

TESIS DE MÁSTER

Plantas de tabaco con sobreexpresión
de tiorredoxina f como cultivo
energético alternativo

Lorea Villanueva Legarda

Curso 2010-11

Universidad Pública de Navarra
Máster en Agrobiotecnología

Director: Immaculada Farran Blanch

Immaculada Farran Blanch, Profesora Contratada Doctora del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMA

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master "Plantas de tabaco con sobreexpresión de tioredoxina f como cultivo energético alternativo" elaborada por D^a. Lorea Villanueva Legarda ha sido realizada bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a doce de septiembre de 2011.



Dra. IMMACULADA FARRAN BLANCH

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	4
- Los biocombustibles	4
- El bioetanol	5
- Aspectos básicos sobre la bioquímica y el metabolismo del almidón	7
- Las tiorredoxinas	8
- Relación entre tiorredoxinas y producción de azúcares y almidón	10
- La transformación plastidial	11
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
- Construcción del vector de transformación	15
- Transformación plastidial y regeneración de las plantas	16
- Extracción del DNA genómico	16
- Confirmación de la homoplasma por Southern-blot	17
- Cultivo de las plantas de tabaco en invernadero	17
- Análisis de la expresión de tiorredoxina f mediante Western-blot	18
- Contenido en agua, peso específico y medida de la cantidad de clorofila	18
- Determinación de almidón y cuantificación de azúcares solubles	18
- Análisis estadísticos y representación gráfica	19
RESULTADOS	
- Integración de la secuencia de la tiorredoxina f en el genoma plastidial de tabaco y comprobación de la homoplasma	20
- Expresión de tiorredoxina f en cloroplastos de plantas de tabaco	22
- Efectos de sobreexpresión de Trxf sobre los niveles de almidón en hoja	23
- Proporción de azúcares solubles en hoja de Virginia Gold transformada plastidialmente con el gen de la tiorredoxina f	26
- Evaluación del potencial de las plantas transgénicas de tabaco de la variedad Virginia Gold como cultivo energético	27
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

ABREVIATURAS

3'UTR	región 3' no traducida	MS	Murashige-Skoog
5'UTR	región 5' no traducida	NEP	polimerasa codificada en el núcleo
ADPG	ADP-glucosa	nm	nanometros
AGPasa	ADP glucosa pirofosforilasa	NADP-MDH	NADP-malato deshidrogenasa
ANA	ácido naftalén-acético	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ATP	adenosín trifosfato	PEP	polimerasa codificada en el plastidio
BAP	benzil-aminopurina	PHB	poli hidroxibutirato
CENER	Centro Nacional de Energías Renovables	PF	peso fresco
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio	PKR	fosforibuloquinasa
cv	cultivar	psi	unidades de presión
ETBE	etil-ter-butyl-éter	PT	proteína total
FBPasa	fructosa-1,6-bis-fosfatasa	RBS	sitio de reconocimiento para ribosoma
Fdx/Trx	ferredoxina/tiorredoxina	RMOP	medio de regeneración
FTR	ferredoxina:tiorredoxina reductasa	RSU	Residuos Sólidos Urbanos
GADPH	gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa	SBPasa	sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
HPLC	cromatografía líquida de alta presión	SLW	peso específico de las hojas
IR	regiones repetidas invertidas del genoma plastidial	SS	Sacarosa Sintasa
LSC	región simple larga del genoma plastidial	SSC	región simple corta del genoma plastidial
LWC	contenido en agua de las hojas	Trx	tiorredoxina
		TSP	proteína soluble total
		WT	plantas sin transformar
		ZRD	zona de recombinación derecha
		ZRI	zona de recombinación izquierda

RESUMEN

En los últimos años, la escasez de combustibles fósiles, el encarecimiento de su precio y la conservación del medio ambiente han hecho del desarrollo de biocombustibles como fuente de energía renovable una prioridad. Resultados preliminares, obtenidos en el laboratorio de Agrobiotecnología Vegetal (IdAB), muestran que la sobreexpresión plastidial de la tiorredoxina f (Trxf) en plantas de tabaco (cv. Petite Havana) produce un aumento de los niveles de almidón en los cloroplastos de las hojas transformadas.

Dada la creciente demanda de bioenergía, se plantean como objetivos de este trabajo el estudio de la sobreexpresión de la Trxf en los cloroplastos de la variedad comercial de tabaco Virginia Gold y la valoración de las plantas obtenidas como posible cultivo energético. Para ello, se transformaron plastidialmente hojas de tabaco con el vector pL3-PrrnG10L-Trxf y se comprobó la integración de los transgenes en el genoma plastidial y la homoplasma mediante Southern blot. El análisis de los niveles de expresión de proteína mostró una sobreexpresión de Trxf recombinante que se correspondía con un aumento de las cantidades de almidón en las plantas transformadas. Los litros de bioetanol por hectárea que podríamos obtener con estas plantas transgénicas de tabaco rondan los 1350 L, superando el rendimiento medio obtenido con trigo y acercándose a valores registrados en otros cultivos energéticos como patata o maíz.

Por tanto, este estudio ha demostrado que las plantas de tabaco de la variedad Virginia Gold con sobreexpresión de tiorredoxina f deberían tenerse en cuenta como futuro cultivo energético alternativo para la producción de bioetanol.

ABSTRACT

In the last few years, concerns about fossil fuels supplies, the increasing oil prices, and greater recognition of the environment have driven interest in transportation biofuels. Preliminary results obtained in the laboratory of Plant Agrobiotechnology (IdAB) show that overexpression of plastidial thioredoxin f (Trxf) in tobacco plants (cv. Petite Havana) rises starch levels in chloroplasts of transformed leaves.

Due to the increasing demand for bioenergy, this work aims to study Trxf overexpression in tobacco chloroplasts of the commercial variety Virginia Gold and to evaluate plants as a possible energy crop. For that purpose chloroplast transformation of tobacco plants has been assessed with the pL3-PrrnG10L-Trxf vector and the integration of transgenes in the plastid genome and homoplasmy was verified by Southern blot. Analysis of protein expression levels showed an overexpression of recombinant Trxf, which matched with the increased concentrations of starch quantified in transformed plants. The amount of bioethanol per hectare that could be obtained with these transformed tobacco plants are around 1350 L, which is more than the yield obtained with wheat and similar to those values registered in other energy crops such as potato or corn.

Therefore, this study has shown that Trxf overexpressing tobacco plants should be considered as an alternative energy crop for bioethanol production.

ANTECEDENTES

Los biocombustibles

Los biocombustibles o biocarburantes son combustibles líquidos de origen biológico obtenidos de manera renovable a partir de restos orgánicos (biomasa), susceptibles de ser empleados en un motor de combustión interna. Los biocarburantes en uso proceden habitualmente de materias primas vegetales, pudiendo ser sólidos (paja, cardo, leñas, astillas y carbón vegetal, por ejemplo), líquidos (aceites, metilésteres, alcoholes, etc.) o gaseosos (los diferentes biogases). Todos ellos reducen el volumen total de CO₂ que se emite en la atmósfera, ya que se trata de un proceso de ciclo cerrado. La energía contenida en la biomasa procede en última instancia de la energía solar fijada por los vegetales en el proceso fotosintético y acumulada en los enlaces de las moléculas orgánicas que forman su biomasa. Esta energía se libera al romper los enlaces de los compuestos orgánicos en el proceso de combustión, dando como productos finales anhídrido carbónico y agua. Sin embargo, los biocombustibles proporcionan una reducción limitada en la emisión de gases de efecto invernadero, ya que a menudo son mezclados con otros combustibles en pequeñas proporciones (5 o 10 %) (Schwietzke *et al.*, 2011).

De todas las energías renovables actuales, la biomasa es la que participa en mayor proporción en el balance energético, tanto a nivel mundial como nacional y la que ofrece las mejores perspectivas de crecimiento en los próximos años (Huang and Zhang, 2011; Barney and DiTomaso, 2011). La primera gran diferencia entre la biomasa y las restantes energías renovables radica en su propia naturaleza de “energía química”, capaz de proporcionar toda una serie de productos que pueden llegar a satisfacer todos los tipos de necesidades energéticas que tiene la sociedad moderna (calor, electricidad y transporte fundamentalmente), mientras que las restantes energías están especializadas en la producción de un solo tipo de energía ya sea eléctrica (hidráulica, eólica o fotovoltaica) o térmica (solar térmica o geotérmica). Según la combinación que se haga, resultan varios tipos de combustibles (Brown, 2006; Hill *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2010).

- *Biogas*: se obtiene a partir de la degradación de desechos orgánicos por efecto de microorganismos que proliferan por falta de oxígeno (ambiente anaeróbico). Este sistema es útil para el tratamiento de residuos biodegradables, dado que produce combustible que, empleado en plantas generadoras, produce energía eléctrica.

- *Biodiesel*: es el resultado de obtener biocombustibles a partir de aceites vegetales de soja, palma, girasol, colza o canola, que en muchos casos se cultivan exclusivamente para estos fines.
- *Bioalcoholes*: derivados de productos vegetales con un alto contenido en hidratos de carbono. Dentro de este grupo destacan el bioetanol y su derivado el Etil-ter-butil-éter (ETBE).

El bioetanol

El bioetanol es un alcohol que se obtiene por fermentación de productos azucarados procedentes de cultivos de plantas hidrocarbonadas cuya transformación en biocarburante resulta sencilla. Estos azúcares están en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa, moléculas orgánicas complejas que se concentran en la parte fibrosa de la planta gracias al proceso de fotosíntesis. Tras la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas, se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible (Amorim *et al.*, 2011). El bioetanol mezclado con la gasolina (en concentraciones del 5 o el 10%) produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión (Amorim *et al.*, 2011). En la actualidad, buena parte de los países europeos cuya capacidad de producción de biocarburantes supera el millón de toneladas, están investigando sobre la utilización del bioetanol como alternativa a la gasolina y es previsible que sea uno de los biocarburantes más usados a nivel mundial (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Entre las *ventajas del bioetanol* (Sticklen, 2008) destacan:

- Es una fuente de combustible renovable que reduce la dependencia del petróleo del extranjero y minimiza los residuos.
- Fácil reciclaje o utilización de los subproductos obtenidos en la obtención del biocombustible. No hay emisiones gaseosas.
- Los biocarburantes emiten un 40-80% menos de gases invernaderos que los combustibles fósiles.
- Muy bajo contenido de partículas en las emisiones de escape y ausencia total de sulfatos en los mismos.
- Combustible biodegradable en aproximadamente una semana.

La *obtención del Bioetanol* (Amorim *et al.*, 2011; Huang and Zhang, 2011) se separa en varias fases (Figura 1):

- Tratamiento inicial de la materia prima (homogeneización).
- Hidrólisis (licuefacción y sacarificación): en la etapa de licuefacción actúan enzimas bajo unas determinadas condiciones de temperatura, presión y pH. Estos parámetros se optimizan en función de la materia prima aportada. En la etapa de sacarificación el sustrato de la licuefacción es transformado en glucosa que será posteriormente sometida a fermentación. Los rendimientos del sistema son altos y ofrecen un consumo óptimo de energía.
- Fermentación: en el estadio de fermentación la glucosa es transformada en alcohol.
- Destilación, decantación y evaporación: la masa fermentada es conducida a la etapa de destilación. El alcohol crudo es destilado en una primera etapa y posteriormente procesado en diversas columnas para separarlo de las impurezas y del agua.

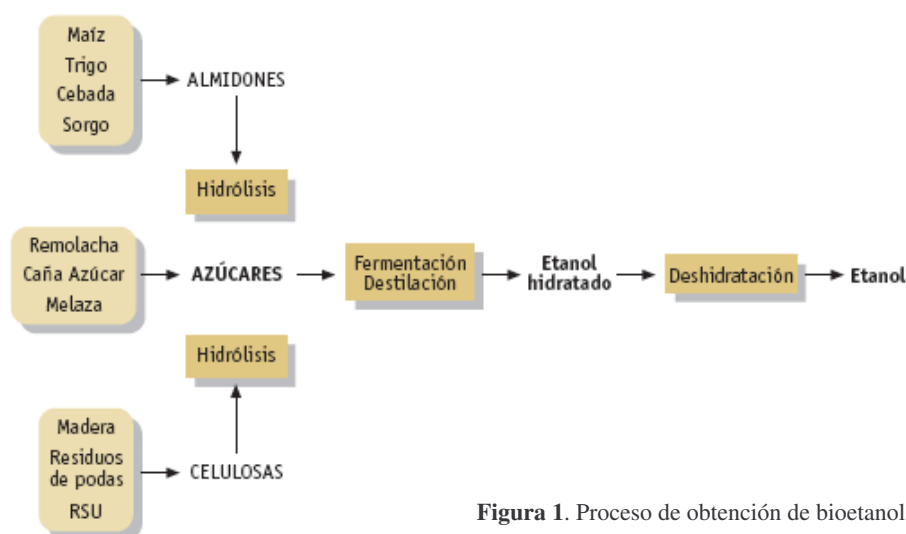


Figura 1. Proceso de obtención de bioetanol.

Entre las materias primas convencionales podemos encontrar azúcares (procedentes de la caña o la remolacha, por ejemplo) o cereales (mediante la fermentación de los azúcares del almidón). Todas ellas compiten con el mercado alimentario (Tammisola, 2010) y dan lugar al denominado “bioetanol de primera generación”.

Otra alternativa a las cosechas dedicadas a fines energéticos, son los materiales *lignocelulósicos* (Dunnett *et al.*, 2008). Estos son los que ofrecen un mayor potencial para

la producción de bioetanol: el uso de residuos de procesos agrícolas, forestales o industriales (con alto contenido en biomasa) han dado lugar al llamado “bioetanol de segunda generación” (Tang *et al.*, 2011). Estos residuos pueden ir desde la paja de cereal a las “limpias” forestales, pasando por los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) o las cáscaras de cereal o de arroz. Los residuos tienen la ventaja de su bajo coste, ya que son la parte no necesaria de otros productos o procesos, salvo cuando son utilizados en la alimentación del ganado. Los RSU tienen un alto contenido en materia orgánica, como papel o madera, que los hace una fuente potencial de materia prima, aunque debido a su diversa procedencia pueden contener otros materiales cuyo preproceso de separación incrementa mucho el precio de la obtención del bioalcohol. También pueden utilizarse residuos generados en algunas industrias, como la papelera, la hortofrutícola o la fracción orgánica de residuos sólidos industriales. Muchos de estos residuos no sólo tienen valor económico en el contexto donde se generan sino que pueden ser causa de problemas ambientales durante su eliminación (Cabrera, 2006).

Aspectos básicos sobre la bioquímica y el metabolismo del almidón.

El almidón, principal carbohidrato de reserva en plantas vasculares, es un homopolímero de moléculas de glucosa agrupadas en cadenas de amilosa y amilopectina que, a su vez, se organizan para dar lugar a estructuras semicristalinas llamadas gránulos.

Las cadenas de amilosa (Figura 2A) están constituidas por moléculas de glucosa unidas covalentemente mediante enlaces α -1,4 con un 0,1% de ramificaciones surgidas a partir de enlaces α -1,6 (Ball *et al.*, 1996; Ball and Morell, 2003; Takagi and Hizukuri, 1984; Takeda and Hizukuri, 1986). Su tamaño molecular está comprendido entre los 10^5 y 10^6 Dalton (Da). El tamaño molecular de la amilopectina (Figura 2B) oscila entre los 10^7 y los 10^9 Da y posee aproximadamente un 4% de enlaces α -1,6.

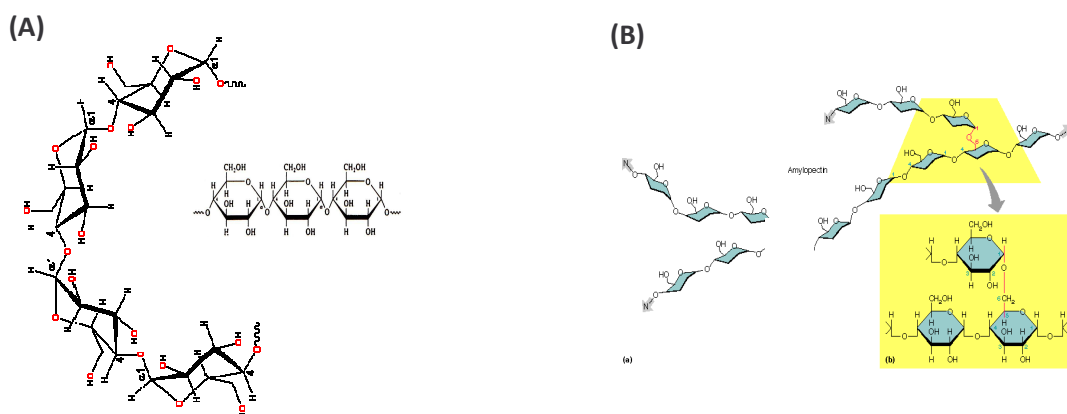


Figura 2. Estructura de los homopolímeros que componen el almidón: (A) amilosa y (B) amilopectina.

El balance amilosa/amilopectina, la forma y el tamaño de los gránulos de almidón cambian según especies y órganos de una misma planta. El conocimiento básico sobre la biosíntesis del almidón de las plantas avanzó sustancialmente tras el descubrimiento del ADP-glucosa (ADPG) (Murata *et al.*, 1964; Recondo *et al.*, 1963). ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa) cataliza el primer paso de síntesis de almidón en plastidios, convirtiendo la glucosa-1-fosfato y ATP en ADP-glucosa y fósforo inorgánico (Pi). Tiene actividad alostérica regulada por interacciones ultrasensibles con metabolitos efectores (el 3 fosfoglicerato es un activador y el Pi es un inhibidor).

Las tiorredoxinas.

Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas termoestables (12 kDa) presentes en todos los organismos que catalizan intercambios tiol-disulfuro y regulan el ambiente redox de la célula, controlando un amplio rango de procesos bioquímicos (Berndt *et al.*, 2008; Buchanan and Balmer, 2005). Esta regulación depende, en la mayoría de los casos, de la capacidad de las tiorredoxinas de reducir puentes disulfuro de proteínas diana. Todas las tiorredoxinas muestran un sitio activo conservado que confiere una estructura común a la mayor parte de las proteínas disulfuro oxidoreductasas. Este centro activo está formado por los aminoácidos Cys-X-Pro-Cys, donde X suele ser Gly, pero también puede ser Pro o Ala, además de ciertos aminoácidos cuyas posiciones son estructuralmente importantes (Eklund *et al.*, 1991). En la reacción de oxido-reducción, el tiol N-terminal del motivo CxxC ataca el puente disulfuro de la proteína diana, liberando el grupo tiol y formando un puente disulfuro con la segunda cisteína de la proteína (Meyer *et al.*, 2009).

En plantas, el sistema tiorredoxina es particularmente complejo, ya que existen múltiples isoformas y múltiples genes que codifican para cada tipo de tiorredoxina, siendo todos estos genes codificados nuclearmente, independientemente de su localización subcelular (Meyer *et al.*, 2009). Desde los primeros trabajos llevados a cabo en *Escherichia coli* (*E. coli*), el número de proteínas pertenecientes a esta familia ha aumentado de forma considerable (Schurmann and Buchanan, 2008). La multiplicidad de isoformas de tiorredoxinas encontradas en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*, cuatro isoformas de tiorredoxina “m”, dos “f”, una “x”, y dos “y”, hace que surjan dudas respecto a la especificidad y las funciones de las mismas (Meyer *et al.*, 2005). Las tiorredoxinas más estudiadas hasta la fecha han sido las tiorredoxinas m y f, denominadas así en función de la enzima que son capaces de activar, la NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH)

y la fructosa-1,6-bis-fosfatasa (FBPasa), respectivamente (Montrichard *et al.*, 2009). Ambas muestran selectividad en sus interacciones con enzimas diana. Estudios filogenéticos y comparaciones estructurales han demostrado que las tiorredoxinas m tienen un origen procariota, están codificadas nuclearmente y se encuentran débilmente asociadas a las membranas externas del tilacoide (Arsova *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2005). Las tiorredoxinas f están también codificadas nuclearmente, tienen un origen eucariota (Sahrawy *et al.*, 1996) y su superficie está cargada más positivamente que la de la Trxm (Schurmann and Buchanan, 2008). Las tiorredoxinas cloroplásticas pueden regular procesos tan importantes como: el ciclo de Calvin; el ciclo C4; el metabolismo del nitrógeno y del azufre; la biosíntesis de ácidos grasos, isoprenoides, tetrapirroles y vitaminas; la traducción; el ciclo de las pentosas fosfato; el estrés oxidativo; el ensamblaje/plegado de proteínas y degradación de las mismas; la degradación del almidón; la glicólisis; la división plastidial y la replicación del DNA (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2005; Lemaire *et al.*, 2007; Mingo-Castel *et al.*, 2009).

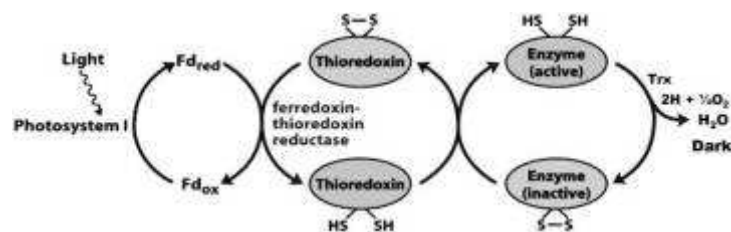


Figura 3. Sistema ferredoxina-tiorredoxina (Fdx/Trx) en organismos fotosintéticos. Representación esquemática de la transferencia de la señal lumínica vía Fdx y FTR a la enzima diana (Schurmann and Buchanan, 2008)

Las tiorredoxinas plastidiales obtienen el poder reductor a través del sistema ferredoxina/tiorredoxina (Schurmann and Buchanan, 2008). Brevemente, el transporte de electrones a través del fotosistema durante la fotosíntesis reduce ferredoxinas (Frx). Las Frx, una vez reducidas, interactúan con la enzima ferredoxina:tiorredoxina reductasa (FTR), la cual convierte la señal dada por un electrón activado por la luz en una señal tiol, que es transmitida a una de las isoformas de la familia tiorredoxina presente en el plastidio (Figura 3). En su forma reducida, las Trxs interactúan con sitios específicos de puentes disulfuro presentes en proteínas que participan en distintas vías (con el fin de aumentar o disminuir su actividad) o con proteínas asociadas con respuestas a estrés (Schurmann and Buchanan, 2008). Este sistema se creía propio de células fotosintéticas, sin embargo, recientemente se ha descrito la existencia de un completo sistema Frx/Trx también en

amiloplastos, regulando la actividad de enzimas implicadas en procesos tales como el metabolismo del almidón; la biosíntesis de lípidos, aminoácidos y nucleótidos; el plegado de proteínas y otras reacciones varias (Balmer *et al.*, 2006).

Relación entre tiorredoxinas y producción de azúcares y almidón.

El metabolismo del carbono empieza en los cloroplastos mediante la fijación de carbono inorgánico en el complejo proceso de la fotosíntesis. El CO₂ atmosférico se incorpora al ciclo de Calvin y, posteriormente, es exportado al citosol en forma de triosa-fosfato para convertirse en sacarosa.

Las tiorredoxinas plastidiales, activadas por la luz, desempeñan un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos (Chibani *et al.*, 2009). Concretamente, la tiorredoxina f desempeña un papel fundamental en la activación específica de muchos de los enzimas implicados en el ciclo de Calvin, por lo que se considera que ejerce algún control en la asimilación fotosintética del carbono. Se ha demostrado una activación específica de la Trxf para fructosa-1,6-bis-fosfatasa (FBPasa), rubisco-activasa, fosforibuloquinasa (PRK), gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa (SBPasa). Recientemente, gracias a la revolución de la genómica y la proteómica, se han identificado otras enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos que son reguladas por tiorredoxinas, como la AGPasa, la α -glucano, agua dikinasa (enzima plastidial que cataliza la fosforilación del almidón en su degradación) y la β -amilasa (TR-BAMY) (Buchanan *et al.*, 2002; Lemaire *et al.*, 2007). Son muchos los trabajos en los que se han sobreexpresado en plantas enzimas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, la mayor parte en torno a la utilización de la AGPasa (Slattery *et al.*, 2000; Stark *et al.*, 1992). Sin embargo, también se ha conseguido aumentar los niveles de almidón mediante la producción de plantas transgénicas que sobreexpresan sacarosa-sintasa (SS) (Baroja-Fernandez *et al.*, 2004). La sobreexpresión de una FBPasa/SBPasa de cianobacterias en cloroplastos de tabaco mediante transformación nuclear mejoró la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas transgénicas (Miyagawa *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando esta misma proteína se ha expresado desde el genoma del cloroplasto, a pesar de presentar unos niveles mayores de expresión, no se han observado cambios importantes en fotosíntesis, crecimiento y niveles de azúcares respecto a los obtenidos mediante transformación nuclear (Yabuta *et al.*, 2008).

Existen muy pocos trabajos en los que se han sobreexpresado tiorredoxinas en plantas. Cho *et al.* (1999) sobreexpresaron una tiorredoxina h de trigo en el endospermo de cebada transgénica, obteniendo un incremento de hasta 4 veces en la actividad de la '*starch-debranching enzyme*', enzima que rompe de manera específica los enlaces alfa-1,6 en el almidón, en el endospermo de granos transgénicos germinados. También se ha visto que se aceleraba la emergencia de la radícula durante el proceso de germinación (Wong *et al.*, 2002). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de tiorredoxina h en cereales (trigo y cebada) puede utilizarse para mejorar la calidad harino-panadera del trigo, aumentando la fuerza de la masa (Joudrier *et al.*, 2005) y para mitigar la respuesta alérgica a las proteínas del trigo (Buchanan *et al.*, 1997) produciendo alimentos hipoalérgicos más digestivos. Recientemente, se ha descrito la obtención de plantas de tabaco con niveles incrementados de almidón en sus hojas mediante la sobreexpresión del gen de la Trxf en sus cloroplastos (Mingo-Castel *et al.*, 2009). Estos resultados apuntan a un papel estimulador de la Trxf en la biosíntesis de carbohidratos.

La transformación plastidial.

La información genética en las plantas se encuentra distribuida en tres compartimentos celulares: el núcleo, las mitocondrias y los plastidios. El genoma plastidial (plastoma) es circular de doble hélice, y en plantas superiores difiere en tamaño según la especie entre 120 y 160 kb. El número de copias del plastoma en el plastidio es variable, dependiendo del tipo de plastidio y del tipo de célula, pudiendo llegar a contener hasta 10.000 copias en una célula del mesófilo de la hoja.

En el proceso de transformación plastidial, la integración del ADN en el genoma plastidial se produce por recombinación homóloga. En la mayoría de las especies, los genomas plastidiales contienen 4 regiones, la zona simple larga (LSC), la simple corta (SSC) y dos regiones invertidas repetidas (IR_A e IR_B) (Sugiura *et al.*, 1998). El plastoma de tabaco tiene un tamaño de 155.939 kb (Sugiura *et al.*, 1998) y su organización se puede observar en la Figura 4. Se han probado hasta 14 lugares distintos de inserción de transgenes en el plastoma, en los que no ha habido efectos negativos, si bien los más utilizados han sido la región intergénica del *trnI-trnA* y la del *rrn16/trnV-rps7/12* (Maliga, 2004). El método más utilizado para insertar los vectores en el ADN plastidial ha sido el bombardeo con helio a alta presión (método biolístico). Para detectar la regeneración de transformantes se suelen utilizar marcadores de selección. El más eficiente hasta el

destacables son: la ausencia de "efecto posición" (Bock and Khan, 2004), permitiendo una expresión uniforme y reproducible del transgen; la baja probabilidad en el flujo de transgenes a otros cultivos o especies salvajes relacionadas, ya que en la mayoría de las especies cultivadas los plastomas son heredados por vía materna (Hagemann and Schröder, 1989); y la capacidad de procesamiento policistrónico, que los capacita para procesar varios transgenes bajo el control de un único promotor (Bock and Khan, 2004).

Las aplicaciones biotecnológicas de la transformación plastidial son amplias (Bock, 2001; Maliga, 2004). Por una parte, han sido numerosos los estudios para dotar de ventajas agronómicas a los cultivos, como resistencia a insectos o a herbicidas y fitorremediación. También se ha publicado la expresión de moléculas de interés industrial como la xilanasa, trehalosa o el PHB. La aplicación más extendida ha sido la producción de compuestos biofarmacéuticos en plastidios (Farran *et al.*, 2008; Fernandez-San Millan *et al.*, 2003; Fernandez-San Millan *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2004; Sanz-Barrio *et al.*, 2011), probablemente porque las expectativas de mercado son altas y pueden esperarse grandes beneficios (Bock, 2007; Daniell, 2006).

OBJETIVOS

1. Obtener plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Virginia Gold) transformadas plastidialmente que sobreexpresen la proteína tiorredoxina f (Trxf) en los cloroplastos.
2. Caracterizar morfológicamente las plantas obtenidas en distintos estadios fenológicos.
3. Comparar el contenido de almidón y azúcares solubles de las plantas transformadas respecto a las no transformadas, con el fin de valorar el uso de dichas plantas como posible cultivo energético.

MATERIAL Y MÉTODOS

Construcción del vector de transformación.

La secuencia madura de la *Trxf* de *Nicotiana tabacum* (GenBank Accession Number HQ338526) se obtuvo mediante amplificación por PCR, utilizando como molde un cDNA de tabaco y los cebadores NtTrxf-5' (5'-CCATGGGTCACCATCACCATCACCATAGCT CCGATGCTACTG-3') y NtTrxf-3' (5'-GCGGCCGCTTAACTTGACCGCACATCCTC AATTG-3'). Estos cebadores incorporaron la diana *Nco*I (subrayado) en el NtTrxf-5' seguida de una cola de histidinas (en cursiva) y una diana *Not*I en el NtTrxf-3'. La secuencia amplificada de la *Trxf* madura de tabaco se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega, Madison, Wisconsin, USA) obteniéndose el vector de partida pGEMTrxf. El fragmento *Nco*I-*Not*I correspondiente a la secuencia madura de la *Trxf* se clonó en el vector pBS-SKPrnG10LCTF (Farran *et al.*, 2008). De esta forma se obtuvo el vector pBS-SKPrnG10LTrxf, que por digestión *Eco*RI-*Sal*I liberó la secuencia correspondiente a la proteína *Trxf* fusionada con un fragmento de 150 pb que incluye el promotor constitutivo del operón del RNA ribosomal del plastidio (*Prn*) y la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (*G10L*), como se muestra en la Figura 5A. El fragmento obtenido se clonó en el vector pL3 (Figura 5B) para dar lugar al vector definitivo de transformación plastidial pL3PrnG10LTrxf.

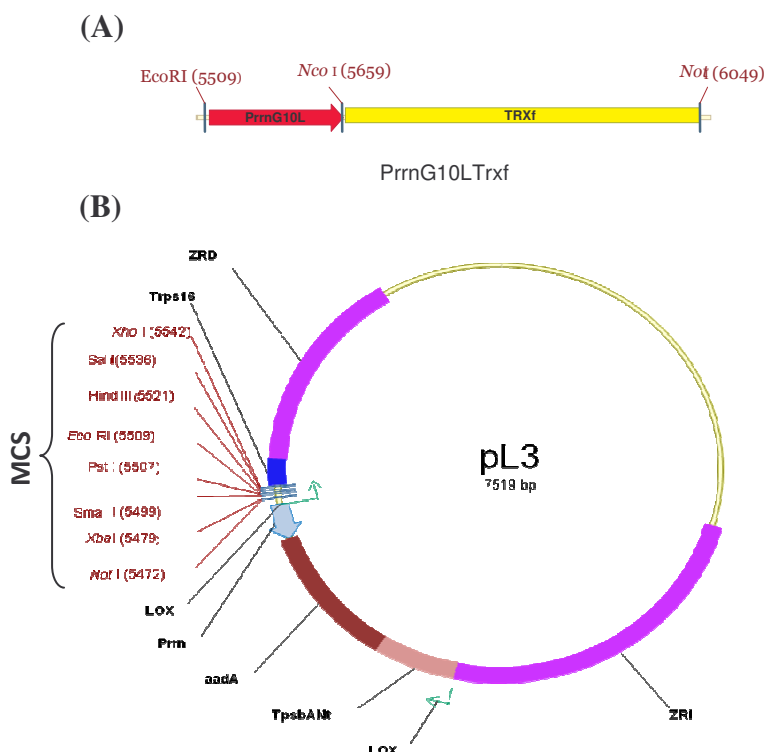


Figura 5. Construcción del vector de transformación plastidial pL3PrnG10LTrxf. (A) Cassete de expresión de la *Trxf* que se insertó en el sitio de múltiple clonaje (MCS) del vector pL3 (B). **PrnG10L**: promotor del operón 16SrARN más la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (*G10L*). **ZRD** y **ZRI**: zonas de recombinación homóloga; *aadA* gen que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomicina; **TpsbANT**: terminador del gen *psbA* de *Nicotiana tabacum*; **Trps16**: terminador de la proteína ribosomal 16S; **LOX**: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE. Mediante flechas se indica el sentido de la transcripción.

Transformación plastidial y regeneración de las plantas.

Se bombardeó el envés de hojas de la variedad comercial de tabaco *Virginia Gold* cultivadas in vitro, mediante el sistema biolístico PDS1000/He (Bio Rad, Hercules, CA, USA), según el método descrito por Daniell (1997). Para ello, se emplearon microproyectiles de oro de 0.6 μm recubiertos con el vector de transformación plastidial pL3PrnG10LTrxf, a razón de 100 ng de oro y 300 ng de ADN por hoja bombardeada, siendo la presión del disco de ruptura de 1.100 psi.

Tras el bombardeo, las hojas se incubaron en oscuridad durante dos días a 28°C. Posteriormente fueron troceadas en fragmentos de unos 5x5 mm y, manteniendo el envés en contacto con el medio, fueron cultivadas en cajas *Magenta* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), con medio de regeneración RMOP (sales MS, 30 g/l sacarosa, 0,1 mg/l ANA, 1 mg/l BAP, 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l tiamina y 6 g/l Phytagar pH 5,8) suplementado con 500 mg/L de espectinomicina como agente de selección. Las condiciones de cultivo fueron 28°C, un fotoperiodo de 16 horas luz y el flujo fotónico de 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suministrado con fluorescentes de luz blanca Philips (TDL 58W/79). Como controles se incluyeron en el experimento hojas sin bombardear en medio RMOP con y sin espectinomicina.

Los brotes regenerados resistentes a espectinomicina fueron sometidos a una segunda ronda de selección bajo las mismas condiciones. Las plántulas regeneradas en segunda ronda fueron enraizadas in vitro en medio P3 (sales MS, 30g/l de sacarosa y solidificado con 6g/l Phytagar, pH 5.8) suplementado con 500 mg/L de espectinomicina, aclimatadas en fitotrón y cultivadas en invernadero, con el fin de recolectar semillas y confirmar la homoplasma en las plantas de la generación T₁.

Extracción del DNA genómico.

Las hojas de tabaco fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas con ayuda del *Mikro-Dismembrator U* (B Braun Biotech International, Melsungen, Alemania). El ADN genómico se extrajo empleando el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Murray and Thompson (1980) y se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm (BioPhotometer; Eppendorf International, Hamburgo, Alemania).

Confirmación de la homoplasma por Southern blot.

Se digirieron 20 µg de DNA genómico de dos plántulas de la generación T₁ con la enzima de restricción *Bg*III, y los fragmentos generados fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) y transferidos a una membrana de nylon (Nytran N; Whatman, Springfield Mill, UK). Como sonda se usó un fragmento de DNA de 0.78 kb obtenido tras amplificar por PCR DNA genómico de *Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana con los cebadores sonda1 (5'-CCAAGGCATAACTTGTATCC-3') y sonda2 (5'-GAGTGTACCATGAGAGAAGC-3'). Dicha sonda (HS, Figura 6A) hibrida con las zonas de recombinación homóloga del genoma plastidial. Tanto la preparación de la sonda como la hibridación de la membrana se llevaron a cabo con el sistema de marcaje y detección directa por quimioluminiscencia *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

Cultivo de las plantas de tabaco en invernadero.

Tras confirmar la homoplasma mediante análisis por Southern blot, se germinaron in vitro semillas de una de las líneas transplastómicas en medio P3 suplementado con 500 mg/L espectinomicina. Paralelamente, se germinaron semillas procedentes de plantas control no transformadas en medio P3 sin agente de selección. Una vez germinadas, diez plántulas de la línea transformada homoplásmica y otras diez de la línea control, fueron individualizadas y cultivadas durante cuatro semanas en tarros *Magenta* con medio P3, aclimatadas en fitotrón y trasplantadas a maceta en el invernadero para realizar los posteriores estudios. En el invernadero, las plantas permanecieron durante 14 semanas (entre el 26 de octubre y el 22 de febrero) a una temperatura de 28°C durante el día y 15°C por la noche, mantenida mediante sistemas reguladores y un fotoperiodo de día corto (entre 9 y 10 horas de luz). Indicar que, debido a la disposición de las plantas en el invernadero, diez de ellas (cinco transformadas y cinco sin transformar) recibieron mayor cantidad de luz solar que el resto por estar situadas cerca del cristal. Esto fue tomado en consideración a la hora de analizar los resultados.

Cuando el 50% de las flores se encontraban abiertas, se procedió al descabezado de la mitad de las plantas, tanto transformadas como sin transformar. Seguidamente, se procedió al deshijado químico mediante tratamiento con STOMP (Pendimetalina 33%) al 1% en todas las plantas para evitar el rebrote, aplicando 20 ml por planta mediante pulverización en cada una de las yemas laterales.

Análisis de la expresión de tiorredoxina f mediante Western blot.

Se homogeneizaron unos 200 mg de hoja pulverizada en nitrógeno líquido en 600 µl de Laemmli buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.5, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol y 0.1% azul de bromofenol), tanto de plantas transformadas como no transformadas. Se extrajo la proteína total (PT) hirviendo durante 5 minutos a 95°C. El extracto fue resuelto por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 15% y transferido a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). Como anticuerpo primario se usó anti-Trxf (Sanz-Barrio *et al.*, 2011) a una dilución 1:7500 y como anticuerpo secundario se usó un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10000 en PBS-T (Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 100mM, Tween-20 0.1%) con leche desnatada en polvo al 5%. La detección de las proteínas se llevó a cabo por quimioluminiscencia, usando el sistema de revelado *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare).

Contenido en agua, peso específico y medida de la cantidad de clorofila.

Con el fin de calcular el contenido en agua de las hojas (LWC) y el peso específico (SLW), 30 días después del descabezado (días post-corte) se cosechó un disco apical de cada una de las hojas de todas las plantas del ensayo con ayuda de un sacabocados de diámetro conocido. Las muestras se pesaron (peso fresco) y posteriormente se secaron en estufa a 80°C durante 48 horas, tomando posteriormente datos del peso seco de las muestras.

Las medidas de clorofila se tomaron de hojas alternas (tres medidas por hoja) en cada una de las plantas, usando el medidor SPAD-502 Plus (Minolta Konica Co. Ltd., Japan) (Kashiwagi *et al.*, 2006).

Determinación de almidón y cuantificación de azúcares solubles.

Para las mediciones de almidón y azúcares, se recolectaron discos de hojas de tabaco con ayuda de un sacabocados a los 15, 30 y 45 días post-corte de flor (tres discos por hoja, en hojas alternas de todas las plantas de tabaco, tanto transformadas como control). Además, durante la cosecha del día 30, también se tomaron muestras de hoja joven, madura y vieja, procediendo del mismo modo indicado previamente.

Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y pulverizadas en el *Mikro-Dismembrator U* (B Braun Biotech International). Se homogeneizaron unos 200 mg de

material vegetal pulverizado en 500 µl de etanol al 100% con ayuda de un *Ultra-Turrax* (IKA, Werke Staufen, Germany). Tras añadir 500 µl de etanol al 80%, se procedió a la extracción de azúcares solubles a 70°C durante 90 minutos y en agitación. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La concentración de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) se determinó a partir del sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección amperométrica. Se usó el sistema DX-500 Dionex ajustado a una columna Carbo-Pac PA1 (Rolletschek *et al.*, 2002).

Para la solubilización del almidón, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 80% y se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 14000 rpm y temperatura ambiente. Tras desechar el sobrenadante, se secaron los pellet durante 20 minutos a 45°C. A continuación, se resuspendió el pellet en 400 µl de KOH 0,2 N y se incubaron las muestras durante 60 minutos a 95°C en agitación. Se ajustó el pH a 4,6-4,8 mediante adición de unos 70 µl de ácido acético 1N. Por último, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. La cuantificación del contenido en almidón se realizó con el sobrenadante recogido tras la solubilización del polisacárido, siguiendo las indicaciones de un kit comercial de bioanálisis enzimático (R-Biopharm Ag, Darmstadt, Alemania). Así, tras una hidrólisis enzimática del almidón, se determinó por fotometría la cantidad de glucosa en las muestras, midiendo la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro (BioPhotometer; Eppendorf International).

Análisis estadísticos y representación gráfica

Los distintos resultados se graficaron y analizaron mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.04. Para el análisis estadístico de los datos, se usó el test no paramétrico U de Mann Whitney, con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Integración de la secuencia de la *Trxf* en el genoma plastidial de tabaco y comprobación de la homoplasma.

Con el propósito de valorar el efecto de la sobreexpresión plastidial de la *Trxf* sobre los niveles de almidón en los cloroplastos de plantas de tabaco, se transformaron hojas de la variedad comercial Virginia Gold mediante el sistema biolístico. Para ello se clonó el gen de la *Trxf* en el vector de transformación pL3 (Figura 5B), desarrollado en el grupo de Agrobiotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología. Como puede verse en la Figura 6A, el vector pL3 inserta el gen de interés por recombinación homóloga entre los genes *trnV* y *3' rps12* de la región invertida repetida del genoma plastidial. Esta zona de inserción se ha venido usando habitualmente para la transformación de cloroplastos, sin haberse reportado efecto pleiotrópico alguno (Maliga, 2004). Para facilitar la acumulación proteica, se incluyeron en la construcción elementos reguladores tanto 3' como 5' (Figura 6B), utilizando el terminador del gen *rps16* (regulador 3' del mRNA obtenido del gen de la subunidad menor del ribosoma del cloroplasto) y el promotor *Prrn* (promotor constitutivo del operón del RNA ribosomal del plastidio) fusionado a la secuencia líder del gen *10* del fago T7 (*G10L*). Como se ha podido comprobar (Staub *et al.*, 2000; Tregoning *et al.*, 2003) estas secuencias reguladoras 5' permiten alcanzar altos niveles de expresión de proteína exógena en cloroplastos (7%-25% sobre la proteína soluble total, TSP). Como gen marcador se usó el *aadA* (el cual confiere resistencia a la espectinomomicina y estreptavidina), bajo el control del promotor *Prrn* y el terminador del gen *psbA*. El cassette *aadA* se encuentra flanqueado por las secuencias *LOX*, permitiendo la escisión completa del gen de resistencia a antibiótico tras la transformación (Lutz and Maliga, 2007).

Las hojas de tabaco fueron bombardeadas con el vector pL3-*PrrnG10L-Trxf* (Figura 5) como se ha descrito previamente (Daniell, 1997). Tras cinco semanas, los distintos brotes regenerados a partir de cada una de las hojas fueron sometidos a varias rondas de regeneración, con el fin de conseguir la condición de homoplasma. La integración estable del gen exógeno en el plastoma y la homoplasma en las plantas transformadas se corroboraron por Southern blot (Figura 6C). Tras dos rondas de selección, se extrajo el DNA genómico de hojas de plantas de tabaco regeneradas y se digirió con la enzima de restricción *BglIII*, cuyos puntos de corte se encuentran en las regiones de recombinación que flanquean el sitio de inserción (Figura 6A). Como sonda se usó una secuencia de 0.78 kb homóloga a las regiones *trnV* y *3' rps12* (HS, Figura 6A).

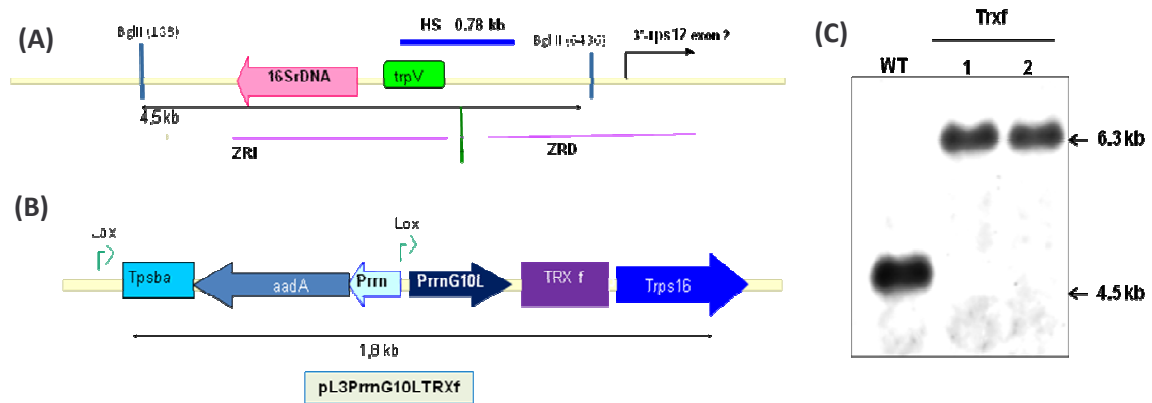


Figura 6. Integración del gen quimérico *Trxf* en el genoma del cloroplasto y verificación de la homoplasmia. (A) Secuencia del genoma del cloroplasto en el lugar de inserción entre los genes *trnV* y *3' rps12*. El fragmento de 0.78 kb que flanquea la zona de inserción fue usado como sonda HS para el análisis por Southern blot (B) Esquema de los transgenes insertados por recombinación homóloga en el genoma plastidial. **PrrnG10L**: promotor del operón 16SrARN más la secuencia de la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (G10L); **Trxf**: gen que codifica para la tiorredoxina f; **aadA**: gen que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin; **TpsbA**: terminador del gen *psbA* de *Nicotiana tabacum*; **Trps16**: terminador de la proteína ribosomal S16; **LOX**: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE. Mediante flechas se indica el sentido de la transcripción. (C) Análisis por Southern blot de una planta de tabaco control (WT) y dos líneas transformadas independientes (*Trxf* 1 y 2). Se digirieron 20 μ g de DNA genómico con *Bgl*III y se usó la sonda HS. Las flechas indican el tamaño de cada uno de los fragmentos.

De este modo, el plastoma de las plantas sin transformar dio lugar a un fragmento de DNA de 4,5 kb, mientras que las plantas transformadas generaron un fragmento de 6,3 kb. La ausencia del fragmento de 4.5 kb en las líneas transgénicas indica homoplasmia. Como se puede observar en la Figura 6C todas las plantas analizadas resultaron homoplásmicas, lo que parece indicar que con el vector de transformación pL3 podrían ser suficientes dos rondas de regeneración en presencia de espectinomicina para obtener plantas homoplásmicas.

Expresión de *Trxf* en cloroplastos de plantas de tabaco.

Debido a que la capacidad de biosíntesis proteica del cloroplasto disminuye con el tiempo, la fluctuación en los niveles de acumulación de proteína exógena es un buen indicativo de la estabilidad de la proteína (Oey *et al.*, 2009). Por ello, se analizaron los niveles de proteína acumulados en hoja joven, madura y vieja de la generación T₁. El Western blot (Figura 7A) se realizó con un anticuerpo policlonal anti-*Trxf* sobre extracto de proteína total de hoja, revelando la preponderancia de *Trxf* en hojas jóvenes de plantas transformadas. Sin embargo, la acumulación de proteína recombinante en hojas maduras y viejas también fue notable, lo que indica que la *Trxf* es estable. La cantidad de proteína total cargada en el gel fue la equivalente a 1 mg de material vegetal tanto en plantas transformadas como en las control sin transformar. Para poder ver la *Trxf* endógena, es

necesario cargar la proteína total extraída de unos 10 mg de hoja fresca (Sanz-Barrio, resultados no publicados), por ello, no se detectó señal de Trxf endógena en las muestras de hojas de plantas sin transformar, así que podemos confirmar que la señal detectada por Western blot es específica de la Trxf recombinante.

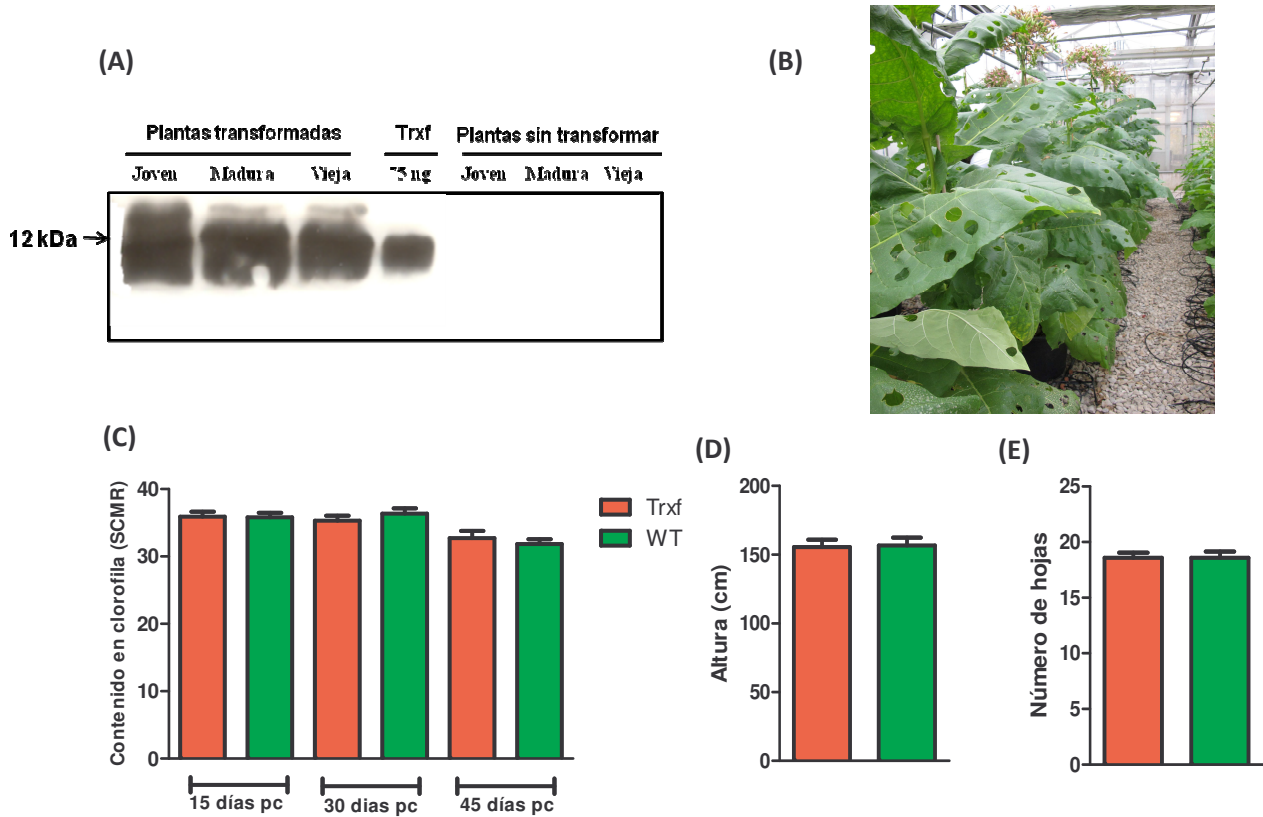


Figura 7. Patrón de expresión de la Trxf en hojas de tabaco y parámetros morfológicos de plantas transformadas (Trx) respecto a las control sin transformar (WT) (A) Análisis por Western blot de la expresión de Trxf en hoja joven, madura y vieja de una línea transformada y otra control. Se cargaron 2,5 μ l de extracto proteico y 75 ng de Trxf producida en *E.coli*. La flecha indica el tamaño de la proteína Trxf (B) Imagen de las plantas en el invernadero seis semanas tras el descabezado (C) Contenido en clorofila de las plantas 15, 30 y 45 días post corte de flor (pc). La figura muestra la media de todas las plantas de cada grupo, a razón de 3 medidas por hoja, en hojas alternas de cada planta (D) Altura (en centímetros) de las plantas transformadas y no transformadas 15 días después del descabezado (E) Número de hojas de las plantas en el momento del descabezado (C,D,E) Los datos representan la media de diez plantas, tanto en las transformadas como en las plantas control, acompañada del error estándar.

También se analizaron algunos parámetros morfológicos de las plantas de tabaco transformadas y control. Como se aprecia en la foto (Figura 7B), todas las plantas mostraron síntomas de senescencia temprana ya desde el día 15 tras el descabezado, con unos niveles de clorofila que se mantuvieron estables a lo largo del tiempo (Figura 7C). No se encontraron diferencias significativas en la altura de las plantas (Figura 7D) ni en el número de hojas desarrolladas (Figura 7E) al comparar estos datos en plantas transformadas y sin transformar. Por tanto, las plantas transformadas con Trxf no desarrollaron ningún rasgo fenotípico característico (Figuras 7C, 7D y 7E), lo que indica

que la expresión de esta proteína es fenotípicamente neutral, al menos bajo las condiciones de cultivo establecidas en este trabajo.

Con el fin de valorar si existían diferencias en cuanto al contenido en agua (Figura 8A) y el peso específico de hojas de tabaco (Figura 8B) entre plantas transformadas y sin transformar, se secaron discos de hoja muestreados quince días después del descabezado y se calcularon dichos parámetros. No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el peso específico de las plantas transformadas y sin transformar, ni tampoco en el contenido en agua.

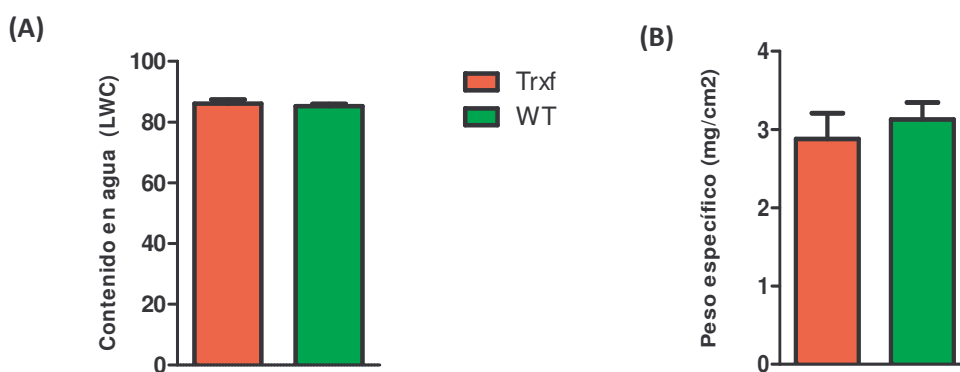


Figura 8. Contenido en agua (LWC) y el peso específico (SLW) de las hojas de tabaco en plantas transformadas (Trxf) y sin transformar (WT) (A) Valores medios del contenido de agua en hoja de tabaco muestreadas 30 días post-corte (B) Peso específico de las hojas, expresado en mg de peso por cm² (A,B) Los datos representan la media de diez plantas, tanto en las transformadas como en las plantas control, acompañada del error estándar.

Efectos de la sobreexpresión de Trxf sobre los niveles de almidón en hoja.

En trabajos realizados anteriormente (Mingo-Castel *et al.*, 2009), se ha podido comprobar que la sobreexpresión de tiorredoxina f en cloroplastos de tabaco cv. Petite Havana produce cambios significativos en el contenido de almidón en hoja, lo que convierte a estas plantas en una materia prima amilácea interesante para la producción de bioetanol. Sin embargo, Petite Havana es una variedad de tabaco de laboratorio, con una producción de biomasa muy baja. En el presente trabajo se pretende evaluar si existen diferencias en el contenido de almidón entre plantas que sobreexpresan Trxf y plantas control sin transformar de la variedad comercial de tabaco Virginia Gold, con unos rendimientos por hectárea que rondan las 50 toneladas de hoja (Farran, resultados no publicados).

Con el fin de establecer el momento óptimo de cosecha de las plantas, se determinó la concentración de almidón en hojas de plantas transformadas y control de muestras

recogidas 15, 30 y 45 días después del descabezado. Como se puede observar en la Figura 9A, las plantas transformadas con Trxf acumularon, en general, mayores niveles de almidón que las plantas control. Asimismo, las hojas de las plantas descabezadas presentaron mayor contenido de almidón que las plantas sin descabezar. Sin embargo, al analizar estadísticamente estos datos se encontró una gran variabilidad en los mismos causada por la cantidad de luz recibida por las plantas. Como se muestra en la Figura 9B, las plantas que recibieron menos cantidad de luz (baja iluminación) mostraron unos niveles de almidón significativamente inferiores respecto a aquellas que resultaron más iluminadas (alta iluminación), diferencias que fueron más notables en las plantas transformadas con la Trxf. Por lo tanto, a la hora de analizar los contenidos de almidón y azúcares solubles en las hojas de tabaco, se decidió tener en cuenta solamente los datos de las plantas que recibieron mayor iluminación (Figuras 10 y 11).

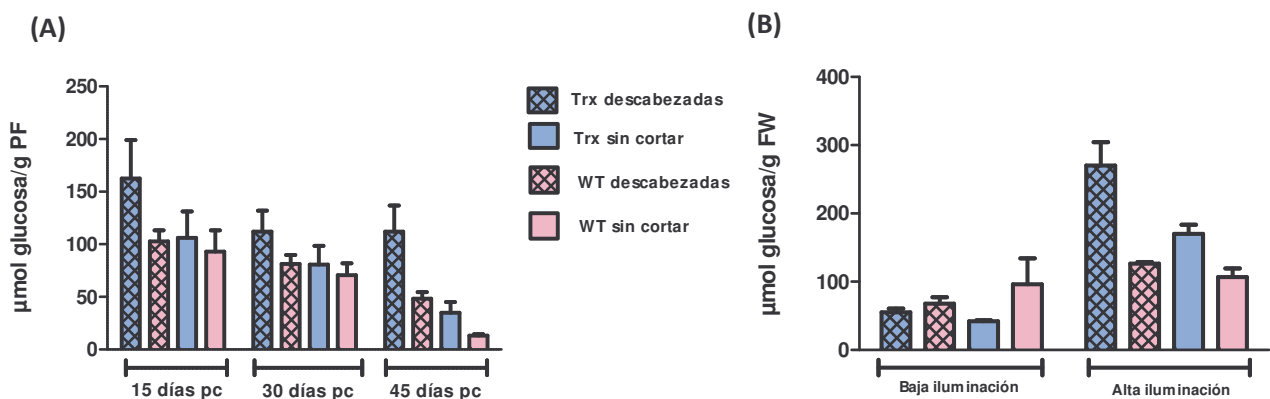


Figura 9. Análisis de la variabilidad en el contenido de almidón en hoja causada por la cantidad de luz recibida por las plantas (A) Comparación de los µmol de glucosa/g PF entre plantas transformadas y control a los 15, 30 y 45 días tras el descabezado (pc), sin tener en cuenta los niveles de luz recibida por las plantas. Los datos representan la media de diez plantas, acompañada del error estándar **(B)** Comparación de los µmol de glucosa/g PF entre plantas transformadas y control a los 15 días tras el descabezado, en condiciones de baja y alta iluminación. Los datos representan la media de cinco plantas, acompañada del error estándar

Al analizar las diferencias entre plantas de tabaco que habían recibido mayor iluminación (Figura 10A), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido en almidón en hoja entre plantas transformadas y control, tanto en las plantas descabezadas como en las no descabezadas (sin cortar) a los 15 y 45 días tras el corte de flor. Estos resultados revelaron que, en la cosecha del día 15 post-corte, las plantas de tabaco descabezadas que expresan Trxf sometidas a una mayor exposición lumínica tienen un contenido en almidón de 270 ± 31 µmoles de glucosa por gramo de peso fresco

(PF), lo que corresponde a 2,13 veces más de almidón que las no transformadas para las mismas condiciones. Este valor fue de 168 ± 20 μ moles de glucosa por gramo PF a los 30 días post-corte (1,78 veces superior respecto a las plantas control) y 170 ± 30 μ moles de glucosa por gramo PF a los 45 días después del descabezado (2,95 veces más que las plantas control).

Además, como se puede observar en la Figura 10A, aquellas plantas transformadas con Trxf que fueron descabezadas llegaron a acumular hasta un 58%, 36% y 185% más de almidón que las que no fueron descabezadas (datos correspondientes a los 15, 30 y 45 días después del corte, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no fueron tan notables en el caso de las plantas control, que mostraron valores de almidón muy similares independientemente de haber sufrido corte de flor o no. Esto indica que el corte de flor favoreció la acumulación de almidón en las hojas de las plantas de tabaco transformadas con la Trxf, evitando la migración de los fotoasimilados a los órganos sumidero (flores y frutos en formación).

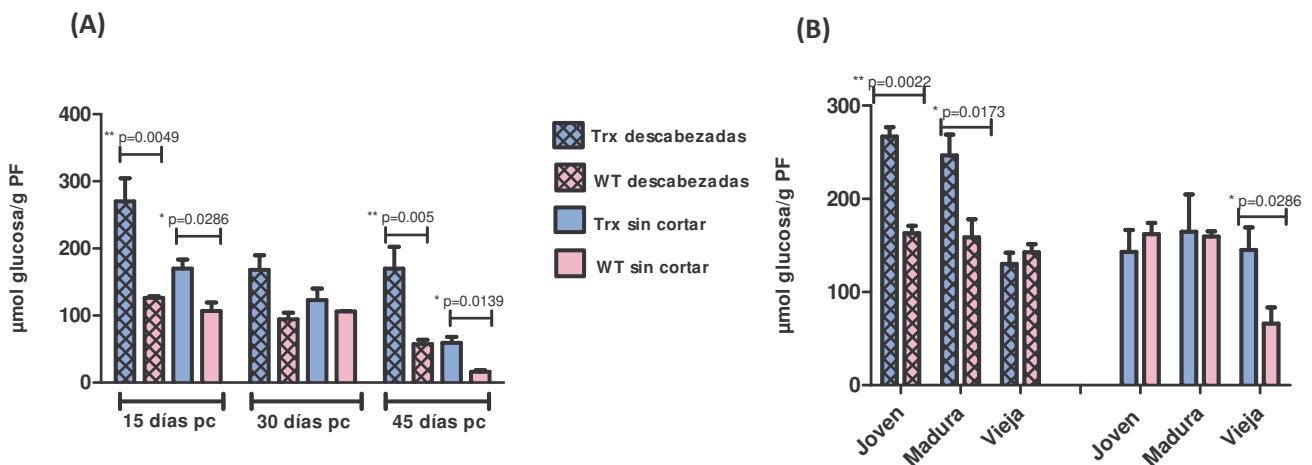


Figura 10. Contenido de almidón en hojas de plantas transformadas (Trx) y control (WT) cultivadas bajo altas condiciones de luminosidad (A) Comparación de los μ mol de glucosa /g PF entre plantas transformadas y control a los 15, 30 y 45 días tras el descabezado (pc). Los datos representan la media de cinco plantas, acompañada del error estándar **(B)** Contenido en almidón en distintos estados de desarrollo de las hojas. Las medidas se realizaron con material vegetal recolectado 30 días post corte de flor. Los datos representan la media de 2-3 plantas acompañada del error estándar **(A,B)** La significación de las diferencias encontradas en el análisis estadístico (p) se indica en la figura.

A los 30 días después del descabezado, se recogieron muestras de hoja joven, madura y vieja en cada una de las plantas transformadas y control, para comprobar si la mayor expresión de Trxf encontrada en hoja joven mediante Western blot (Figura 7A), se correspondía con un mayor acúmulo de almidón en estas hojas o por el contrario, el almidón se acumulaba indistintamente por toda la planta. Al comparar los valores de almidón de hojas en distinto estado de desarrollo (Figura 10B), a los 30 días tras el corte de

flor y en condiciones de alta luminosidad, se encontraron diferencias significativas entre las plantas transformadas y control. Las mayores diferencias se hallaron en las hojas más jóvenes de plantas descabezadas, llegando a acumular hasta 1,6 veces más de almidón las plantas que sobreexpresaban la Trxf que las plantas sin transformar. En hoja madura los valores de almidón eran 1,5 veces superiores en las plantas transgénicas. En hoja vieja no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en el caso de las plantas sin descabezar, los valores en ambos grupos (transformadas y control) fueron muy similares, a excepción de las hojas más viejas, donde se cuantificó más del doble de almidón en las plantas transformadas respecto a las no transformadas. Por tanto, estos resultados parecen indicar que la transformación plastidial con tiorredoxina f es eficaz ya que puede incrementar el contenido de almidón en las hojas de tabaco con respecto a los controles.

Proporción de azúcares solubles en hoja de Virginia Gold transformada plastidialmente con el gen de la Trxf.

Con el fin de analizar el potencial de las plantas de tabaco como fuente de azúcares fermentables para la producción de bioetanol, en primer lugar se procedió a determinar los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en las hojas de tabaco. Para ello se analizaron únicamente los niveles de azúcares de aquellas plantas que acumularon mayores niveles de almidón, es decir, las plantas de tabaco descabezadas que se encontraban situadas junto al cristal en el invernadero y que, por tanto, recibieron mayor cantidad de luz. Analizando los resultados del contenido en azúcares de las hojas de tabaco, apenas se observaron diferencias entre plantas transformadas y el grupo control a lo largo de las distintas cosechas (Figura 11A). Aunque sí se vio que a los 30 días post-corte hubo un aumento de azúcares, tanto en plantas transformadas como control, y que estos valores disminuyeron considerablemente en la cosecha del día 45. La proporción entre hexosas se mantuvo constante a lo largo del tiempo, siendo la sacarosa la forma predominante. Al analizar los datos según el estadio de desarrollo de las hojas (Figura 11B) se observó una tendencia a acumular más azúcares en las hojas más viejas, aumentando especialmente los niveles de glucosa a medida que aumentaba el estado de madurez de las hojas. Por tanto, la expresión de tiorredoxina f en los cloroplastos de tabaco no parece que conlleve un aumento en la concentración de azúcares en las hojas.

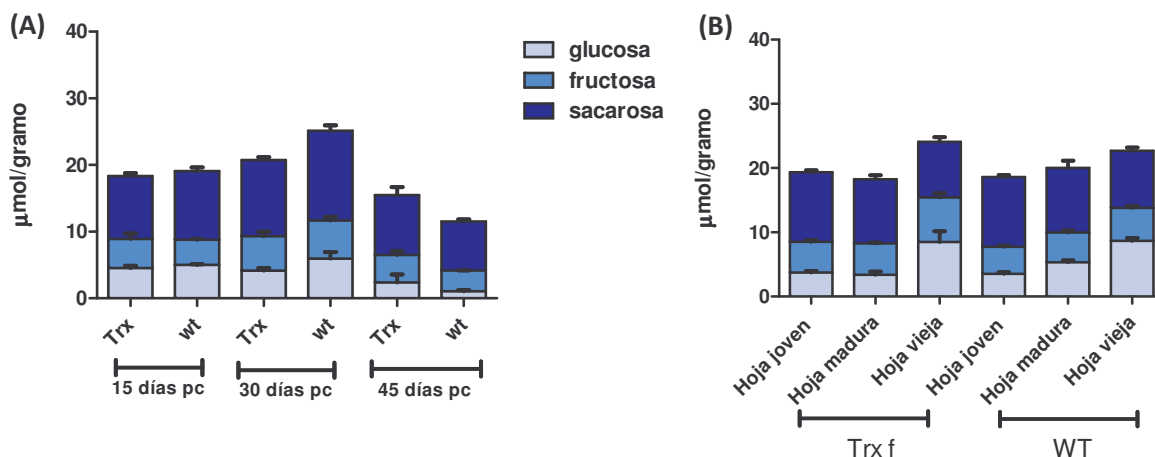


Figura 11. Cuantificación de azúcares solubles en plantas transformadas (Trx) y control (WT) descabezadas cultivadas bajo alta luminosidad (A) Proporciones de glucosa, fructosa y sacarosa encontradas en hoja de plantas descabezadas, transformadas y sin transformar, a los 15, 30 y 45 días post corte (pc). Se han representado los valores medios de azúcares de cada uno de los grupos en $\mu\text{mol}/\text{gramo}$ de muestra **(B)** Proporciones de glucosa, fructosa y sacarosa en función del estado de desarrollo de las hojas. Las medidas se realizaron con muestras recogidas 30 días post-corte en plantas descabezadas. **(A,B)** Los datos representan la media de dos-tres plantas acompañados del error estándar

Evaluación del potencial de las plantas transgénicas de tabaco de la variedad Virginia Gold como cultivo energético.

La obtención de plantas transgénicas capaces de producir y acumular mayores contenidos de almidón y azúcares fermentables, es objeto de interés en la búsqueda de fuentes alternativas de materias primas para la producción de bioetanol. Con el fin de evaluar el potencial fermentador de las plantas transgénicas de tabaco obtenidas en el presente trabajo, se han extrapolado los resultados obtenidos con la variedad de tabaco Virginia Gold (Figura 12A) y así obtener un indicador, litros de bioetanol por hectárea, que nos permita comparar esta materia prima con otras (Figura 12B).

En la Figura 12A, se resumen los principales parámetros que permiten evaluar el rendimiento en bioetanol, y, por tanto, el potencial fermentador, de una materia prima. A la hora de realizar estos cálculos, se han tenido en cuenta tanto los azúcares del almidón como los solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), que son los que la levadura podría emplear durante la fermentación, siendo el dato de “Azúcares Hojas” la suma de ambos. Para estimar la producción de bioetanol se ha considerado un valor de conversión de 0.645 L/kg de azúcar, con un rendimiento en la fermentación del 95% (datos facilitados por CENER). Considerando un rendimiento de 50 t/ha de hoja de tabaco para la variedad

Virginia Gold (Farran, resultados no publicados), se ha estimado la producción de bioetanol por hectárea, tanto en las plantas transformadas como control.

(A)

	WT	Trxf
Azúcares Hojas (%)	2,49 ± 0,14	4,46 ± 0.57
Rendimiento Fermentación (%)	95	95
Bioetanol producción (L/t hoja)	15,24	27,32
Rendimiento Variedad Comercial (t hoja/ha)	50	50
L bioetanol/ha	762	1366

(B)

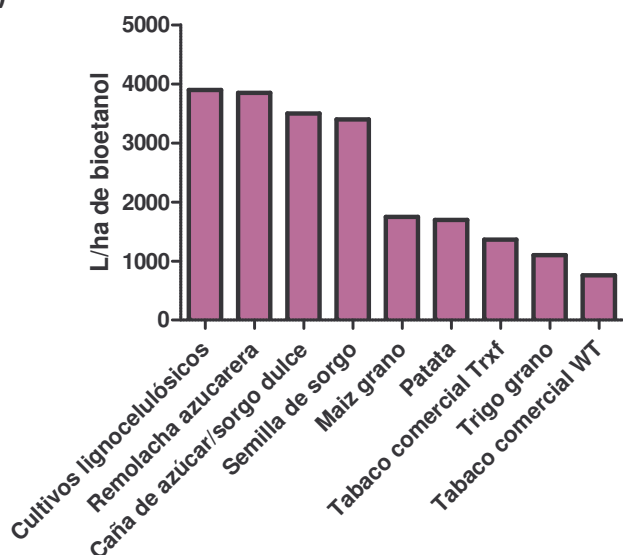


Figura 12. Potencial fermentador de las plantas de tabaco de la variedad Virginia Gold transformadas con la Trxf (A) Resumen de los principales parámetros que permiten evaluar el potencial fermentador de una materia prima en las plantas control (WT) y en las transformadas (Trxf) L/t hoja: litros de bioetanol por tonelada de hoja de tabaco en peso fresco (B) Productividad energética de distintos cultivos en España.

Como se puede observar en la Figura 12A, los litros de bioetanol por hectárea que podríamos obtener con el tabaco de la variedad Virginia Gold modificado genéticamente rondan los 1350 L, casi el doble que con las plantas sin transformar. Si comparamos este valor con los rendimientos medios en bioetanol obtenidos con otros cultivos (Figura 12B, datos obtenidos de www.marm.es y www.ine.es), se observa que el rendimiento estimado para esta variedad de tabaco transformada plastidialmente con la Trxf supera el rendimiento medio obtenido con el grano de trigo y es ligeramente inferior al obtenido con la patata o el grano de maíz.

DISCUSIÓN

Los biocombustibles, y en particular el bioetanol, son la alternativa a los combustibles fósiles utilizados en automoción. La producción de bioetanol aumenta año tras año en todo el mundo y especialmente en la UE, donde la normativa obligará en el año 2020 a que el 10% de los carburantes se produzcan a partir de fuentes renovables (Hancsók *et al.*, 2011). En los últimos años se está trabajando en la búsqueda de especies no convencionales para su aprovechamiento energético, adaptadas a diferentes áreas geográficas, ya que los cultivos que se usan actualmente para producir bioetanol (caña de azúcar, maíz), presentan el inconveniente de competir con el mercado alimentario (Tammissola, 2010). Una de estas especies alternativas podría ser el tabaco, gran productor de biomasa verde que puede acumular almidón en las hojas, lo cual le convierte en una materia prima amilácea interesante para la producción de etanol. Además, mediante técnicas de ingeniería genética pueden mejorarse los cultivos para que aumenten su contenido de almidón, por lo que estos cultivos mejorados serían una alternativa a los cultivos tradicionales de tabaco, como los existentes en la región extremeña de nuestro país.

La proteína tiorredoxina f (Trxf) está involucrada en los mecanismos de control y regulación de la biosíntesis de almidón en tejidos fotosintéticos y es posible que también forme parte del sistema de señalización del metabolismo de carbohidratos entre los tejidos fotosintéticos y los órganos sumidero como los tubérculos (Mingo-Castel *et al.*, 2009). En trabajos anteriores se clonó la tiorredoxina f de tabaco (que tiene localización plastidial) y se expresó desde el genoma plastidial de tabaco (Mingo-Castel *et al.*, 2009). Así, se obtuvieron plantas transplastómicas de una variedad no comercial de tabaco (Petite Havana), cuyo análisis bioquímico mostró que acumulaban entre 5 y 10 veces más almidón y unas 2-3 veces más sacarosa en hoja que las plantas control.

En el presente estudio se ha introducido la tiorredoxina f en el plastoma de la variedad comercial de tabaco Virginia Gold, una variedad con mayor biomasa que Petite Havana. Para dirigir el gen de interés en la transformación plastidial, generalmente se eligen promotores endógenos constitutivos de plastidios. Los promotores plastidiales probados para la expresión de proteínas heterólogas hasta el momento de la construcción de los vectores de transformación habían sido varios: el promotor de *trnV* (Zoubenko *et al.*, 1994), *psbA* (Staub and Maliga, 1994, 1995; Zoubenko *et al.*, 1994), *rbcL* (Shiina *et al.*, 1998), *16SrARN (rrn)* (Svab and Maliga, 1993; Kota *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 1995) y *rps16* (Staub and Maliga, 1994). Los mejores niveles de expresión habían sido obtenidos

con los promotores *Prrn* y *PpsbA*. El *Prrn* es constitutivo, y es reconocido tanto por la ARN polimerasa nuclear (NEP) como por la plastidial (PEP) (Iratni *et al.*, 1997). Para la elección de regiones 5'UTR se disponía de varias opciones. Una de las regiones más interesantes es el sitio de unión al ribosoma (RBS) (Iratni *et al.*, 1997) de la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (*G10L*). Este RBS es complementario al anti-RBS de la 16SrRNA plastidial, que proporciona señales de traducción muy eficientes e independientes de la luz (Staub *et al.*, 2000). Además ya se había comprobado que aumentaba la capacidad de traducción de genes exógenos en *E.coli* (Olins *et al.*, 1988) y plastidios (Staub *et al.*, 2000), llegando a alcanzar niveles de expresión del 25% de proteína soluble total (Tregoning *et al.*, 2003). Como resultado del estudio de los promotores y regiones 5'UTR disponibles, se decidió elegir el promotor *Prrn* y RBS del gen *10* del bacteriófago T7 (*G10L*).

La obtención de líneas transformadas estables implica el cultivo de los transformantes en presencia de espectinomicina durante el tiempo necesario para que las células se dividan, al menos, entre 16 y 17 veces (Moll and Polsby, 1990). Durante este tiempo los plastidios transformados tienen ventaja selectiva sobre los no transformados, aumentando en número y proporción gradualmente. Los primeros regenerantes obtenidos suelen ser totalmente verdes pero quiméricos, con sectores transformados y sin transformar debido al enmascaramiento por el tejido transgénico (Khan and Maliga, 1999). Por ello, se necesitó un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo para obtener plantas homoplásmicas.

Una vez transformadas las plantas con la *Trxf* y comprobada su homoplasma mediante Southern, se analizaron los niveles de proteína acumulados en hoja joven, madura y vieja mediante Western blot, comprobando que los mayores niveles de expresión se daban en hoja joven. Esto se corresponde con los resultados obtenidos por Sanz-Barrio (resultados no publicados) al cuantificar los niveles de *Trxm* en plantas de tabaco de la variedad Petite Havana transformadas con el vector pL3-*PrrnG10L-Trxm*, donde se estimó que el porcentaje de *Trxm* sobre proteína total (PT) era de $0.8\% \pm 0.1$ en hoja joven, frente al $0.16\% \pm 0.02$ de PT encontrado en hoja madura.

Los niveles de clorofila se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo y similares a los observados en estudios precedentes en plantas de tabaco de la variedad Virginia Gold entre 80 y 100 días tras aclimatación en invernadero (Kowalczyk-Juško and Kościk, 2002). En dicho estudio, los mayores niveles de clorofila se alcanzaron durante las diez primeras

semanas tras la aclimatación (que es cuando realizamos el descabezado de las plantas), por lo que de haber medido los niveles de clorofila en ese momento, es probable que los niveles encontrados hubieran sido mayores. La senescencia precoz de las plantas podría estar relacionada con la rápida organogénesis que caracteriza a esta variedad (Sakai and Shimamoto, 1965). Además, el proceso de floración fue más lento de lo esperado, tal vez debido a que el cultivo de las plantas tuvo lugar en los meses con menor fotoperiodo del año (de octubre a febrero).

No se encontraron diferencias en el peso específico de hojas de plantas transformadas y sin transformar. Sin embargo, en trabajos anteriores (Martínez, 2010), llevados a cabo en plantas de tabaco de la variedad Petite Havana transformadas con la Trxf, se vio que las plantas transgénicas presentaban mayor peso seco que las control (hasta un 34,35% más que las control), estimando el momento óptimo de cosecha (aquel en el que la cantidad de biomasa es mayor) alrededor de los 45 días tras la floración de las plantas de tabaco. Debido a la precoz senescencia observada en la variedad de tabaco empleada en este trabajo, es probable que, de haber observado diferencias en el peso específico entre plantas transformadas y sin transformar, habría sido antes de los 15 días tras la floración, cuando las plantas aún no habían mostrado síntomas de senescencia.

La evidencia de la que se dispone actualmente apunta a un papel estimulador de la biosíntesis de carbohidratos por parte de la Trxf (Mingo-Castel *et al.*, 2009), demostrando que las plantas transgénicas que incorporan Trxf, producen cantidades de almidón y sacarosa superiores en 5 ó 10 veces a las obtenidas de los mismos tejidos u órganos de las plantas silvestres correspondientes, cultivadas en condiciones idénticas. Estos resultados se corroboraron en Martínez (2010), donde se cuantificaron entre 15-20 veces más de almidón y seis veces más de azúcares en plantas transformadas respecto a las control, aunque, en este caso, la cuantificación se llevó mediante un método enzimático distinto basado en el método de la AOAC 985.29: *Dietary Fiber in Foods* (Enzymatic-Gravimetric Method). En los trabajos realizados por Mingo-Castel *et al* (2009), se observaron valores de almidón en hoja alrededor de 25 $\mu\text{moles/g PF}$ en plantas de Petite Havana sin transformar y 200-250 $\mu\text{moles/g PF}$ en plantas transformadas con el vector pL3PrnG10LTrxf. En el presente trabajo se ha visto que en la variedad Virginia Gold estos valores superaban los 150 $\mu\text{moles/g PF}$ en el caso de las plantas sin transformar, confirmándose que se trata de una variedad de tabaco que acumula altos niveles de almidón en hojas. Sin embargo, a pesar de este hecho, en las hojas de plantas de tabaco

transformadas se ha cuantificado una media de 266 $\mu\text{moles/g}$ PF, por lo que podemos afirmar que los valores absolutos de almidón en hoja son similares a los obtenidos anteriormente con la variedad Petite Havana. Si además consideramos que los mayores valores de almidón se cuantificaron en la primera cosecha (15 días tras el descabezado), donde los datos de peso específico y niveles de clorofila parecen indicar que las fechas de cosecha diseñadas no fueron las adecuadas, tal vez se podrían haber encontrado mayores diferencias en las dos primeras semanas tras el descabezado. En el caso de los azúcares solubles, los mayores niveles se vieron en sacarosa, ya que constituye en muchas plantas la forma mayoritaria de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la misma (Lecourieux *et al.*, 2010). El hecho de no haber encontrado diferencias entre plantas transformadas y control en cuanto al contenido de azúcares podría estar relacionado con el momento de recogida de las muestras.

Para evaluar el potencial fermentador de las hojas de tabaco se calculó el rendimiento en bioetanol a partir de los valores de almidón y azúcares obtenidos en este trabajo. De este modo, se estimaron los litros de bioetanol por hectárea que podríamos obtener con las hojas transformadas de tabaco de la variedad Virginia Gold (Figura 12A) y se comparó este valor con otras materias primas que se han venido utilizando como cultivo energético en los últimos años (Figura 12B). Así hemos podido comprobar que, mientras que en cultivos de cereales como por ejemplo el trigo, se obtienen alrededor de 1000 litros de bioetanol por hectárea (Figura 12B), considerando un rendimiento medio nacional de trigo en España de 2,28 t/ha (datos obtenidos de www.marm.es y www.ine.es), con el tabaco comercial modificado genéticamente podríamos rondar los 1350 litros de bioetanol (Figura 12). Es decir, empleando hojas de tabaco con sobreexpresión de tiorredoxina, obtendríamos el doble de rendimiento que con las plantas sin transformar y un 24% más de bioetanol por hectárea que con el trigo, uno de los cereales más utilizados en España para la obtención de bioetanol (Martínez, 2010). Además, los rendimientos en bioetanol estimados con las hojas de tabaco transgénico, se sitúan cerca de los litros por hectárea de bioetanol obtenidos con otras materias primas como la patata o el grano de maíz, lo que hace del tabaco comercial transformado con Trxf un posible cultivo energético para la obtención de bioetanol. A todo esto hay que añadir que, considerando que para la valoración del potencial fermentador de estas plantas transgénicas de tabaco no se han tenido en cuenta los tallos, su productividad bioenergética podría incluso ser mayor.

Otra ventaja que ofrece el empleo de hojas de tabaco con sobreexpresión de tiorredoxina f como materia prima para la producción de bioetanol es que presentan un alto contenido en agua, lo que podría suponer una reducción del coste de agua del proceso industrial (Andrianov *et al.*, 2009). Del mismo modo, las hojas de tabaco no necesitan pretratamientos severos previos a la hidrólisis enzimática, al contrario que los materiales lignocelulósicos. Esto podría generar un ahorro en los costes y tiempo de producción, dado que el pretratamiento de las materias lignocelulósicas es la etapa que más encarece el proceso (Kumar *et al.*, 2011). Por último, y como ya hemos indicado antes, el uso de plantas de tabaco mejoradas para la producción de bioetanol supondría una alternativa a los cultivos tradicionales de tabaco (como los existentes en la región extremeña de nuestro país) y no compite con el mercado alimentario.

Perspectivas futuras.

En primer lugar, se podría transferir esta tecnología a otros cultivos energéticos, susceptibles de ser transformados plastidialmente con el fin de incrementar sus rendimientos en la producción de bioetanol, como podría ser el caso de la patata. En cuanto al cultivo de las plantas, sería recomendable optimizar las condiciones del ensayo (luz, época de siembra y descabezado, etc.) y determinar el momento óptimo de cosecha. Y por último, se podría valorar el subproducto lignocelulósico del tabaco (tallos) para la producción de bioetanol de segunda generación, ya que los tallos de las plantas de tabaco suponen el 36% del peso total de la planta (Martínez, 2010) y son una fuente rica en celulosa que puede ser valorada para la obtención de bioetanol, realizando así un aprovechamiento integral de la planta.

CONCLUSIONES

1. La proteína tiorredoxina f (Trxf) se ha expresado de forma estable, mediante transformación plastidial, en las hojas de tabaco de la variedad comercial Virginia Gold, alcanzándose los mayores niveles de expresión en hoja joven.
2. La expresión de Trxf en los cloroplastos de tabaco incrementó entre dos y tres veces el contenido de almidón en las hojas de tabaco transformadas con respecto a las control, no apreciándose diferencias en cuanto al contenido de azúcares solubles.
3. Los mayores niveles de almidón en hoja de plantas transformadas se registraron en la primera cosecha (15 días tras el descabezado de las plantas), alcanzando los 270 ± 31 μ moles de glucosa por gramo de peso fresco.
4. El almidón se acumuló principalmente en las hojas jóvenes y maduras de las plantas transformadas, siendo estos valores hasta 1,5 veces superiores que en las plantas sin transformar.
5. El descabezado de las plantas de tabaco favoreció la acumulación de almidón en las hojas de las plantas transformadas con la Trxf, evitando la migración de los fotoasimilados a los órganos sumidero (flores y frutos en formación).
6. El rendimiento de bioetanol estimado para la variedad comercial de tabaco Virginia Gold transformada con el gen de la tiorredoxina ronda los 1350 L bioetanol/ha e incrementaría en un 80% la producción de bioetanol obtenida en las hojas de tabaco sin transformar, alcanzando valores similares a otros cultivos energéticos como el trigo.

BIBLIOGRAFÍA

- Amorim, H.V., Lopes, M.L., de Castro Oliveira, J.V., Buckeridge, M.S., and Goldman, G.H. (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 1267-1275.
- Andrianov, V., Borisjuk, N., Pogrebnyak, N., Brinker, A., Dixon, J., Spitsin, S., Flynn, J., Matyszczyk, P., Andryszak, K., Laurelli, M., Golovkin, M., and Koprowski, H. (2009) Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of Arabidopsis DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnol J* **8**: 277-287.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., and Bornke, F. (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Cell* **22**: 1498-1515.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Cai, N., Manieri, W., Schurmann, P., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2006) A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2988-2993.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P., and Preiss, J. (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352.
- Ball, S.G., and Morell, M.K. (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 207-233.
- Barney, J. and DiTomaso, J. (2011) Global Climate Niche Estimates for Bioenergy Crops and Invasive Species of Agronomic Origin: Potential Problems and Opportunities. *OPeN one* **6**.
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Zanduetta-Criado, A., Moran-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Alonso-Casajus, N., and Pozueta-Romero, J. (2004) Most of ADP x glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13080-13085.
- Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 641-650.
- Bock, R. (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* **312**: 425-438.
- Bock, R., and Khan, M.S. (2004) Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol* **22**: 311-318.
- Bock, R. (2007) Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 100-106.
- Brown, V.J. (2006) Biogas: a bright idea for Africa. *Health perspectives* **114**.
- Buchanan, B.B., Adamidi, C., Lozano, R.M., Yee, B.C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., and Frick, O.L. (1997) Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5372-5377.
- Buchanan, B.B., and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 187-220.
- Buchanan, C.M., Alderson, S.R., Cleven, C.D., Dixon, D.W., Ivanyi, R., Lambert, J.L., Lowman, D.W., Offerman, R.J., Szejtli, J., and Szente, L. (2002) Synthesis and characterization of water-soluble hydroxybutenyl cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins). *Carbohydr Res* **337**: 493-507.
- Cabrera, J.A. (2006) Informe CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas). Almería, Andalucía, España: Plataforma Solar de Almería.

- Chibani, K., Couturier, J., Selles, B., Jacquot, J.P., and Rouhier, N. (2009) The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosynth Res* **104**: 75-99.
- Cho, M.J., Wong, J.H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P.G., and Buchanan, B.B. (1999) Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14641-14646.
- Daniell, H. (1997) Transformation and foreign gene expression in plants by microprojectile bombardment. *Methods Mol Biol* **62**: 463-489.
- Daniell, H. (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J* **1**: 1071-1079.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.B., Miller, M., and Daniell, H. (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* **19**: 71-74.
- Dunnett, A.J., Adjiman, C.S., and Shah, N. (2008) A spatially explicit whole-system model of the lignocellulosic bioethanol supply chain: an assessment of decentralised processing potential. *Biotechnol Biofuels* **1**: 13.
- Eibl, C., Zou, Z., Beck, a., Kim, M., Mullet, J., and Koop, H.U. (1999) In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J* **19**: 333-345.
- Eklund, H., Gleason, F.K., and Holmgren, A. (1991) Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**: 13-28.
- Farran, I., Rio-Manterola, F., Iniguez, M., Garate, S., Prieto, J., and Mingo-Castel, A.M. (2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* **6**: 516-527.
- Fernandez-San Millan, A., Mingo-Castel, A., Miller, M., and Daniell, H. (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol J* **1**: 71-79.
- Fernandez-San Millan, A., Ortigosa, S.M., Hervas-Stubbs, S., Corral-Martinez, P., Segui-Simarro, J.M., Gaetan, J., Coursaget, P., and Veramendi, J. (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J* **6**: 427-441.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. *Nucleic Acids Res* **19**: 4083-4089.
- Hagemann, R. and Schröder M. B. (1989) The cytological basis of the plastid inheritance in angiosperms. *Protoplasma* **152**: 57-64.
- Hancsók J., Baladincz P., Tamás Kasza, Sándor Kovács, Csaba Tóth, and Zoltán Varga (2011) Bio Gas Oil Production from Waste Lard. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G., and Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* **24**: 549-556.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., and Tiffany, D. (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11206-11210.

- Huang, W.D., and Zhang, Y.H. (2011) Energy efficiency analysis: biomass-to-wheel efficiency related with biofuels production, fuel distribution, and powertrain systems. *PLoS One* **6**: e22113.
- Iratni, R., Diederich, L., Harrak, H., Bligny, M., and Lerbs-Mache, S. (1997) Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids. *J Biol Chem* **272**: 13676-13682.
- Issakidis-Bourguet, E., Mouaheb, N., Meyer, Y., and Miginiac-Maslow, M. (2001) Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *Plant J* **25**: 127-135.
- Joudrier, P., Gautier, M.F., de Lamotte, F., and Kobrehel, K. (2005) The thioredoxin h system: potential applications. *Biotechnol Adv* **23**: 81-85.
- Kashiwagi, L.K., Sube Singh and HD Upadhyaya (2006) Variation of SPAD Chlorophyll Meter Readings (SCMR) in the Mini-Core Germplasm Collection of Chickpea. *SAT eJournal* **2**.
- Katz, Y.S., and Danon, A. (2002) The 3'-untranslated region of chloroplast *psbA* mRNA stabilizes binding of regulatory proteins to the leader of the message. *J Biol Chem* **277**: 18665-18669.
- Khan, M.S., and Maliga, P. (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* **17**: 910-915.
- Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S.F., Gould, F., and Moar, W.J. (1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1840-1845.
- Kowalczyk-Juśko A., Kościk B. (2002) Possible use of the chlorophyll meter (SPAD-502) for evaluating nitrogen nutrition of the Virginia tobacco. In *Electronic journal of polish agricultural universities*. Vol. 5.
- Kumar, K., Dasgupta, C.N., Nayak, B., Lindblad, P., and Das, D. (2011) Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresour Technol* **102**: 4945-4953.
- Lecourieux, F., Lecourieux, D., Vignault, C., and Delrot, S. (2010) A sugar-inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grapevine cells. *Plant Physiol* **152**: 1096-1106.
- Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., and Issakidis-Bourguet, E. (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* **51**: 343-365.
- Lutz, K.A., and Maliga, P. (2007) Construction of marker-free transplastomic plants. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 107-114.
- Maliga, P. (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 289-313.
- Martínez, O. (2010) Valoración de plantas de tabaco con sobreexpresión de tiorredoxina como materia prima en la producción de bioetanol. Trabajo Fin de Máster. UPNA.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M., and Maliga, P. (1995) Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (N Y)* **13**: 362-365.
- Meyer, Y., Reichheld, J.P., and Vignols, F. (2005) Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynth Res* **86**: 419-433.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., and Reichheld, J.P. (2009) Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* **43**: 335-367.
- Mingo-Castel, A.M., Farran, I. and Sanz-Barrio R. (2009) Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas. Vol. WO 2009/156545 A1 España.

- Miyagawa, Y., Tamoi, M., and Shigeoka, S. (2001) Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nat Biotechnol* **19**: 965-969.
- Molina, A., Hervas-Stubbs, S., Daniell, H., Mingo-Castel, A.M., and Veramendi, J. (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* **2**: 141-153.
- Moll, B. and Polsby L. (1990) Streptomycin and lincomycin resistances are selective plastid markers in cultured *Nicotiana* cells. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 245-250.
- Montrichard, F., Alkhalifioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics* **72**: 452-474.
- Murata, T., Minamikawa, T., Akazawa, T., and Sugiyama, T. (1964) Isolation Of Adenosine Diphosphate Glucose From Ripening Rice Grains And Its Enzymic Synthesis. *Arch Biochem Biophys* **106**: 371-378.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.
- Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B., and Bock, R. (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J* **57**: 436-445.
- Olins, P.O., Devine, C.S., Rangwala, S.H., and Kavka, K.S. (1988) The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene* **73**: 227-235.
- Recondo, E., Dankert, M., and Leloir, L.F. (1963) Isolation of adenosine diphosphate D-glucose from corn grains. *Biochem Biophys Res Commun* **12**: 204-207.
- Rolletschek, H., Hajirezaei, M.R., Wobus, U., and Weber, H. (2002) Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* **214**: 954-964.
- Rott, R., Liveanu, V., Drager, R.G., Stern, D.B., and Schuster, G. (1998) The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol Biol* **36**: 307-314.
- Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y. (1996) Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J Mol Evol* **42**: 422-431.
- Sakai, K., and Shimamoto, Y. (1965) Developmental Instability in Leaves and Flowers of *NICOTIANA TABACUM*. *Genetics* **51**: 801-813.
- Sanz-Barrio, R., Millan, A.F., Corral-Martinez, P., Segui-Simarro, J.M., and Farran, I. (2011) Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts. *Plant Biotechnol J* **9**: 639-650.
- Schurmann, P., and Buchanan, B.B. (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1235-1274.
- Schwietzke, S., Griffin, W.M., and Matthews, H.S. (2011) Relevance of emissions timing in biofuel greenhouse gases and climate impacts. *Environ Sci Technol*.
- Shiina, T., Allison, L., and Maliga, P. (1998) *rbcL* Transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* **10**: 1713-1722.
- Slattery, C.J., Kavakli, I.H., and Okita, T.W. (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci* **5**: 291-298.
- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., and Kishore, G.M. (1992) Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science* **258**: 287-292.

- Staub, J.M., and Maliga, P. (1994) Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J* **6**: 547-553.
- Staub, J.M., and Maliga, P. (1995) Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J* **7**: 845-848.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., and Russell, D.A. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* **18**: 333-338.
- Sticklen, M.B. (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* **9**: 433-443.
- Sugiura, M., Hirose, T., and Sugita, M. (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu Rev Genet* **32**: 437-459.
- Svab, Z., and Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 913-917.
- Takagi, T., and Hizukuri, S. (1984) Molecular weight and related properties of lily amylose determined by monitoring of elution from TSK-GEL PW high performance gel chromatography columns by the low-angle laser light scattering technique and precision differential refractometry. *J Biochem* **95**: 1459-1467.
- Takeda, Y., and Hizukuri, S. (1986) Actions of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase, potato phosphorylase, and rabbit muscle phosphorylase a and b on phosphorylated (1----4)-alpha-D-glucan. *Carbohydr Res* **153**: 295-307.
- Tammisola, J. (2010) Towards much more efficient biofuel crops - can sugarcane pave the way? *GM Crop* **1**: 181-198.
- Tang, Y., Zhao, D., Cristhian, C., and Jiang, J. (2011) Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media. *Biotechnol Biofuels* **4**: 22.
- Tregoning, J.S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K.J., Dougan, G., and Maliga, P. (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **31**: 1174-1179.
- Wong, J.H., Kim, Y.B., Ren, P.H., Cai, N., Cho, M.J., Hedden, P., Lemaux, P.G., and Buchanan, B.B. (2002) Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16325-16330.
- Yabuta, Y., Tamoi, M., Yamamoto, K., Tomizawa, K., Yokota, A., and Shigeoka, S. (2008) Molecular design of photosynthesis-elevated chloroplasts for mass accumulation of a foreign protein. *Plant Cell Physiol* **49**: 375-385.
- Yadav, P.K., Singh, O., and Singh, R.P. (2010) Palm fatty acid biodiesel: process optimization and study of reaction kinetics. *J Oleo Sci* **59**: 575-580.
- Zoubenko, O.V., Allison, L.A., Svab, Z., and Maliga, P. (1994) Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Res* **22**: 3819-3824.