., & Caboche, M. (1997). PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA

- homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Molecular Biology*, 34(2), 265–274. doi.org/10.1023/A:1005872816881
- Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., & Biswas, P. (2017). Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 66). doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02178
- Rampitsch, C., & Bykova, N. V. (2012). The beginnings of crop phosphoproteomics: exploring early warning systems of stress. *Frontiers in Plant Science*, 3, 144. doi.org/10.3389/fpls.2012.00144
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B. G., & Gojon, A. (2006). The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19206–19211. doi.org/10.1073/pnas.0605275103
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., & Gojon, A. (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 140(3), 909–921. doi.org/10.1104/pp.105.075721
- Richard-Molard, C., Krapp, A., Brun, F., Ney, B., Daniel-Vedele, F., & Chaillou, S. (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two Arabidopsis genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 779–791. dx.doi.org/10.1093/jxb/erm363
- Ruffel, S., Gojon, A., & Lejay, L. (2014). Signal interactions in the regulation of root nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5509–5517. dx.doi.org/10.1093/jxb/eru321
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K. D., & Coruzzi, G. M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 108(45), 18524–18529.
doi.org/10.1073/pnas.1108684108

Ruiz Herrera, L. F., Shane, M. W., & López-Bucio, J. (2015). Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(4), 431–443.
doi.org/10.1002/wdev.183

Roots and the Architecture of Root Systems. (2007, November 16). *Plant Roots*.
doi.org/doi:10.1002/9780470995563.ch2

Sakakibara, H., Takei, K., & Hirose, N. (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science*, 11(9), 440–448. doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.004

Santiago-Antonio, G., Lizama-Gasca, M. G., Carrillo-Pech, M., & Echevarría-Machado, I. (2014). Natural variation in response to nitrate starvation among varieties of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Australian Journal of Crop Science*, 8(4).

Scharff, A. M., Egsgaard, H., Hansen, P. E., & Rosendahl, L. (2003). Exploring Symbiotic Nitrogen Fixation and Assimilation in Pea Root Nodules by in Vivo ¹⁵N Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Plant Physiology*, 131(1), 367–378.
www.plantphysiol.org/content/131/1/367.abstract

Schneiderei, A., Scholz-Starke, J., & Büttner, M. (2003). Functional characterization and expression analyses of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(1), 182–190.
doi.org/10.1104/pp.103.026674

Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666(1), 105–117. doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011

Segonzac, C., Boyer, J. C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossignol, M., & Gibrat, R. (2007). Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane:

- Identification of an Arabidopsis Excretion Transporter. *The Plant Cell*, 19(11), 3760 LP-3777. www.plantcell.org/content/19/11/3760.abstract
- Sehgal, P., Mogensen, J. E., & Otzen, D. E. (2005). Using micellar mole fractions to assess membrane protein stability in mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1716(1), 59–68. doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.08.006
- Shah, J. M., Bukhari, S. A. H., Zeng, J., Quan, X., Ali, E., Muhammad, N., & Zhang, G. (2017). Nitrogen (N) metabolism related enzyme activities, cell ultrastructure and nutrient contents as affected by N level and barley genotype. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(1), 190–198. [doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61308-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61308-9)
- Shultis, D. D., Purdy, M. D., Banchs, C. N., & Wiener, M. C. (2006). Outer Membrane Active Transport: Structure of the BtuB:TonB Complex. *Science*, 312(5778), 1396-1399. doi.org/10.1126/science.1127694
- Sivasankar, S., Rothstein, S., & Oaks, A. (1997). Regulation of the Accumulation and Reduction of Nitrate by Nitrogen and Carbon Metabolites in Maize Seedlings. *Plant Physiology*, 114(2), 583 LP-589. www.plantphysiol.org/content/114/2/583.abstract
- Solcan, N., Kwok, J., Fowler, P. W., Cameron, A. D., Drew, D., Iwata, S., & Newstead, S. (2012). Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *The EMBO Journal*, 31(16), 3411 LP – 3421. doi.org/10.1038/emboj.2012.157
- Sorgonà, A., Lupini, A., Mercati, F., Di Dio, L., Sunseri, F., & Abenavoli, M. R. (2011). Nitrate uptake along the maize primary root: an integrated physiological and molecular approach. *Plant, Cell & Environment*, 34(7), 1127–1140. doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02311.x
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W., & Krapp, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 959–970. dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.370.959

-
- Sun, J., Bankston, J. R., Payandeh, J., Hinds, T. R., Zagotta, W. N., & Zheng, N. (2014). Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature*, *507*, 73. doi.org/10.1038/nature13074
- Takayanagi, S., Takagi, Y., Araki, R., & Hasegawa, H. (2011). High-affinity nitrate uptake by rice (*Oryza sativa*) coleoptiles. *Journal of Plant Research*, *124*(2), 305–309. doi.org/10.1007/s10265-010-0375-9
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. doi.org/10.1093/molbev/mst197
- Tang, Z., Fan, X., Li, Q., Feng, H., Miller, A., Shen, Q., & xu, G. (2012). Knockdown of a Rice Stellar Nitrate Transporter Alters Long-Distance Translocation But Not Root Influx. *Plant physiology*, *160*(4), 2052–2063. doi.org/10.1104/pp.112.204461
- Taulemesse, F., Le Gouis, J., Gouache, D., Gibon, Y., & Allard, V. (2015). Post-Flowering Nitrate Uptake in Wheat Is Controlled by N Status at Flowering, with a Putative Major Role of Root Nitrate Transporter NRT2.1. *PLOS ONE*, *10*(3), e0120291. doi.org/10.1371/journal.pone.0120291
- Taylor, A. R., & Bloom, A. J. (1998). Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant, Cell & Environment*, *21*(12), 1255–1263. doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00357.x
- The Functioning Root System. (2007, November 16). *Plant Roots*. doi.org/doi:10.1002/9780470995563.ch4
- Tian, Q. Y., Sun, P., & Zhang, W. H. (2009). Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *184*(4), 918–931. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03004.x
- Tinker, P. B., & Nye, P. H. (2000). Solute Movement in the Rhizosphere. Oxford University Press. pp 464.

- Titarenko, E., Rojo, E., León, J., & Sánchez-Serrano, J. J. (1997). Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 115(2), 817–826. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342878
- Tong, Y., Zhou, J. J., Li, Z., & Miller, A. J. (2005). A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *The Plant Journal*, 41(3), 442–450. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02310.x
- Touraine, B., Daniel-Vedel, F., & Forde, B. (2001). Nitrate uptake and its regulation, en: *Plant Nitrogen*, Lea, P. J., & Morot-Gaudry, J. F. (eds). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York. pp. 1-37.
- Trevisan, S., Manoli, A., Ravazzolo, L., Botton, A., Pivato, M., Masi, A., & Quaggiotti, S. (2015). Nitrate sensing by the maize root apex transition zone: a merged transcriptomic and proteomic survey. *Journal of Experimental Botany*, 66(13), 3699–3715. doi.org/10.1093/jxb/erv165
- Trueman, L. J., Richardson, A., & Forde, B. G. (1996). Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 175(1), 223–231. [doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00154-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00154-0)
- Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H., & Hsu, P. K. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*, 581(12), 2290–2300. doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.047
- Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A., & Crawford, N. M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72(5), 705–713. [doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90399-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90399-B)
- Tsay, Y.F., Ho, C.H., Chen, H.Y., & Lin, S.H. (2011). Integration of Nitrogen and Potassium Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 207–226. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103837

- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Käll, L., & Elofsson, A. (2015). The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W401–W407. doi.org/10.1093/nar/gkv485
- Tsujimoto, R., Yamazaki, H., Maeda, S., & Omata, T. (2007). Distinct Roles of Nitrate and Nitrite in Regulation of Expression of the Nitrate Transport Genes in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant and Cell Physiology*, *48*(3), 484–497. dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm019
- Unkles, S. E., Wang, R., Wang, Y., Glass, A. D. M., Crawford, N. M., & Kinghorn, J. R. (2004). Nitrate Reductase Activity Is Required for Nitrate Uptake into Fungal but Not Plant Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(27), 28182–28186. doi.org/10.1074/jbc.M403974200
- von Wittgenstein, N. J. J. B., Le, C. H., Hawkins, B. J., & Ehlting, J. (2014). Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1), 11. doi.org/10.1186/1471-2148-14-11
- Walch-Liu, P., Neumann, G., Bangerth, F., & Engels, C. (2000). Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, *51*(343), 227–237. dx.doi.org/10.1093/jexbot/51.343.227
- Wang, D., & Bosland, P. W. (2006). The Genes of Capsicum. *HortScience*, *41*(5), 1169–1187. hortsci.ashspublications.org/content/41/5/1169.abstract
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S. T., & Crawford, N. M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell*, *12*(8), 1491–1509. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10948265
- Wang, R., Liu, D., & Crawford, N. M. (1998). The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(25), 15134–15139. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844028

-
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., & Crawford, N. M. (2004). Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136(1), 2512-2522. www.plantphysiol.org/content/136/1/2512.abstract
- Wang, Y. Y., Hsu, P. K., & Tsay, Y. F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, 17(8), 458–467. doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.006
- Wang, Y. Y., & Tsay, Y. F. (2011). Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.9 Is Important in Phloem Nitrate Transport. *The Plant Cell*, 23(5), 1945-1957. www.plantcell.org/content/23/5/1945.abstract
- Wang, Y., Li, W., Siddiqi, Y., Kinghorn, J. R., Unkles, S. E., & Glass, A. D. M. (2007). Evidence for post-translational regulation of NrtA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrate transporter. *New Phytologist*, 175(4), 699–706. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02135.x
- Wang, Y. H., Garvin, D. F., & Kochian, L. V. (2001). Nitrate-Induced Genes in Tomato Roots. Array Analysis Reveals Novel Genes That May Play a Role in Nitrogen Nutrition. *Plant Physiology*, 127(1), 345-359. www.plantphysiol.org/content/127/1/345.abstract
- Williams, L. E., & Miller, A. J. (2001). Transporters Responsible For The Uptake And Partitioning Of Nitrogenous Solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 659–688. doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.659
- Wilson, M., Goh, T., Voß, U., Bishopp, A., Péret, B., & Bennett, M. (2013). SnapShot: Root Development. *Cell*, 155(5), 1190–1190.e1. doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.007
- Wirth, J., Chopin, F., Santoni, V., Viennois, G., Tillard, P., Krapp, A., Lejay, L., Daniel-Vedele, F., & Gojon, A. (2007). Regulation of Root Nitrate Uptake at the NRT2.1 Protein Level in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23541–23552. doi.org/10.1074/jbc.M700901200
- Wolt, J. D. (1994). Soil solution chemistry: applications to environmental science and agriculture. New York: John Wiley and Sons.
-

-
- Wu, Q., & Stewart, V. (1998). NasFED Proteins Mediate Assimilatory Nitrate and Nitrite Transport in *Klebsiella oxytoca pneumoniae* M5al. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1311-1322. jb.asm.org/content/180/5/1311.abstract
- Yan, M., Fan, X., Feng, H., Miller, A. J., Shen, Q., & Xu, G. (2011). Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant, Cell & Environment*, 34(8), 1360–1372. doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02335.x
- Yin, L. P., Li, P., Wen, B., Taylor, D., & Berry, J. O. (2007). Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (TaNRT2.1) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NTR2 genes. *Plant Science*, 172(3), 621–631. doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.014
- Yong, Z., Kotur, Z., & Glass, A. D. M. (2010). Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 63(5), 739–748. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04278.x
- Zhang, H., & Forde, B. G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 51–59. www.jstor.org/stable/23696455
- Zheng, D., Han, X., An, Y. I., Guo, H., Xia, X., & Yin, W. (2013). The nitrate transporter NRT2.1 functions in the ethylene response to nitrate deficiency in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 36(7), 1328–1337. doi.org/10.1111/pce.12062
- Zhou, J. J., Fernández, E., Galván, A., & Miller, A. J. (2000). A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Letters*, 466(2), 225–227. [doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01085-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01085-1)
- Zhou, J. J., Theodoulou, F. L., Muldin, I., Ingemarsson, B., & Miller, A. J. (1998). Cloning and Functional Characterization of a *Brassica napus* Transporter That Is Able to Transport Nitrate and Histidine. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12017–12023. doi.org/10.1074/jbc.273.20.12017

- Zhou, J. J., Trueman, L. J., Boorer, K. J., Theodoulou, F. L., Forde, B. G., & Miller, A. J. (2000). A High Affinity Fungal Nitrate Carrier with Two Transport Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 39894–39899. doi.org/10.1074/jbc.M004610200
- Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., & MacKinnon, R. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*, 411, 657. doi.org/10.1038/35079500
- Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J., & Glass, A. D. M. (2002). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 17(5), 563–568. doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00396

ANEXO I

CAPITULO II

Figura A1. Sitios de fosforilación predichos para CcNRT2.1

| Position | Residue | Kinase |
|---------------------|---------|-------------------|
| N-terminal | | |
| 16 | T | unsp |
| 25 | S | cdc2 |
| 28 | S | p38MAPK/cdk5 |
| 35 | T | unsp/PKC |
| 36 | T | unsp/PKC |
| 40 | S | PKC/unsp |
| 45 | T | unsp |
| 56 | S | PKA/RSK |
| Central loop | | |
| 256 (11) | T | PKC/unsp |
| 260 (15) | T | cdc2 |
| C-terminal | | |
| 468 (7) | S | cdc2/PKC |
| 474 (13) | T | PKC |
| 481 (20) | S | unsp |
| 485 (24) | Y | unsp/SRC |
| 486 (25) | Y | unsp/SRC |
| 487 (26) | S | unsp/CKII |
| 488 (27) | S | CKII/unsp |
| 490 (29) | Y | unsp/EGFR/SRC |
| 491 (30) | T | CKII/unsp |
| 503 (42) | S | unsp/cdc2 |
| 512 (51) | S | unsp |
| 520 (59) | S | unsp/PKA/cdc2/PKG |
| 523 (62) | T | cdk5/p38MAPK |
| 528 (67) | T | unsp/cdk5/p38MAPK |

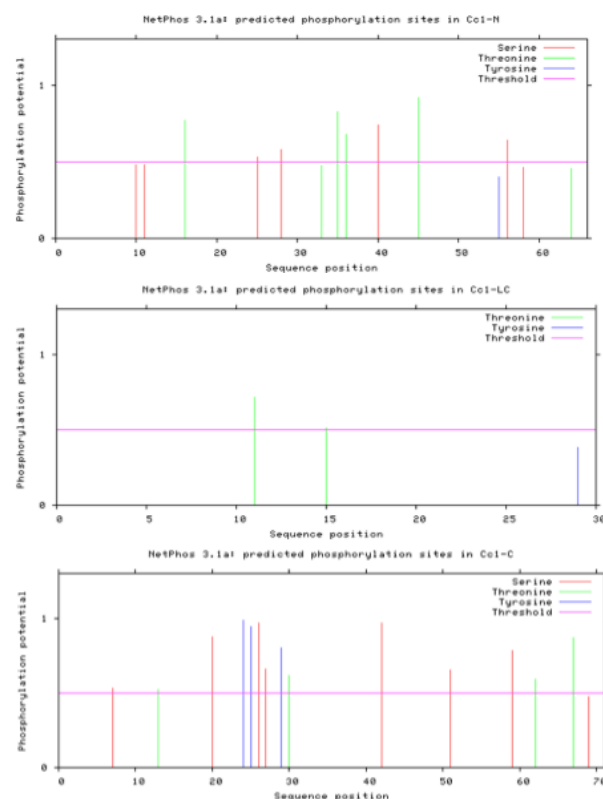


Figura suplementaria A1. Sitios de fosforilación predichos para CcNRT2.1 y CcNAR2. A) Panel izquierdo: cuadro resumen de los sitios de fosforilación para CcNRT2.1. Los números indican la posición de los aminoácidos que se fosforilan. Las letras mayúsculas representan a los aminoácidos que se fosforilan. Las cinasas que llevan a cabo dichas fosforilaciones se indican en la parte derecha de la tabla. Panel derecho: representación gráfica de los sitios de fosforilación predichos para CcNRT2.1. Parte superior; sitios de fosforilación del extremo amino terminal. Parte intermedia sitios de fosforilación del loop citosólico intermedio. Parte inferior sitios de fosforilación del extremo carboxilo

terminal. La línea horizontal en color fusha indica el límite de potencial de fosforilación. Valores por debajo del límite indica poca probabilidad y valores por arriba del límite indica alta probabilidad de fosforilación. Líneas verticales color rojo representan Serinas (S); líneas verticales color verde representan Treoninas (T); líneas verticales color azul representan Tirosinas (Y) (NetPhos).

Cuadro A1. Proteínas pertenecientes a la familia NRT2 de diferentes organismos utilizadas para la construcción del árbol filogenético.

| Organismo | No. De accesión gen | Tamaño gen | No. Accesion proteína | tamaño proteína | Nomenclatura |
|--|------------------------|------------|----------------------------|--------------------|----------------|
| Bacterias | | | | | |
| Escherichia coli nitrate/nitrite transporter [str. K-12 substr. MG1655] | U00096.3 | 1389 pb | NP_415741.1/ AAC74307.1 | 463 | NarK |
| Escherichia coli nitrate/nitrite transporter [str. K- 12 substr. MG1655] | NC_000913.3 | 1386 pb | NP_415986.1 | 462 | NarU |
| Cianobacterias | | | | | |
| Synechococcus sp. strain PCC 7002 (NrtP) | AF089813.1 | 1602 pb | AAD45941.1 | 534 | SyNRT2 (NrtP) |
| Levadura | | | | | |
| Hansenula polymorpha (Ogataea polymorpha ó Pichia angusta) | AJ223294.1 | 1527 pb | CAA11229.1 | 508 | HpNRT2 (Ynt1) |
| Hongos | | | | | |
| Aspergillus nidulans | U34382.1 | 1524 pb | AAA76713.1 | 507 | AsnNRT2 (crnA) |
| VIPIRIDIPLANTAE | | | | | |
| Chlorophyte | | | | | |
| Chlorella variabilis nitrate transporter | XM_00584473 0.1 | 1593 pb | XP_00584479 2.1 | 531 | CvNRT2 |
| Chlorella sorokiniana nitrate transporter NTR | AY026523.1 | 1875 pb | AAK02066.1 | 625 | ChsNRT2 |
| Ostreococcus lucimarinus CCE9901 | XM_00141988 5.1 | 1482 pb | XP_00141992 2.1 | 494 | OINRT2 |
| Bathycoccus prasinus | XM_00751498 9.1 | 1482 pb | XP_00751505 1.1 | 494 | BpNrt2 |
| Chlamydomonas reinhardtii | XM_00169673 7.1 | 1593 pb | XP_00169678 9.1 | 531 | CrNRT2 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|-----------------------------------|-----|----------|
| hypothetical protein CHLREDRAFT_192 090 | | | | | |
| Chlamydomonas reinhardtii high affinity nitrate transporter, partial | XM_00169673 6.1 | 1581 pb | XP_00169678 8.1 | 527 | CrNRT2.1 |
| Chlamydomonas reinhardtii nitrate transporter component | Z25438.1 | 1641 pb | CAA80925.1 | 547 | CrNRT2.2 |
| Chlamydomonas reinhardtii nitrite/nitrate transporter | AY669386.1 | 1716 pb | AAU11814.1 | 572 | CrNRT2.3 |
| Chlamydomonas reinhardtii nitrate transporter | XM_00169444 4.1 | 1884 pb | XP_00169449 6.1/CAD60538 .1 | 628 | CrNRT2.4 |
| Dunaliella salina high affinity nitrate transporter | JN624759.1 | 1617 pb | AEO62175.1 | 539 | DsNRT2 |
| Dunaliella salina high affinity nitrate transporter | AY621079.1 | 1617 pb | AAU87579.1 | 539 | DsNRT2.1 |
| Bryophyte | | | | | |
| Physcomitrella patens | XM_00178514 2.1 | 1647 pb | XP_00178519 4.1 | 548 | PpNRT2 |
| Physcomitrella patens | XM_00176816 0.1 | 1644 pb | XP_00176821 2.1 | 549 | PpNRT2.2 |
| Physcomitrella patens | XM_00176815 8.1 | 1644 pb | XP_00176821 0.1 | 548 | PpNRT2.1 |
| Physcomitrella patens | AB110462.2 | 1647 pb | BAD00099.2 | 549 | PpNRT2.3 |
| Physcomitrella patens | XM_00176527 9.1 | 1647 pb | XP_00176533 1.1 | 557 | PpNRT2-1 |
| Physcomitrella patens | XM_00175407 8.1 | 1533 pb | XP_00175413 0.1 | 510 | PpNRT2-2 |
| Physcomitrella patens | AB287509.1 | 1551 pb | BAF42658.1 | 517 | PpNRT2.7 |
| Physcomitrella patens | XM_00176874 9.1 | 1545 pb | XP_00176880 1.1 | 515 | PpNRT2-3 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|-------------|
| Physcomitrella patens | AB287508.1 | 1557 pb | BAF42657.1 | 519 | PpNRT2.6 |
| Physcomitrella patens | XM_00175399 7.1 | 1551 pb | XP_00175404 9.1 | 517 | PpNRT2-4 |
| Physcomitrella patens | AB287510.1 | 1551 pb | BAF42659.1 | 517 | PpNRT2.8 |
| Physcomitrella patens | XM_00177921 3.1 | 1530 pb | XP_00177926 5.1 | 510 | PpNRT2-5 |
| Tracheophyte | | | | | |
| Lycopodiophyte | | | | | |
| Salaginella moellendorffii | XM_00296622 0.1 | 1608 pb | XP_00296626 6.1 | 536 | SmNRT2.1-1 |
| Salaginella moellendorffii | XM_00299323 2.1 | 1566 pb | XP_00299327 8.1 | 522 | SmNRT2.2-1 |
| Amborellales | | | | | |
| Amborella trichopoda hypothetical protein AMTR_s00140p001 10570 | KI394169.1 | 1602 pb | ERN04807.1 | 534 | AmtNRT2 |
| Amborella trichopoda high-affinity nitrate transporter 2.1 | XM_00684306 9.2 | 1554 pb | XP_00684313 2.2 | 518 | AmtNRT2.1 |
| Amborella trichopoda high-affinity nitrate transporter 2.1 | XM_00684094 9.2 | 1587 pb | XP_00684101 2.1 | 529 | AmtNRT2.1-1 |
| Alismatales | | | | | |
| Egeria densa putative high affinity nitrate transporter | AB594749.1 | 1500 pb | BAK51923.1 | 500 | EdNRT2 |
| Zostera marina High affinity nitrate transporter 2.1 | LFYR0100182 3.1 | 1548 pb | KMZ59016.1 | 516 | ZomNRT2.1 |
| Arecales | | | | | |
| Phoenix dactylifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00877866 0.1 | 1593 pb | XP_00877688 2.1 | 531 | PdNRT2.4 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|-------------|
| Elaeis guineensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01090874 0.1 | 1809 pb | XP_01090704 2.1 | 603 | ElgNRT2.4 |
| Elaeis guineensis PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01092451 7.1 | 1593 pb | XP_01092311 6.1 | 513 | ElgNRT2.3 |
| Phoenix dactylifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00879302 6.1 | 1593 pb | XP_00879124 8.1 | 513 | PdNRT2.5 |
| Elaeis guineensis PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01092451 7.1 | 1530 pb | XP_01092281 9.1 | 510 | ElgNRT2.3-1 |
| Elaeis guineensis PREDICTED: probable high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01092882 5.1 | 1493 pb | XP_01092712 7.1 | 477 | ElgNRT2.4-1 |
| Phoenix dactylifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_00880641 1.1 | 1530 pb | XP_00880463 3.1 | 510 | PdNRT2.5-1 |
| Poales | | | | | |
| Brachypodium distachyon high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00357250 2.2 | 1515 pb | XP_00357255 0.1 | 505 | BdNRT2.1 |
| Brachypodium distachyon high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00357254 2.2 | 1527 pb | XP_00357259 0.2 | 509 | BdNRT2.1-1 |
| Brachypodium distachyon high- affinity nitrate transporter 2.3 | XM_00356958 9.3 | 1545 pb | XP_00356963 7.1 | 515 | BdNRT2.3 |
| Ananas comosus High-affinity nitrate transporter 2.2 | LSRQ0100555 5.1 | 1593 pb | OAY67353.1 | 531 | AncNRT2.2 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Oryza sativa Japonica Group PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1 | XM_01576811 0.1 | 1599 pb | XP_01562359 6.1 | 533 | OsjNRT2.1 |
| Oryza sativa Indica Group hypothetical protein OsI_05552 | CM000127.1 | 1599 pb | EAY84173.1 | 533 | OsiNRT2 |
| Setaria italica PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00495208 4.2 | 1581 pb | XP_00495214 1.1 | 527 | SiNRT2.1 |
| Oryza brachyantha PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1 | XM_00664671 4.2 | 1590 pb | XP_00664677 7.1 | 530 | ObNRT2.1 |
| Setaria italica PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00495208 6.1 | 1590 pb | XP_00495214 3.1 | 527 | SiNRT2.1-1 |
| Setaria italica PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00495208 3.1 | 1587 pb | XP_00495214 0.1 | 526 | SiNRT2.1-2 |
| Zea mays high affinity nitrate transporter | NM_00127942 2.1 | 1572 pb | NP_00126635 1.1 | 524 | ZmNRT2 |
| Phragmites australis putative high affinity nitrate transporter | AB096061.2 | 1569 pb | BAC76606.1 | 523 | PhaNRT2 |
| Zea mays putative high affinity nitrate transporter | AY129953.1 | 1572 pb | AAN05088.1 | 524 | ZmNRT2.1 |
| Triticum urartu High-affinity nitrate transporter 2.1 | KD045468.1 | 1527 pb | EMS65307.1 | 509 | TuNRT2.1 |
| Triticum aestivum high affinity nitrate transporter TaNRT2 | AF288688.1 | 1521 pb | AAG01172.1 | 507 | TaNRT2 |
| Aegilops tauschii Nitrate transporter | KD557806.1 | 1527 pb | EMT10644.1 | 509 | AetNRT2 |

| | | | | | | |
|---|------------------------------|--------------------|---------|--------------------|-----|-----------------|
| BCH1 Hordeum vulgare Vulgare | subsp. | U34198.1 | 1521 pb | AAC49531.1 | 507 | HvNRT2.1 (BCH1) |
| Hordeum subsp. Vulgare high affinity nitrate transporter | vulgare | DQ539043.1 | 1521 pb | ABG20829.1 | 507 | HvNRT2.6 |
| BCH2 Hordeum vulgare Vulgare | subsp. | U34290.1 | 1527 pb | AAC49532.1 | 509 | HvNRT2.2 (BCH2) |
| Hordeum subsp. vulgare putative high affinity nitrate transporter | vulgare | AF091115.1 | 1518 pb | AAD28363.1 | 506 | HvNRT2.3 (BCH3) |
| Setaria italica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | italica | XM_00495208 1.1 | 1572 pb | XP_00495213 8.1 | 524 | SiNRT.1-3 |
| Triticum urartu High affinity nitrate transporter 2.4 | High affinity nitrate | KD278152.1 | 1527 pb | EMS46096.1 | 509 | TuNRT2.4 |
| Aegilops tauschii Nitrate transporter | tauschii | KD506451.1 | 1521 pb | EMT29903.1 | 507 | AetNRT2-1 |
| Triticum urartu High- affinity nitrate transporter 2.1 | High- affinity nitrate | KD278152.1 | 1521 pb | EMS46094.1 | 507 | TuNRT2.1-1 |
| Zea mays PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | mays | XM_00864694 1.1 | 1566 pb | XP_00864516 3.1 | 522 | ZmNRT2.4 |
| Aegilops tauschii Nitrate transporter | tauschii | KD506451.1 | 1518 pb | EMT29898.1 | 506 | AetNRT2-2 |
| Aegilops tauschii Nitrate transporter | tauschii | KD503521.1 | 1524 pb | EMT31431.1 | 508 | AetNRT2-3 |
| Triticum urartu High- affinity nitrate transporter 2.1 | High- affinity nitrate | KD049543.1 | 1524 pb | EMS65038.1 | 508 | TuNRT2.1-2 |
| Aegilops tauschii Nitrate transporter | tauschii | KD506451.1 | 1551 pb | EMT29901.1 | 517 | AetNRT2-4 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Ananas comosus High-affinity nitrate transporter 2.3 | LSRQ0100140 7.1 | 1581 pb | OAY77968.1 | 527 | AncNRT2.3 |
| Hordeum vulgare subsp. vulgare high affinity nitrate transporter NRT2.5 | DQ539042.1 | 1542 pb | ABG20828.1 | 514 | HvNRT2.5 |
| Aegilops tauschii Nitrate transporter | KD503835.1 | 1515 pb | EMT31244.1 | 505 | AetNRT2-5 |
| Oryza sativa Japonica Group PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.3a | XM_01577303 8.1 | 1548 pb | XP_01562852 4.1 | 516 | OsjNRT2.3a |
| Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J013165G04, full insert sequence- high affinity nitrate transporter 2.3b | AK072215.1 | 1458 pb | xxxxx | 486 | OsjNRT2.3b |
| Sorghum bicolor hypothetical protein SORBIDRAFT_03g 032310 | XM_00245617 4.1 | 1545 pb | XP_00245621 9.1 | 515 | SbNRT2.5 |
| Setaria italica hypothetical protein SETIT_004444mg | CM003532.1 | 1539 pb | KQL06605.1 | 513 | SiNRT2 |
| Setaria italica PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.3 | XM_00497206 8.3 | 1509 pb | XP_00497212 5.2 | 503 | SiNRT2.3 |
| Triticum urartu High affinity nitrate transporter 2.5 | KD233066.1 | 1542 pb | EMS50263.1 | 514 | TuNRT2.5 |
| Zea mays PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00865857 3.1 | 1560 pb | XP_00865679 5.1 | 520 | ZmNRT2.5 |
| Oryza brachyantha PREDICTED: high- | XM_00664451 6.2 | 1566 pb | XP_00664457 9.1 | 522 | ObNRT2.3 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| affinity nitrate transporter 2.3 | | | | | |
| Sorghum bicolor hypothetical protein SORBIDRAFT_04g001000 | XM_00245311 4.1 | 1581 pb | XP_00245315 9.1 | 527 | SbNRT2 |
| Sorghum bicolor hypothetical protein SORBIDRAFT_04g000970 | XM_00245132 9.1 | 1605 pb | XP_00245137 4.1 | 535 | SbNRT2-1 |
| Triticum urartu High affinity nitrate transporter 2.4 | KD278152.1 | 1716 pb | EMS46097.1 | 572 | TuNRT2.4-1 |
| Triticum aestivum unnamed protein product | HG670306.1 | 1542 pb | CDM83676.1 | 514 | TaNRT2.5 |
| Zingiberales | | | | | |
| Musa acuminata subsp. malaccensis PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00941487 1.1 | 1590 pb | XP_00941314 6.1 | 530 | MaNRT2.1 |
| Musa acuminata subsp. malaccensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00938385 9.1 | 1593 pb | XP_00938213 4.1 | 531 | MaNRT2.4 |
| Musa acuminata subsp. malaccensis PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_00939804 1.1 | 1530 pb | XP_00939631 6.1 | 510 | MaNRT2.3 |
| Musa acuminata subsp. malaccensis PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_00939725 9.1 | 1530 pb | XP_00939553 4.1 | 510 | MaNRT2.3-1 |
| Eudicot | | | | | |
| Proteales | | | | | |
| Nelumbo nucifera PREDICTED: LOW | XM_01025614 9.1 | 1878 pb | XP_01025445 1.1 | 626 | NnNRT2.4 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| QUALITY PROTEIN: high affinity nitrate transporter 2.4 | | | | | |
| Nelumbo nucifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01025026 9.1 | 1518 pb | XP_01024857 1.1 | 506 | NnNRT2.5 |
| Nelumbo nucifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01025284 6.1 | 1413 pb | XP_01025114 8.1 | 471 | NnNRT2.5-1 |
| Vitales | | | | | |
| Vitis vinifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_00227709 1.2 | 1590 pb | XP_00227712 7.1 | 530 | VvNRT2.4 |
| Vitis vinifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_00227678 1.2 | 1593 pb | XP_00227681 7.1 | 531 | VvNRT2.4-1 |
| Vitis vinifera PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00226614 8.3 | 1515 pb | XP_00226618 4.1 | 505 | VvNRT2.5 |
| Malpighiales | | | | | |
| Ricinus communis PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1 | XM_00252364 1.1 | 1590 pb | XP_00252368 7.1 | 530 | RcNRT2.1 |
| Jatropha curcas PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01220935 3.1 | 1590 pb | XP_01206474 3.1 | 530 | JcNRT2.1 |
| Populus euphratica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1 | XM_01101304 9.1 | 1590 pb | XP_01101135 1.1 | 530 | PeNRT2.1 |
| Populus tremula x Populus tremuloides nitrate transporter | AJ646890.1 | 1590 pb | CAG26716.1 | 530 | PtNRT2.1 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Populus trichocarpa high-affinity nitrate transporter NRT2 family protein | XM_00231349 2.2 | 1590 pb | XP_00231352 8.2 | 530 | PtrNRT2 |
| Populus trichocarpa high-affinity nitrate transporter NRT2 family protein | XM_00638853 6.1 | 1590 pb | XP_00638859 8.1 | 530 | PtrNRT2-1 |
| Ricinus communis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_00252364 2.2 | 1590 pb | XP_00252368 8.1 | 530 | RcNRT2.4 |
| Populus euphratica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01101304 8.1 | 1572 pb | XP_01101135 0.1 | 524 | PeNRT2.1-1 |
| Jatropha curcas PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01222702 5.1 | 1590 pb | XP_01208241 5.1 | 530 | JcNRT2.4 |
| Ricinus communis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_00251945 8.1 | 1596 pb | XP_00251950 4.1 | 532 | RcNRT2.4-1 |
| Manihot esculenta NRT2 | GU248341.1 | 1572 pb | ADA83726.1 | 524 | MaeNRT2 |
| Ricinus communis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6 | XM_00252364 3.2 | 1590 pb | XP_00252368 9.1 | 530 | RcNRT2.6 |
| Jatropha curcas PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01220971 2.1 | 1512 pb | XP_01206510 2.1 | 504 | JcNRT2.3 |
| Jatropha curcas PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01223005 6.1 | 1503 pb | XP_01208544 6.1 | 501 | JcNRT2.5 |
| Populus euphratica PREDICTED: high | XM_01104218 9.1 | 1524 pb | XP_01104049 1.1 | 508 | PeNRT2.5 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| affinity nitrate transporter 2.5-like | | | | | |
| Ricinus communis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00252785 3.2 | 1512 pb | XP_00252789 9.1 | 504 | RcNRT2.5 |
| Populus trichocarpa high-affinity nitrate transporter family protein | XM_00232158 8.2 | 1524 pb | XP_00232162 4.2 | 508 | PtrNRT2-2 |
| Populus euphratica PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01104790 2.1 | 1524 pb | XP_01104620 4.1 | 508 | PeNRT2.5-1 |
| Populus trichocarpa high-affinity nitrate transporter family protein | XM_00232158 6.2 | 1524 pb | XP_00232162 2.2 | 508 | PtrNRT2-3 |
| Populus tremula x Populus tremuloides nitrate transporter | AJ646891.1 | 1524 pb | CAG26717.1 | 508 | PtNRT2.2 |
| Populus euphratica PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01104902 2.1 | 1413 pb | XP_01104732 4.1 | 471 | PeNRT2.7 |
| Jatropha curcas PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01222588 3.1 | 1392 pb | XP_01208127 3.1 | 464 | JcNRT2.7 |
| Ricinus communis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00252461 8.2 | 1395 pb | XP_00252466 4.1 | 465 | RcNRT2.7 |
| Fabales | | | | | |
| Glycine max NRT2 protein | NM_00124951 5.1 | 1590 pb | NP_00123644 4.1 | 530 | GmNRT2 |
| Glycine max PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00354014 6.3 | 1590 pb | XP_00354019 4.1 | 530 | GmNRT2.4 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Vigna radiata var. radiata PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01463847 6.1 | 1590 pb | XP_01449396 2.1 | 530 | VrNRT2.4 |
| Glycine max PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_00353914 7.3 | 1590 pb | XP_00353919 5.1 | 530 | GmNRT2.4-1 |
| Medicago truncatula high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01360052 2.1 | 1578 pb | XP_01345597 6.1 | 526 | MtNRT2.7 |
| Medicago truncatula high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01360052 0.1 | 1578 pb | XP_01345597 4.1 | 526 | MtNRT2.7-1 |
| Glycine soja High affinity nitrate transporter 2.4 | KN657816.1 | 1557 pb | KHN21500.1 | 519 | GsNRT2.4 |
| Vigna radiata var. Radiata PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_01464201 1.1 | 1590 pb | XP_01449749 7.1 | 530 | VrNRT2.4-1 |
| Cicer arietinum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00450599 2.2 | 1581 pb | XP_00450604 9.1 | 527 | CiaNRT2.1 |
| Lotus japonicus membrane transporter | AJ292342.1 | 1590 pb | CAC35729.1 | 530 | LjNRT2 |
| Arachis duranensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_01609696 3.1 | 1602 pb | XP_01595244 9.1 | 534 | AdNRT2.4 |
| Arachis ipaensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01633199 5.1 | 1602 pb | XP_01618748 1.1 | 534 | AiNRT2.4 |
| Cajanus cajan Nitrate transporter | CM003606.1 | 1521 pb | KYP68570.1 | 507 | CacNRT2 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Glycine soja High affinity nitrate transporter 2.4 | KN667408.1 | 1452 pb | KHN06867.1 | 484 | GsNRT2.4-1 |
| Cajanus cajan Nitrate transporter | KQ483432.1 | 1362 pb | KYP51777.1 | 454 | CacNRT2-2 |
| Glycine max PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_00353194 6.3 | 1524 pb | XP_00353199 4.1 | 508 | GmNRT2.5 |
| Glycine max PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_00355198 6.3 | 1530 pb | XP_00355203 4.1 | 510 | GmNRT2.5-1 |
| Cicer arietinum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00450951 0.2 | 1512 pb | XP_00450956 7.1 | 504 | CiaNRT2.5 |
| Medicago truncatula high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01359071 9.1 | 1530 pb | XP_01344617 3.1 | 510 | MtNRT2.7-2 |
| Vigna radiata var. radiata PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01463639 8.1 | 1509 pb | XP_01449188 4.1 | 503 | VrNRT2.5 |
| Cajanus cajan Nitrate transporter | KQ483617.1 | 1524 pb | KYP44687.1 | 508 | CacNRT2-1 |
| Arachis duranensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01610163 8.1 | 1524 pb | XP_01595712 4.1 | 508 | AdNRT2.5 |
| Arachis ipaensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01633477 2.1 | 1530 pb | XP_01619025 8.1 | 510 | AiNRT2.5 |
| Arachis duranensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01611601 4.1 | 1377 pb | XP_01597150 0.1 | 459 | AdNRT2.7 |
| Rosales | | | | | |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Ziziphus jujuba PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01601905 6.1 | 1590 pb | XP_01587454 2.1 | 530 | ZjNRT2.4 |
| Prunus mume PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00822799 0.2 | 1590 pb | XP_00822621 2.1 | 530 | PmNRT2.1 |
| Morus notabilis High affinity nitrate transporter 2.4 | XM_01011350 1.1 | 1596 pb | XP_01011180 3.1 | 532 | MnNRT2.4 |
| Fragaria vesca subsp. Vesca PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00430363 0.2 | 1590 pb | XP_00430367 8.1 | 530 | FvNRT2.1 |
| Fragaria vesca subsp. vesca PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: high- affinity nitrate transporter 2.1 | XM_01146235 9.1 | 1590 pb | XP_01146066 1.1 | 530 | FvNRT2.1-1 |
| Malus domestica PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00835172 2.1 | 1590 pb | XP_00834994 4.1 | 530 | MdNRT2.4 |
| Pyrus x bretschneideri PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00935862 5.1 | 1590 pb | XP_00935690 0.1 | 530 | PbNRT2.4 |
| Malus hupehensis Rehd high-affinity nitrate transporter NRT2.1 | FJ168536.1 | 1590 pb | ACN22072.1 | 530 | MhNRT2.1 |
| Pyrus x bretschneideri PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00935862 4.1 | 1581 pb | XP_00935689 9.1 | 527 | PbNRT2.4-1 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Prunus mume PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00822364 2.2 | 1512 pb | XP_00822186 4.1 | 504 | PmNRT2.5 |
| Ziziphus jujuba PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 isoform X1 | XM_01603914 0.1 | 1506 pb | XP_01589462 6.1 | 502 | ZjNRT2.5 |
| Malus hupehensis Rehd high-affinity nitrate transporter NRT2.5 | FJ168537.1 | 1512 pb | ACN22073.1 | 504 | MhNRT2.5 |
| Fragaria vesca subsp. vesca PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_00429893 8.2 | 1524 pb | XP_00429898 6.1 | 508 | FvNRT2.5 |
| Malus domestica PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00839147 8.1 | 1512 pb | XP_00838970 0.1 | 504 | MdNRT2.5 |
| Fragaria vesca subsp. vesca PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01146573 9.1 | 1497 pb | XP_01146404 1.1 | 499 | FvNRT2.5-1 |
| Prunus mume PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01679392 6.1 | 1404 pb | XP_01664941 2.1 | 468 | PmNRT2.7 |
| Pyrus x bretschneideri PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7-like isoform X2 | XM_00937891 2.1 | 1419 pb | XP_00937718 7.1 | 473 | PbNRT2.7 |
| Pyrus x bretschneideri PREDICTED: high affinity nitrate | XM_00937891 1.1 | 1419 pb | XP_00937718 6.1 | 473 | PbNRT2.7-1 |

| | | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|--|------------|
| transporter 2.7-like isoform X1 | | | | | | |
| Fragaria vesca subsp. vesca PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00430631 0.2 | 1413 pb | XP_00430635 8.1 | 471 | | FvNRT2.7 |
| Pyrus betulifolia high affinity nitrate transporter | KM369977.1 | 1419 pb | AKI29087.1 | 473 | | PbNRT2 |
| Pyrus bretschneideri PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00933583 6.1 | 1416 pb | XP_00933411 1.1 | 472 | | PbNRT2.7-2 |
| Malus domestica PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7-like | XM_00835951 1.1 | 1392 pb | XP_00835773 3.1 | 464 | | MdNRT2.7 |
| Ziziphus jujuba PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01602380 8.1 | 1374 pb | XP_01587929 4.1 | 458 | | ZjNRT2.7 |
| Curcubitales | | | | | | |
| Cucumis sativus high affinity nitrate transporter 2.4-like | NM_00128747 2.1 | 1590 pb | NP_00127440 1.1 | 530 | | CsNRT2.4 |
| Cucumis sativus PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like isoform X1 | XM_01166175 2.1 | 1590 pb | XP_01166005 4.1 | 530 | | CsNRT2.4-1 |
| Cucumis sativus high affinity nitrate transporter 2.4-like | NM_00128213 4.1 | 1590 pb | NP_00126906 3.1 | 530 | | CsNRT2.4-2 |
| Cucumis melo PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00844796 1.1 | 1515 pb | XP_00844618 3.1 | 505 | | CmNRT2.5 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|-------------|
| Cucumis sativus high affinity nitrate transporter 2.5 | NM_00130893 3.1 | 1497 pb | NP_00129586 2.1 | 499 | CsNRT2.5 |
| Myrtales | | | | | |
| Eucalyptus grandis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01003364 4.1 | 1590 pb | XP_01003194 6.1 | 530 | EugNRT2.4 |
| Eucalyptus grandis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01002519 1.1 | 1524 pb | XP_01002349 3.1 | 508 | EugNRT2.5 |
| Eucalyptus grandis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like isoform X2 | XM_01004628 8.1 | 1509 pb | XP_01004459 0.1 | 503 | EugNRT2.5-2 |
| Eucalyptus grandis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like isoform X1 | XM_01004628 7.1 | 1572 pb | XP_01004458 9.1 | 524 | EugNRT2.5-1 |
| Eucalyptus grandis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01003500 0.1 | 1572 pb | XP_01003330 2.1 | 524 | EugNRT2.7 |
| Sapindales | | | | | |
| Citrus clementina hypothetical protein CICLE_v10029836 mg | XM_00642444 7.1 | 1590 pb | XP_00642451 0.1 | 530 | CcINRT2 |
| Citrus sinensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00648797 9.2 | 1590 pb | XP_00648804 2.1 | 530 | CsiNRT2.4 |
| Citrus sinensis x Citrus trifoliata nitrate transporter | EF579917.1 | 1590 pb | ABQ57241.1 | 530 | CsiNRT2 |
| Citrus sinensis PREDICTED: high | XM_00649298 3.1 | 1590 pb | XP_00649304 6.1 | 530 | CsiNRT2.4-1 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| affinity nitrate transporter 2.4-like | | | | | |
| Citrus sinensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6-like | XM_00648797 8.1 | 1605 pb | XP_00648804 1.1 | 535 | CsiNRT2.6 |
| Citrus sinensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00648385 1.2 | 1521 pb | XP_00648391 4.1 | 507 | CsiNRT2.5 |
| Citrus sinensis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00647021 3.1 | 1413 pb | XP_00647027 6.1 | 471 | CsiNRT2.7 |
| Malvales | | | | | |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01262098 9.1 | 1590 pb | XP_01247644 3.1 | 530 | GrNRT2.1 |
| Theobroma cacao Nitrate transporter 2:1 | XM_00701676 7.1 | 1590 pb | XP_00701682 9.1 | 530 | TcNRT2.1 |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01687580 6.1 | 1590 pb | XP_01673129 5.1 | 530 | GhNRT2.1 |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01261612 8.1 | 1590 pb | XP_01247158 2.1 | 530 | GrNRT2.1-1 |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01689926 4.1 | 1590 pb | XP_01675475 3.1 | 530 | GhNRT2.1-1 |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high- | XM_01259146 3.1 | 1590 pb | XP_01244691 7.1 | 530 | GrNRT2.1-2 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| affinity nitrate transporter 2.1-like | | | | | |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01681790 2.1 | 1590 pb | XP_01667339 1.1 | 530 | GhNRT2.4 |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01263048 2.1 | 1590 pb | XP_01248593 6.1 | 530 | GrNRT2.4 |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01686769 3.1 | 1590 pb | XP_01672318 2.1 | 530 | GhNRT2.4-1 |
| Theobroma cacao Nitrate transporter 2.4 | XM_00702734 8.1 | 1566 pb | XP_00702741 0.1 | 522 | TcNRT2.4 |
| Theobroma cacao High affinity nitrate transporter 2.6 | XM_00701676 9.1 | 1602 pb | XP_00701683 1.1 | 534 | TcNRT2.6 |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01685803 1.1 | 1608 pb | XP_01671352 0.1 | 536 | GhNRT2.3 |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3 | XM_01261612 9.1 | 1608 pb | XP_01247158 3.1 | 536 | GrNRT2.3 |
| Theobroma cacao Nitrate transporter 2.5 | XM_00704466 3.1 | 1500 pb | XP_00704472 5.1 | 500 | TcNRT2.5 |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01685991 7.1 | 1518 pb | XP_01671540 6.1 | 506 | GhNRT2.5 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Gossypium raimondii PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01258281 7.1 | 1518 pb | XP_01243827 1.1 | 506 | GrNRT2.5 |
| Gossypium hirsutum high affinity nitrate transporter 2.5-like | NM_00132729 0.1 | 1524 pb | NP_00131421 9.1 | 508 | GhNRT2.5-1 |
| Theobroma cacao Nitrate transporter2.5 isoform 1 | XM_00704466 4.1 | 1512 pb | XP_00704472 6.1 | 504 | TcNRT2.5-1 |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01258919 4.1 | 1365 pb | XP_01244464 8.1 | 455 | GrNRT2.7 |
| Gossypium arboreum High affinity nitrate transporter 2.7 -like protein | KN400064.1 | 1365 pb | KHG13680.1 | 455 | GaNRT2.7 |
| Gossypium hirsutum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7-like | XM_01687201 0.1 | 1365 pb | XP_01672749 9.1 | 455 | GhNRT2.7 |
| Theobroma cacao High affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00703148 2.1 | 1194 pb | XP_00703154 4.1 | 398 | TcNRT2.7 |
| Brassicales | | | | | |
| Brassica napus PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01379985 7.1 | 1590 pb | XP_01365531 1.1 | 530 | BnNRT2.1 |
| Capsella rubella hypothetical protein CARUB_v10008824 mg | XM_00630716 2.1 | 1590 pb | XP_00630722 4.1 | 530 | CruNRT2 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|-----------|
| Brassica oleracea var. oleracea PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01374767 0.1 | 1590 pb | XP_01360312 4.1 | 530 | BoNRT2.1 |
| Camelina sativa PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01047729 8.1 | 1590 pb | XP_01047560 0.1 | 530 | CasNRT2.1 |
| Brassica rapa subsp. chinensis high-affinity nitrate transporter | JN182862.1 | 1590 pb | AFK65609.1 | 530 | BrNRT2 |
| Arabidopsis lyrata subsp. lyrata predicted protein | XM_00286465 6.1 | 1590 pb | XP_00286470 2.1 | 530 | AINRT2 |
| Arabidopsis thaliana nitrate transporter 2:1 | NM_100684.2 | 1590 pb | NP_172288.1 | 530 | AtNRT2.1 |
| Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata ATNRT2:1 | XM_00288963 3.1 | 1590 pb | XP_00288967 9.1 | 530 | AINRT2.1 |
| Brassica rapa PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00912014 6.1 | 1587 pb | XP_00911839 4.1 | 529 | BrNRT2.1 |
| Tarenaya hassleriana PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01054427 9.1 | 1590 pb | XP_01054258 1.1 | 530 | ThNRT2.1 |
| Arabis alpina hypothetical protein AALP_AA1G08370 0 | CM002869.1 | 1590 pb | KFK43126.1 | 530 | AaNRT2 |
| Brassica napus high-affinity nitrate transporter | AJ293028.1 | 1590 pb | CAC05338.1 | 530 | BnNRT2 |
| Arabidopsis thaliana nitrate transporter 2.4 | NM_125470.1 | 1581 pb | NP_200885.1 | 527 | AtNRT2.4 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|-------------|
| Eutrema salsugineum hypothetical protein EUTSA_v10007342 mg | XM_00641766 6.1 | 1590 pb | XP_00641772 9.1 | 530 | EsNRT2 |
| Camelina sativa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_01045843 8.1 | 1590 pb | XP_01045674 0.1 | 530 | CasNRT2.4 |
| Camelina sativa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like isoform X2 | XM_01048542 9.1 | 1590 pb | XP_01048373 1.1 | 530 | CasNRT2.4-2 |
| Tarenaya hassleriana PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01054301 4.1 | 1596 pb | XP_01054131 6.1 | 532 | ThNRT2.4 |
| Camelina sativa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like isoform X1 | XM_01048542 8.1 | 1608 pb | XP_01048373 0.1 | 536 | CasNRT2.4-1 |
| Brassica oleracea var. Oleracea PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_01375478 1.1 | 1581 pb | XP_01361023 5.1 | 527 | BoNRT2.4 |
| Brassica rapa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4 | XM_00912236 4.1 | 1581 pb | XP_00912061 2.1 | 527 | BrNRT2.4 |
| Brassica juncea nitrate transporter 2.1, partial | KT119585.1 | 1512 pb | AKQ98333.1 | 504 | BjNRT2.1 |
| Arabidopsis lyrata subsp. lyrata AINRT2:1 | XM_00289238 9.1 | 1572 pb | XP_00289243 5.1 | 524 | AINRT2.1-1 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|-----------|
| Arabidopsis thaliana nitrate transporter 2.2 | NM_100685.1 | 1566 pb | NP_172289.1 | 522 | AtNRT2.2 |
| Arabidopsis thaliana high-affinity nitrate transporter ACH2 | AF019749.1 | 1566 pb | AAC35884.1 | 522 | AtACH2 |
| Arabidopsis lyrata subsp. lyrata ATNRT2.3 | XM_00287733 4.1 | 1626 pb | XP_00287738 0.1 | 542 | AINRT2.3 |
| Camelina sativa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6-like | XM_01050889 2.1 | 1626 pb | XP_01050719 4.1 | 542 | CasNRT2.6 |
| Tarenaya hassleriana PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6 | XM_01054301 3.1 | 1620 pb | XP_01054131 5.1 | 540 | ThNRT2.6 |
| Brassica napus PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6-like | XM_01381481 0.1 | 1638 pb | XP_01367026 4.1 | 546 | BnNRT2.6 |
| Camelina sativa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01045844 5.1 | 1620 pb | XP_01045674 7.1 | 540 | CasNRT2.3 |
| Arabidopsis thaliana nitrate transporter 2.3 | NM_125471.1 | 1617 pb | NP_200886.1 | 539 | AtNRT2.3 |
| Brassica oleracea var. oleracea PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6-like | XM_01374794 3.1 | 1638 pb | XP_01360339 7.1 | 546 | BoNRT2.6 |
| Arabidopsis thaliana high affinity nitrate transporter 2.6 | NM_114375.4 | 1626 pb | NP_190092.1 | 542 | AtNRT2.6 |
| Brassica rapa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_00912236 5.1 | 1608 pb | XP_00912061 3.1 | 536 | BrNRT2.3 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| Arabidopsis lyrata subsp. lyrata ATNRT2.3 | XM_00286465 7.1 | 1617 pb | XP_00286470 3.1 | 539 | AINRT2.3-1 |
| Brassica napus PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6 | XM_01382185 0.1 | 1623 pb | XP_01367730 4.1 | 541 | BnNRT2.6-1 |
| Brassica rapa PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.6-like | XM_00915184 6.1 | 1614 pb | XP_00915009 4.1 | 538 | BrNRT2.6 |
| Arabidopsis lyrata subsp. lyrata ATNRT2.6 | XM_00287733 3.1 | 1626 pb | XP_00287737 9.1 | 542 | AINRT2.6 |
| Brassica oleracea var. oleracea PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01375526 4.1 | 1611 pb | XP_01361071 8.1 | 537 | BoNRT2.3 |
| Brassica napus PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01384862 8.1 | 1701 pb | XP_01370408 2.1 | 567 | BnNRT2.3 |
| Arabidopsis thaliana high affinity nitrate transporter 2.7 | NM_121461.3 | 1479 pb | NP_196961.1 | 493 | AtNRT2.7 |
| Carica papaya HIGH AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 2.3-RELATED | PTHR23515:S F2 | 1593 pb | PTHR23515:S F2 | 531 | CpaNRT2.3 |
| Carica papaya HIGH AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 2.5-RELATED | PTHR23515:S F3 | 1605 pb | PTHR23515:S F3 | 535 | CpaNRT2.5 |
| Carica papaya HIGH AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 2.7-RELATED | PTHR23515:S F5 | 1326 pb | PTHR23515:S F5 | 442 | CpaNRT2.7 |

| Caryophyllales | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|-----------|
| Beta vulgaris subsp. vulgaris PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01068702 7.1 | 1581 pb | XP_01068532 9.1 | 527 | BvNRT2.1 |
| Beta vulgaris subsp. vulgaris PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01068559 8.1 | 1587 pb | XP_01068390 0.1 | 529 | BvNRT2.4 |
| Beta vulgaris subsp. vulgaris PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01069756 3.1 | 1503 pb | XP_01069586 5.1 | 501 | BvNRT2.5 |
| Spinacia oleracea high affinity nitrate transporter | EF143581.3 | 1524 pb | ABL89187.3 | 508 | SoNRT2 |
| Gentianales | | | | | |
| Coffea canephora unnamed protein product | HG739108.1 | 1590 pb | CDP07064.1 | 530 | CcaNRT2 |
| Coffea canephora unnamed protein product | HG739108.1 | 1596 pb | CDP07062.1 | 532 | CcaNRT2-1 |
| Coffea canephora unnamed protein product | HG739158.1 | 1518 pb | CDP13197.1 | 506 | CcaNRT2-2 |
| Solanales | | | | | |
| Capsicum chinense PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | | 1590 pb | | 530 | CcNRT2.1 |
| Capsicum annuum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01672237 7.1 | 1590 pb | XP_01657786 3.1 | 530 | CaNRT2.1 |
| Solanum pennellii PREDICTED: high | XM_01522320 0.1 | 1590 pb | XP_01507868 6.1 | 530 | SpeNRT2.4 |

| | | | | | |
|---|----------------|---------|----------------|-----|------------|
| affinity nitrate transporter 2.4-like | | | | | |
| Solanum lycopersicum putative high-affinity nitrate transporter | AF092655.1 | 1590 pb | AAF00053.1 | 530 | SINRT2 |
| Solanum lycopersicum nitrate transporter 2.1 | NM_001279334.1 | 1590 pb | NP_001266263.1 | 530 | SINRT2.1 |
| Nicotiana sylvestris PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like isoform X1 | XM_009803968.1 | 1590 pb | XP_009802270.1 | 530 | NsNRT2.4-1 |
| Solanum tuberosum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_006347131.2 | 1590 pb | XP_006347193.1 | 530 | StuNRT2.4 |
| Nicotiana tabacum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_016613860.1 | 1590 pb | XP_016469346.1 | 530 | NtaNRT2.4 |
| Nicotiana plumbaginifolia nitrate transporter | Y08210.1 | 1590 pb | CAA69387.1 | 530 | NpNRT2.1 |
| Nicotiana tomentosiformis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_009596776.1 | 1590 pb | XP_009595071.1 | 530 | NtoNRT2.4 |
| Nicotiana sylvestris PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_009792703.1 | 1590 pb | XP_009791005.1 | 530 | NsNRT2.4 |
| Capsicum annuum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_016693458.1 | 1590 pb | XP_016548944.1 | 530 | CaNRT2.4 |
| Solanum lycopersicum NRT2;3 protein | NM_001247198.1 | 1593 pb | NP_001234127.1 | 531 | SINRT2.3 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|-----------|
| Nicotiana tabacum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01657686 1.1 | 1599 pb | XP_01643234 7.1 | 533 | NtaNRT2.1 |
| Nicotiana tomentosiformis PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00959732 2.1 | 1599 pb | XP_00959561 7.1 | 533 | NtoNRT2.1 |
| Nicotiana sylvestris PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_00978341 1.1 | 1599 pb | XP_00978171 3.1 | 533 | NsNRT2.1 |
| Solanum lycopersicum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_00425135 7.2 | 1575 pb | XP_00425140 5.1 | 525 | SINRT2.4 |
| Capsicum annuum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01669119 2.1 | 1560 pb | XP_01654667 8.1 | 520 | CaNRT2.3 |
| Solanum tuberosum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00636708 9.2 | 1602 pb | XP_00636715 1.1 | 534 | StuNRT2.5 |
| Nicotiana tabacum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01661942 6.1 | 1506 pb | XP_01647491 2.1 | 502 | NtaNRT2.5 |
| Nicotiana sylvestris PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_00979774 8.1 | 1482 pb | XP_00979605 0.1 | 494 | NsNRT2.5 |
| Capsicum annuum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01670107 2.1 | 1509 pb | XP_01655655 8.1 | 503 | CaNRT2.5 |
| Nicotiana tomentosiformis PREDICTED: high | XM_00962738 1.1 | 1452 pb | XP_00962567 6.1 | 484 | NtoNRT2.5 |

| | | | | | |
|---|--------------------|---------|--------------------|-----|------------|
| affinity nitrate transporter 2.5 | | | | | |
| Solanum pennellii PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01520895 3.1 | 1515 pb | XP_01506443 9.1 | 505 | SpeNRT2.7 |
| Solanum tuberosum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00635709 3.2 | 1389 pb | XP_00635715 5.1 | 463 | StuNRT2.7 |
| Solanum lycopersicum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 isoform X1 | XM_00423327 9.2 | 1506 pb | XP_00423332 7.2 | 502 | SINRT2.7-1 |
| Nicotiana sylvestris PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00975958 1.1 | 1389 pb | XP_00975788 3.1 | 463 | NsNRT2.7 |
| Nicotiana tabacum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01665288 3.1 | 1389 pb | XP_01650836 9.1 | 463 | NtaNRT2.7 |
| Capsicum annuum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_01670360 4.1 | 1377 pb | XP_01655909 0.1 | 459 | CaNRT2.7 |
| Nicotiana tomentosiformis PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7 | XM_00961602 8.1 | 1398 pb | XP_00961432 3.1 | 466 | NtoNRT2.7 |
| Lamiales | | | | | |
| Sesamum indicum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.4-like | XM_01109164 2.1 | 1590 pb | XP_01108994 4.1 | 530 | SiNRT2.4 |
| Erythranthe guttata PREDICTED: high | XM_01298288 0.1 | 1584 pb | XP_01283833 4.1 | 528 | ErgNRT2.4 |

| | | | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|-----|-----------|
| affinity nitrate transporter 2.4-like | | | | | |
| Sesamum indicum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01109094 5.1 | 1581 pb | XP_01108924 7.1 | 527 | SiNRT2.1 |
| Dorcoceas hygrometricum Nitrate transporter 2:1 | KQ995304.1 | 1587 pb | KZV47210.1 | 529 | DhNRT2.1 |
| Erythranthe guttata PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 2.1-like | XM_01300149 5.1 | 1560 pb | XP_01285694 9.1 | 520 | ErgNRT2.1 |
| Dorcoceas hygrometricum nitrate transporter | KV011790.1 | 1548 pb | KZV26056.1 | 516 | DhNRT2.1 |
| Sesamum indicum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.3-like | XM_01109173 7.1 | 1566 pb | XP_01109003 9.1 | 522 | SiNRT2.3 |
| Dorcoceas hygrometricum high affinity nitrate transporter 2.4-like | KV000872.1 | 1575 pb | KZV39920.1 | 525 | DhNRT2.4 |
| Sesamum indicum PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5 | XM_01107282 2.1 | 1515 pb | XP_01107112 4.1 | 505 | SiNRT2.5 |
| Erythranthe guttata PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.5-like | XM_01300000 0.1 | 1512 pb | XP_01285545 4.1 | 504 | ErgNRT2.5 |
| Dorcoceas hygrometricum high affinity nitrate transporter 2.5-like | KV011871.1 | 1521 pb | KZV25489.1 | 507 | DhNRT2.5 |
| Erythranthe guttata PREDICTED: high affinity nitrate transporter 2.7-like | XM_01299448 2.1 | 1383 pb | XP_01284993 6.1 | 461 | ErgNRT2.7 |

| Asterales | | | | | |
|--|--------------------|---------|------------|-----|-----------|
| Cynara cardunculus var. scolymus Major facilitator superfamily | LEKV0100339 8.1 | 1590 pb | KVI00171.1 | 530 | CycNRT2 |
| Chrysanthemum x morifolium nitrate transporter 2.3, partial | KT203961.1 | 1578 pb | AMR68972.1 | 526 | ChmNRT2.3 |
| Chrysanthemum x morifolium nitrate transporter 2.1 | JN408066.1 | 1590 pb | AEV89747.1 | 530 | ChmNRT2.1 |
| Chrysanthemum x morifolium nitrate transporter 2.6, partial | KT203963.1 | 1587 pb | AMR68974.1 | 529 | ChmNRT2.6 |
| Chrysanthemum sp. CSG-2014 nitrate transporter | AB921547.1 | 1590 pb | BAP74415.1 | 530 | CmNRT2 |
| Chrysanthemum x morifolium nitrate transporter 2.2, partial | KT203960.1 | 1590 pb | AMR68971.1 | 530 | ChmNRT2.2 |
| Chrysanthemum x morifolium nitrate transporter 2.5, partial | KT203962.1 | 1509 pb | AMR68973.1 | 503 | ChmNRT2.5 |
| Chrysanthemum x morifolium nitrate transporter 2.7, partial | KT203964.1 | 1356 pb | AMR68975.1 | 452 | ChmNRT2.7 |
| Apiales | | | | | |
| Daucus carota high-affinity nitrate transporter, partial | AY081213.1 | 1605 pb | AAL99362.1 | 535 | DcNRT2 |

Cuadro A2. Proteínas pertenecientes a la familia NAR2 de diferentes organismos utilizadas para la construcción del árbol filogenético.

| Organismo | No. De accesoión gen | Tamaño gen | No. Accesion proteína | Tamaño proteína | Nomenclatura |
|--|----------------------|------------|-----------------------|-----------------|--------------|
| VIPIRIDIPLANTAE | | | | | |
| Chlorophyte | | | | | |
| Chlamydomonas reinhardtii High-affinity nitrate transporter accessory (NAR2) | Cre09.g410900.t1.2 | 780 pb | Cre09.g410900.t1.2 | 259 | CrNAR2 |
| Klebsormidium flaccidum nitrate transmembrane transporters | DF237003.1 | 624 pb | GAQ80449.1 | 208 | KfNAR1 |
| Bryophyte | | | | | |
| Physcomitrella patens | XM_001770981.1 | 618 pb | XP_001771033.1 | 206 | PpNAR1 |
| Physcomitrella patens | XM_001768102.1 | 627 pb | XP_001768154.1 | 209 | PpNAR2 |
| Physcomitrella patens | XM_001755242.1 | 618 pb | XP_001755294.1 | 206 | PpNAR3 |
| Sphagnum fallax HIGH-AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 3.1-RELATED | 0114s0049.1 | 642 pb | 0114s0049.1 | 213 | SfaNAR |
| Tracheophyte | | | | | |
| Lycopodiophyte | | | | | |
| Salaginella moellendorffii | XM_002978243.1 | 624 pb | XP_002978289.1 | 208 | SmNAR1 |
| Salaginella moellendorffii | XM_002966237.1 | 624 pb | XP_002966283.1 | 208 | SmNAR2 |
| Amborellales | | | | | |
| Amborella trichopoda | XM_006852266.2 | 606 pb | XP_006852328.1 | 202 | AtrNAR1 |

| | | | | | |
|--|----------------|--------|----------------|-----|----------|
| Amborella trichopoda | KI392534.1 | 615 pb | ERN14489.1 | 205 | AtrNAR1 |
| Amborella trichopoda | XM_006828312.2 | 480 pb | XP_006828375.2 | 159 | AtrNAR3 |
| Alismatales | | | | | |
| Spirodela polyrhiza High-affinity nitrate transporter accessory | 13G0039300 | 597 pb | 13G0039300 | 198 | SpipoNAR |
| Arecales | | | | | |
| Phoenix dactylifera high affinity nitrate transporter 3.2 like | XM_008795512.1 | 606 pb | XP_008793734.1 | 201 | PhdNAR |
| Elaeis guineensis high affinity nitrate transporter activating protein 2.1 | XM_010931613.1 | 612 pb | XP_010929915.1 | 203 | ElgNAR |
| Poales | | | | | |
| Brachypodium distachyon | XM_003575234.3 | 603 pb | XP_003575282.1 | 201 | BdNAR1 |
| Brachypodium distachyon | XM_003575233.3 | 600 pb | XP_003575281.1 | 200 | BdNAR2 |
| Brachypodium stacei | 04G150000.1 | 606 pb | 04G150000.1 | 201 | BsNAR |
| Brachypodium stacei | K001200.1 | 816 pb | K001200.1 | 271 | BsNAR1 |
| Oryza sativa (hypothetical protein OsI_07902 [Oryza sativa Indica Group]) | CM000127.1 | 618 pb | gb EAY86523.1 | 206 | OsiNAR1 |
| Oryza sativa hypothetical protein OsJ_15203 | CM000141.1 | 636 pb | gb EAZ31107.1 | 212 | OsjNAR2 |
| Oryza sativa Os02g0595900 [Oryza sativa Japonica Group] | NM_001053852.2 | 618 pb | NP_001047317.1 | 206 | OsjNAR1 |
| Oryza sativa (hypothetical protein | NM_001059634.1 | 630 pb | NP_001053099.1 | 210 | OsiNAR2 |

| | | | | | |
|---|----------------|--------|----------------|-----|-------------|
| Osl_07902 [Oryza sativa Indica Group) | | | | | |
| Oryza sativa hypothetical protein Osl_16333 (Oryza sativa Indica Group) | CM000129.1 | 630 pb | EAY94557.1 | 210 | OsiNAR |
| Oryza brachyantha (PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like) | XM_006647389.1 | 624 pb | XP_006647452.1 | 208 | ObrNAR |
| Panicum virgatum High-affinity nitrate transporter accessory (NAR2) | Ab02191.1 | 612 pb | Ab02191.1 | 203 | PavirNAR2.1 |
| Panicum virgatum High-affinity nitrate transporter accessory (NAR2) | Aa01456.1 | 615 pb | Aa01456.1 | 204 | PavirNAR2.2 |
| Panicum hallii High-affinity nitrate transporter accessory (NAR2) | J01172.1 | 603 pb | J01172.1 | 201 | PhaNAR2 |
| Setaria italica | XM_004952920.2 | 609 pb | XP_004952977.1 | 203 | SeiNAR1 |
| Setaria italica | XM_004952921.3 | 609 pb | XP_004952978.1 | 203 | SeiNAR |
| Setaria viridis | 1G222200.1 | 612 pb | 1G222200.1 | 203 | SviNAR2 |
| Setaria viridis | 1G222400.1 | 612 pb | 1G222400.1 | 203 | SviNAR2.1 |
| Sorghum bicolor hypothetical protein SORBIDRAFT_04g024870 | XM_002454073.1 | 633 pb | XP_002454118.1 | 211 | SbNAR1 |
| Sorghum bicolor hypothetical protein SORBIDRAFT_06g020180 | XM_002448001.1 | 648 pb | XP_002448046.1 | 216 | SbNAR2 |
| Zea mays high affinity nitrate transporter | CM000781.3 | 609 pb | gb AFW72145.1 | 203 | ZmNAR1 |
| Zea mays high affinity nitrate transporter precursor; NAR2.1 | NM_001112459.1 | 609 pb | NP_001105929.1 | 203 | ZmNAR2.1 |

| | | | | | |
|--|----------------|--------|----------------|-----|----------|
| Zea mays high affinity nitrate transporter precursor | NM_001112454.1 | 585 pb | NP_001105924.1 | 195 | ZmNAR2.2 |
| Zea mays component of high affinity nitrate transporter | EU957969.1 | 591 pb | gb ACG30087.1 | 197 | ZmNAR2 |
| Zea mays TPA: high-affinity nitrate transporter | GK000032.3 | 591 pb | DAA37306.1 | 197 | ZmNAR3 |
| Triticum aestivum | AY763795.1 | 597 pb | gb AAV35211.1 | 199 | TaNAR2.2 |
| Triticum aestivum | AY763794.1 | 594 pb | gb AAV35210.1 | 198 | TaNAR2.1 |
| Triticum urartu hypothetical protein TRIUR3_20504 | KD130306.1 | 753 pb | gb EMS58629.1 | 251 | TuNAR1 |
| Hordeum vulgare subsp. vulgare | AY253448.1 | 591 pb | gb AAP31850.1 | 197 | HvNAR2.1 |
| Hordeum vulgare subsp. Vulgare | AY253449.1 | 603 pb | gb AAP31851.1 | 201 | HvNAR2.2 |
| Hordeum vulgare subsp. vulgare | AY253450.1 | 594 pb | gb AAP31852.1 | 198 | HvNAR2.3 |
| Aegilops tauschii hypothetical protein F775_20186 | KD504054.1 | 603 pb | gb EMT31108.1 | 201 | AetNAR1 |
| Ananas comosus high affinity nitrate transporter activating protein 2.1 | LSRQ01002321.1 | 549 pb | OAY74736.1 | 182 | AncNAR |
| Zingiberales | | | | | |
| Musa acuminata | XM_009405962.1 | 600 pb | XP_009404237.1 | 200 | MaNAR1 |
| Musa acuminata | XM_009381674.1 | 612 pb | XP_009379949.1 | 204 | MaNAR2 |
| Musa acuminata subsp. Malaccensis PREDICTED high-affinity nitrate transporter-activating protein 2.1 | XM_009417698.1 | 594 pb | XP_009415973.1 | 198 | MaNAR2.1 |
| Eudicot | | | | | |

| | | | | | |
|--|-----------------------|--------|-----------------------|-----|----------|
| Ranunculales | | | | | |
| Aquilegia coerulea Goldsmith | Aquca_011_00471. 1 | 633 pb | Aquca_011_00471. 1 | 210 | AqNAR |
| Proteales | | | | | |
| Nelumbo nucifera PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_010250375.1 | 618 pb | XP_010248677.1 | 206 | NnNAR1 |
| Nelumbo nucifera PREDICTED: high- affinity nitrate transporter- activating protein 2.1-like | XM_010252729.1 | 615 pb | XP_010251031.1 | 205 | NnNAR2 |
| Saxifragales | | | | | |
| Kalanchoe laxiflora HIGH-AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 3.1-RELATED | 0204s0075.1 | 618 pb | 0204s0075.1 | 205 | KalaxNAR |
| Vitales | | | | | |
| Vitis vinifera PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1 | XM_002279825.3 | 603 pb | XP_002279861.1 | 201 | VvNAR1 |
| Malpighiales | | | | | |
| Salix purpurea; component of high affinity nitrate transporter | V1A.0792s0030.1 | 618 pb | V1A.0792s0030.1 | 205 | SpurNAR |
| Salix purpurea; component of high affinity nitrate transporter | V1A.1820s0020.1 | 615 pb | V1A.1820s0020.1 | 205 | SpurNAR1 |
| Salix purpurea; component of high affinity nitrate transporter | V1A.0011s0700.1 | 612 pb | V1A.0011s0700.1 | 203 | SpurNAR2 |

| | | | | | |
|--|----------------|--------|----------------|-----|---------|
| Linum usitatissimum HIGH-AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 3.1-RELATED | 10041950 | 648 pb | 10041950 | 215 | LusNAR1 |
| Populus euphratica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_011047943.1 | 612 pb | XP_011046245.1 | 204 | PeNAR1 |
| Populus euphratica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_011016985.1 | 600 pb | XP_011015287.1 | 200 | PeNAR2 |
| Populus euphratica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_011042161.1 | 600 pb | XP_011040463.1 | 200 | PeNAR3 |
| Populus euphratica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_011047944.1 | 612 pb | XP_011046246.1 | 204 | PeNAR4 |
| Ricinus communis conserved hypothetical protein | XM_002511259.1 | 621 pb | XP_002511305.1 | 207 | RcNAR1 |
| Jatropha cucar PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_012224574.1 | 612 pb | XP_012079964.1 | 206 | JcNAR1 |
| Populus trichocarpa hypothetical protein POPTR_0012s0911 0g | XM_002318052.2 | 615 pb | XP_002318088.2 | 205 | PtNAR2 |
| Populus trichocarpa hypothetical protein POPTR_0015s0966 0g | XM_002321604.2 | 618 pb | XP_002321640.2 | 206 | PtNAR1 |
| Populus trichocarpa hypothetical protein POPTR_0015s0967 0g | XM_006374480.1 | 615 pb | XP_006374542.1 | 205 | PtNAR |

| | | | | | |
|--|-------------------|--------|-------------------|-----|---------|
| Manihot esculenta | Manes.06G111400.1 | 615 pb | Manes.06G111400.1 | 205 | MaeNAR |
| Manihot esculenta | Manes.14G059800.1 | 621 pb | Manes.14G059800.1 | 207 | MaeNAR1 |
| Fabales | | | | | |
| Glycine max PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XP_003549822.1 | 624 pb | XP_003549822.1 | 208 | GmNAR1 |
| Medicago truncatula component of high affinity nitrate transporter | XM_013602279.1 | 618 pb | XP_013457733.1 | 206 | MtNAR1 |
| Phaseolus vulgaris hypothetical protein PHAVU_003G205900g | XM_007155428.1 | 621 pb | XP_007155490.1 | 207 | PhvNAR1 |
| Vigna radiata var. Radiata PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1 | XM_014635094.1 | 624 pb | XP_014490580.1 | 208 | VirNAR |
| Vigna angularis hypothetical protein LR48_Vigan01g230400 | CM003371.1 | 624 pb | KOM32748.1 | 208 | VgaNAR |
| Lotus japonicus component of high affinity nitrate transporter | AB353299.1 | 606 pb | BAI63584.1 | 202 | LjNAR |
| Medicago truncatula component of high affinity nitrate transporter | XM_013602278.1 | 618 pb | XP_013457732.1 | 206 | MtNAR2 |
| Glycine max PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_003525542.3 | 624 pb | XP_003525590.1 | 208 | GmNAR2 |
| Rosales | | | | | |

| | | | | | |
|--|----------------|--------|----------------|-----|---------|
| Morus notabilis hypothetical protein L484_018973 | XM_010104652.1 | 672 pb | XP_010102954.1 | 224 | MnNAR1 |
| Fragaria vesca subsp. Vesca PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_004299101.2 | 630 pb | XP_004299149.1 | 210 | FvNAR3 |
| Fragaria vesca subsp. Vesca PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_004300968.1 | 672 pb | XP_004301016.1 | 224 | FvNAR1 |
| Malus domestica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_008394660.1 | 609 pb | XP_008392882.1 | 203 | MdNAR1 |
| Malus domestica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_008362554.1 | 609 pb | XP_008360776.1 | 203 | MdNAR2 |
| Malus domestica PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_008376154.1 | 612 pb | XP_008374376.1 | 204 | MdNAR3 |
| Prunus persica hypothetical protein PRUPE_ppa011598 mg | XM_007209551.1 | 612 pb | XP_007209613.1 | 204 | PrpNAR1 |
| Prunus mume PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1 | XM_008241123.1 | 612 pb | XP_008239345.1 | 204 | PrmNAR1 |
| Pyrus x bretschneideri-high affinity nitrate transporter 3.2- like | XM_009364651.1 | 609 pb | XP_009362926.1 | 203 | PybNAR |
| Ziziphus jujuba high affinity nitrate transporter 3.2 like | XM_016039072.1 | 627 pb | XP_015894558.1 | 209 | ZjnAR1 |

| | | | | | |
|---|----------------|--------|----------------|-----|---------|
| Ziziphus jujuba high affinity nitrate transporter 3.1like | XM_016027005.1 | 618 pb | XP_015882491.1 | 205 | ZjNAR |
| Curcubitales | | | | | |
| Cucumis melo PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_008440789.1 | 639 pb | XP_008439011.1 | 213 | CmNAR1 |
| Cucumis sativus high-affinity nitrate transporter 3.1-like precursor | NM_001280690.1 | 633 pb | NP_001267619.1 | 211 | CusNAR1 |
| Myrtales | | | | | |
| Eucalyptus grandis PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1 | XM_010028891.1 | 615 pb | XP_010027193.1 | 205 | EugNAR1 |
| Sapindales | | | | | |
| Citrus sinensis hypothetical protein CISIN_1g028785mg | KK784892.1 | 612 pb | KDO69464.1 | 204 | CsNAR1 |
| Malvales | | | | | |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.2 | XM_012613236.1 | 681 pb | XP_012468690.1 | 227 | GraNAR1 |
| Gossypium arboreum High-affinity nitrate transporter 3.2 -like protein | KN410187.1 | 609 pb | KHG18250.1 | 203 | GraNAR2 |
| Gossypium raimondii PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_012615470.1 | 609 pb | XP_012470924.1 | 203 | GraNAR3 |
| Theobroma cacao Nitrate | XM_007037707.1 | 606 pb | XP_007037769.1 | 202 | TcNAR1 |

| | | | | | |
|---|----------------|--------|----------------|-----|-----------|
| transmembrane transporters | | | | | |
| Brassicales | | | | | |
| Arabidopsis thaliana mRNA for putative component of high affinity nitrate transporter (nar 2.2 gen) | AJ310933.1 | 630 pb | CAC36942.1 | 210 | AtNAR2.2 |
| Arabidopsis thaliana high-affinity nitrate transporter 3.1 | NM_124399.3 | 630 pb | NP_199831.1 | 210 | AtNAR3.1 |
| Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata wound-responsive 3 | XM_002863998.1 | 630 pb | XP_002864044.1 | 210 | AlyNAR |
| Arabidopsis thaliana putative component of high affinity nitrate transporter | AY085586.1 | 630 pb | AAM62807.1 | 210 | AtNAR |
| Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata predicted protein | XM_002867604.1 | 621 pb | XP_002867650.1 | 207 | AlyNAR1 |
| Brassica rapa PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1 | XM_009135800.1 | 618 pb | XP_009134048.1 | 206 | BraNAR3.1 |
| Brassica oleracea var. Oleracea PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1 | XM_013770616.1 | 618 pb | XP_013626070.1 | 206 | BoINAR |
| Brassica napus PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013887445.1 | 618 pb | XP_013742899.1 | 206 | BnaNAR1 |
| Brassica rapa PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.2 isoform X1 | XM_009140204.1 | 627 pb | XP_009138452.1 | 209 | BraNAR5 |

| | | | | | |
|--|----------------|--------|----------------|-----|---------|
| Brassica rapa PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_009120647.1 | 636 pb | XP_009118895.1 | 212 | BraNAR4 |
| Brassica napus PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013855114.1 | 618 pb | XP_013710568.1 | 206 | BnaNAR |
| Brassica napus PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.2-like isoform X1 | XM_013815773.1 | 624 pb | XP_013671227.1 | 208 | BnaNAR2 |
| Brassica oleracea var. Oleracea PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.2 isoform X1 | XM_013754924.1 | 624 pb | XP_013610378.1 | 208 | BoINAR2 |
| Brassica rapa PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_009129114.1 | 636 pb | XP_009127362.1 | 212 | BraNAR |
| Brassica oleracea var. Oleracea PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013754556.1 | 636 pb | XP_013610010.1 | 212 | BoINAR3 |
| Brassica rapa PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_009152417.1 | 618 pb | XP_009150665.1 | 206 | BraNAR3 |
| Brassica oleracea var. Oleracea PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013763479.1 | 636 pb | XP_013618933.1 | 212 | BoINAR4 |
| Brassica napus PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013791264.1 | 636 pb | XP_013646718.1 | 212 | BnaNAR4 |

| | | | | | |
|--|------------------------------|--------|------------------------------|-----|---------|
| Brassica napus PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013845449.1 | 636 pb | XP_013700903.1 | 212 | BnaNAR3 |
| Brassica oleracea var. Oleracea PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013736093.1 | 573 pb | XP_013591547.1 | 191 | BolNAR1 |
| Brassica napus PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013813655.1 | 609 pb | XP_013669109.1 | 203 | BnaNAR5 |
| Brasica rapa FPsc | J00661.1 | 576 pb | J00661.1 | 191 | BraNAR1 |
| Brasica rapa FPsc | A02445.1 | 621 pb | A02445.1 | 206 | BraNAR2 |
| Carica papaya HIGH-AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 3.1-RELATED | evm.model.superco ntig_968.2 | 612 pb | evm.model.superco ntig_968.2 | 203 | CpaNAR |
| Camelina sativa | XM_010443404.1 | 633 pb | XP_010441706.1 | 210 | CsaNAR |
| Camelina sativa | XM_010440679.1 | 627 pb | XP_010438981.1 | 208 | CsaNAR2 |
| Camelina sativa | XM_010450227.1 | 627 pb | XP_010448529.1 | 208 | CsaNAR4 |
| Camelina sativa | XM_010435430.1 | 627 pb | XP_010433732.1 | 208 | CsaNAR6 |
| Camelina sativa | XM_010435432.1 | 627 pb | XP_010433734.1 | 208 | CsaNAR7 |
| Camelina sativa | XM_010440680.1 | 603 pb | XP_010438982.1 | 200 | CsaNAR8 |
| Camelina sativa | XM_010450228.1 | 612 pb | XP_010448530.1 | 203 | CsaNAR9 |
| Boechera stricta | 15774s0161.1 | 633 pb | 15774s0161.1 | 210 | BstNAR |
| Caryophyllales | | | | | |
| Beta vulgaris subsp. Vulgaris PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.2 | XM_010669198.1 | 594 pb | XP_010667500.1 | 198 | BvNAR1 |
| Gentianales | | | | | |
| Coffea canephora unnamed protein product | HG739154.1 | | CDP12708.1 | 203 | CocNAR2 |
| Solanales | | | | | |

| | | | | | |
|--|----------------|--------|----------------|-----|----------|
| Capsicum annuum unknown | AF492634.1 | 609 pb | AAM12786.1 | 202 | CaNAR1 |
| Capsicum chinense | | 609 pb | | 202 | CcNAR |
| Nicotiana glauca PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_009799779.1 | 615 pb | XP_009798081.1 | 204 | NsNAR1 |
| Nicotiana tomentosiformis PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_009612602.1 | 615 pb | XP_009610897.1 | 204 | NtoNAR1 |
| Solanum pennellii PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_015213591.1 | 612 pb | XP_015069077.1 | 203 | SpeNAR1 |
| Solanum lycopersicum PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_010320725.1 | 612 pb | XP_010319027.1 | 203 | SINAR3.2 |
| Solanum tuberosum PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.1 | XM_006344422.2 | 612 pb | XP_006344484.1 | 203 | StuNAR1 |
| Nicotiana glauca PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_009791313.1 | 612 pb | XP_009789615.1 | 203 | NsNAR2 |
| Nicotiana glauca PREDICTED: high- affinity nitrate transporter- activating protein 2.1-like | XM_009799781.1 | 618 pb | XP_009798083.1 | 205 | NsNAR3 |
| Solanum tuberosum PREDICTED: high- affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_006344424.2 | 624 pb | XP_006344486.1 | 207 | StuNAR2 |
| Nicotiana tomentosiformis | XM_009612601.1 | 618 pb | XP_009610896.1 | 205 | NtoNAR2 |

| | | | | | |
|---|----------------|--------|----------------|-----|--------|
| PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | | | | | |
| Lamiales | | | | | |
| Mimulus guttatus (Erythranthe guttata) PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_012985424.1 | 609 pb | XP_012840878.1 | 203 | EgNAR1 |
| Mimulus guttatus (Erythranthe guttata) PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013000130.1 | 615 pb | XP_012855584.1 | 205 | EgNAR2 |
| Mimulus guttatus (Erythranthe guttata) PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013000229.1 | 618 pb | XP_012855683.1 | 206 | EgNAR3 |
| Mimulus guttatus (Erythranthe guttata) PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_013000057.1 | 618 pb | XP_012855511.1 | 206 | EgNAR4 |
| Mimulus guttatus (Erythranthe guttata) PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_012973869.1 | 612 pb | XP_012829323.1 | 204 | EgNAR5 |
| Sesamum indicum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_011102974.1 | 609 pb | XP_011101276.1 | 203 | SiNAR1 |
| Sesamum indicum PREDICTED: high- | XM_011073665.1 | 612 pb | XP_011071967.1 | 204 | SiNAR2 |

| | | | | | |
|---|----------------|--------|----------------|-----|----------|
| affinity nitrate transporter 3.1-like | | | | | |
| Sesamum indicum PREDICTED: high-affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_011088367.1 | 609 pb | XP_011086669.1 | 203 | SiNAR3 |
| Asterales | | | | | |
| Chrysanthemum sp. CSG-2014 nitrate transporter | AB921548.1 | 597 pb | BAP74416.1 | 199 | ChNAR2 |
| Cynara cardunculus var. Scolymus transporter high affinity nitrate, Nar2 | LEKV01001842.1 | 585 pb | KVI06275.1 | 194 | CycNAR2 |
| Apiales | | | | | |
| Daucus carota subsp. Sativus high affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_017396206.1 | 612 pb | XP_017251695.1 | 203 | DcNAR3.1 |
| Daucus carota subsp. Sativus high affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_017394514.1 | 612 pb | XP_017250003.1 | 203 | DcNAR1 |
| Daucus carota subsp. Sativus high affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_017396244.1 | 618 pb | XP_017251733.1 | 205 | DcNAR2 |
| Daucus carota subsp. Sativus high affinity nitrate transporter 3.1-like | XM_017372777.1 | 618 pb | XP_017228266.1 | 205 | DcNAR3 |
| Daucus carota subsp. Sativus high affinity nitrate transporter 3.2-like | XM_017372779.1 | 618 pb | XP_017228268.1 | 205 | DcNAR3.2 |

