

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
El cambio climático.....	3
La aclimatación fotosintética.....	4
Interacción entre CO <sub>2</sub> y el nitrógeno.....	5
Tiorredoxina m (TrxM).....	6
Relación entre TrxM y el metabolismo del nitrógeno.....	7
OBJETIVOS .....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
Diseño experimental.....	10
Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	11
Muestreo y análisis del crecimiento.....	13
Determinación de intercambio gaseoso .....	13
Determinación de azúcares solubles y almidón .....	13
Determinación de aminoácidos totales .....	14
Determinación de proteína soluble total .....	14
Confirmación de sobreexpresión de TrxM.....	15
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS .....	16
Crecimiento .....	16
Fotosíntesis o intercambio gaseoso .....	17
Almidón.....	20
Azúcares solubles .....	21
Aminoácidos totales .....	23
Proteína soluble total .....	24
Sobreexpresion de TrxM .....	25
DISCUSIÓN .....	26
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	30

# 1. RESUMEN

---

Desde la revolución industrial se ha producido el aumento de la concentración de los gases de efecto invernadero como es el CO<sub>2</sub>. Este aumento de [CO<sub>2</sub>] tiene un efecto sobre muchas plantas, y es que, frecuentemente, las conduce a un proceso que se conoce como la aclimatación fotosintética. Dicho proceso se caracteriza por presentar las plantas unas tasas fotosintéticas inferiores a las esperadas al tener una concentración de CO<sub>2</sub> alta. Las opiniones generales apuntan a que la aclimatación es resultado de la represión de la enzima Rubisco provocado por una acumulación de azúcares en la planta asociado a una baja fuerza sumidero de los órganos consumidores vegetales, y debido a una deficiencia de nitrógeno en la planta. De hecho, las últimas investigaciones se han centrado en la deficiencia de nitrógeno, y se ha visto que en ambientes con [CO<sub>2</sub>] elevado hay una peor asimilación de nitrógeno (especialmente del nitrato) por parte de la planta. Las plantas fertilizadas con nitrato amónico, tienen una mejor asimilación de nitrógeno. Por otra parte, gracias al trabajo llevado en el laboratorio de Agrobiotecnología Vegetal (IdAB) se han obtenido plantas de tabaco transplastómicas que sobreexpresan la tiorredoxina m (TrxM) y se ha visto su posible implicación en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

Todo ello, ha llevado a plantear como objetivo de este trabajo someter a plantas de tabaco (cv. Petit Havana) silvestres y transplastómicas a [CO<sub>2</sub>] elevado para observar la aclimatación fotosintética primero, y después la posible recuperación gracias a la fertilización con nitrato amónico. Además se ha querido observar la implicación de TrxM en el metabolismo del N y C.

En el experimento se ha visto que la fertilización con nitrato amónico mejora las tasas fotosintéticas de las plantas crecidas en [CO<sub>2</sub>] elevado. En las plantas silvestres de tabaco se ha dado una disminución de la acumulación de azúcares solubles, mientras que en las plantas transplastómicas se ha producido una disminución de almidón. La asimilación con nitrato amónico requiere menor gasto energético que la asimilación de nitrato. La planta al estar sometida a [CO<sub>2</sub>] elevado sufre una situación de falta de energía y poder reductor y asimila el amonio con mayor facilidad. Así la fertilización con amonio ha permitido tener un mejor estado nitrogenado a la planta y que evitaría la supresión de Rubisco.

Por tanto, se ha demostrado que las plantas sometidas a [CO<sub>2</sub>] elevado sufren aclimatación fotosintética y que la fertilización con nitrato amónico mejora el estado de las plantas sometidas a [CO<sub>2</sub>] elevado. Por otra parte, los resultados no han permitido identificar las implicaciones directas de TrxM con el metabolismo de N.

## 2. ABSTRACT

---

Since the industrial revolution there has been increasing the concentration of greenhouse gases such as CO<sub>2</sub>. This increased in [CO<sub>2</sub>] has an effect on many plants, and that leads to a process known as photosynthesis acclimation. This process is characterized by lower photosynthetic rates than would be expected given the high levels of CO<sub>2</sub> concentration. The general theories suggest that it is a result of the repression of the enzyme Rubisco caused by an accumulation of sugars in the plant associated with a low sink strength of plant consumer tissues, but is also thought that it could be due to nitrogen deficiency in the plant. In fact, recent research has focused on nitrogen deficiency, and it has been seen a worst nitrogen (as nitrate) assimilation by the plant in environments where [CO<sub>2</sub>] is high. Plants fertilized with ammonium nitrate, instead of nitrate, have been described to have better nitrogen assimilation. Moreover, thanks to the work in the laboratory of Plant Agrobiotechnology (IdAB) were obtained tobacco transplastomic plants overexpressing thioredoxin m (TrxM) and has been seen its possible involvement in the regulation of nitrogen metabolism.

Given this we have decided to expose tobacco (cv. Petit Havana) wild type and transplastomic plants to high [CO<sub>2</sub>] in order to observe photosynthetic acclimation first, and then the possible recovery thanks to fertilization with ammonium nitrate. We have also tried to observe TrxM involvement in the metabolism of N and C.

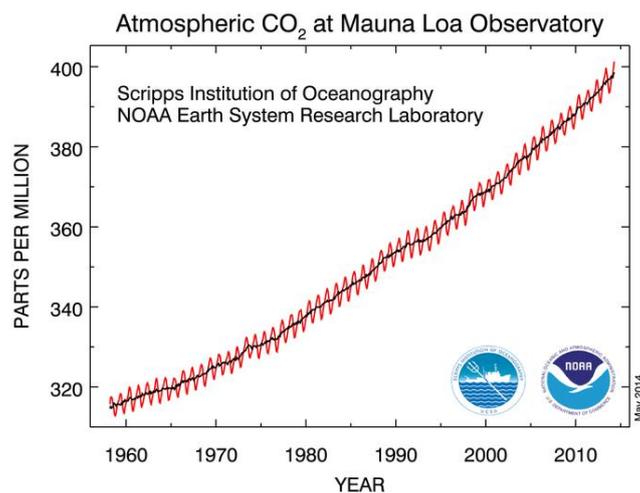
In the experiment, it has been found that ammonium nitrate fertilization improved plants photosynthetic rates grown in high [CO<sub>2</sub>]. In wild type plants has been a decrease in the accumulation of soluble sugars, whereas in transplastomic plants has been a decrease in starch. Ammonium nitrate assimilation requires less energy than nitrate assimilation. The plant subjected to elevate [CO<sub>2</sub>] suffers a situation of lack of energy and reducing power and assimilates ammonium easier. Thus ammonium fertilization has allowed for a better nitrogen status that enabled the maintenance of control Rubisco content values.

Therefore, it has been shown that plants under elevated [CO<sub>2</sub>] suffer photosynthetic acclimatization and fertilization with ammonium nitrate improves the condition of the plants subjected to high [CO<sub>2</sub>]. On the other hand, the results have not allowed to associate direct implications of TrxM with N metabolism.

# 3. INTRODUCCIÓN

## 1. EL CAMBIO CLIMÁTICO

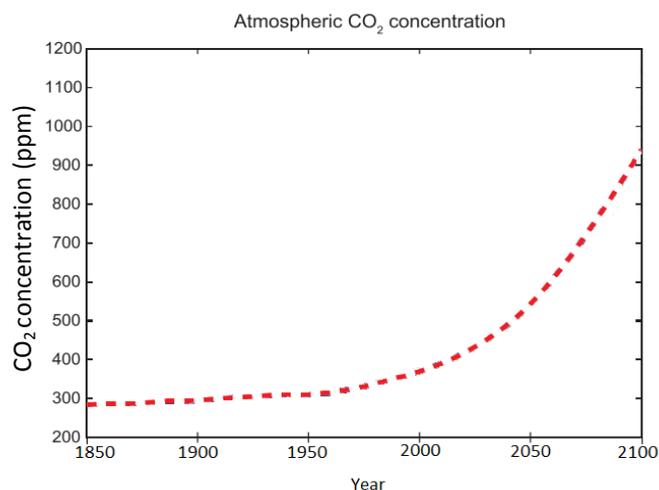
Como consecuencia de la actividad humana, la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico se ha visto incrementada desde la Revolución Industrial. Gran parte de dicho incremento se debe a las emisiones derivadas de la quema de los combustibles fósiles por parte de la industria y el transporte (McMichael, 2013). Fueron las mediciones de temperatura realizadas por Callendar los que alertaron que entre los años 1890 y 1935 la temperatura mundial había aumentado 0,2°C. A raíz de ello, Callendar defendió que el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> podía ser el responsable de aquel calentamiento global. Aunque la comunidad científica desechó su teoría alegando que el CO<sub>2</sub> emitido por la industria se diluiría en el gran volumen de los océanos, a partir de los años 50 comenzó a aumentar la preocupación, ya que se observó que solo una minúscula porción de la emisión del CO<sub>2</sub> radioactivo (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>) era intercambiado entre la atmósfera y el océano. Esto probaba que la mayoría del CO<sub>2</sub> quedaría en la atmósfera y por consiguiente la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico iría incrementando (Bloom, 2010). De hecho la deforestación y la saturación de los océanos hacen que ni la tierra ni el mar sean capaces de absorber los niveles extra de CO<sub>2</sub> (McMichael, 2013).



**Figura 3.1:** Medidas de concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica realizada en el observatorio de Mauna Loa desde 1957 hasta la actualidad (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/obop/mlo/>).

En 1988 se creó el Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC) formado por científicos de todo el mundo, con el objetivo de proporcionar información objetiva y veraz sobre el cambio climático y otros aspectos relacionados. Gracias a los avances tecnológicos a partir del año 1958 se comenzó a monitorizar la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> con precisión en Hawaii (Observatorio de Mauna Loa). Desde que comenzó la Revolución Industrial el CO<sub>2</sub> ha aumentado de 270ppm a 380ppm (Figura 3.1) (Bloom, 2010). Las últimas mediciones indican que se ha llegado a un valor histórico de 400 ppm en el año 2014. Es importante llevar una monitorización del estado de los elementos contribuyentes al cambio climático, como lo es el CO<sub>2</sub>, para poder predecir los niveles que habrá en el futuro. Para establecer las predicciones se utilizan modelos matemáticos complejos. Sin embargo, las fluctuaciones del clima hacen que sea difícil hacer unas predicciones exactas. Los modelos utilizados por el IPCC permiten hacer proyecciones sobre las emisiones del hombre, así como sobre los cambios

producidos en las fuentes naturales de CO<sub>2</sub>. Según los modelos previstos por el IPCC se espera que para el año 2100 habrá una [CO<sub>2</sub>] atmosférica de ~950 ppm (Figura 3.2).



**Figura 3.2:** Representación gráfica de la predicción de [CO<sub>2</sub>] atmosférica según los modelos de IPCC.

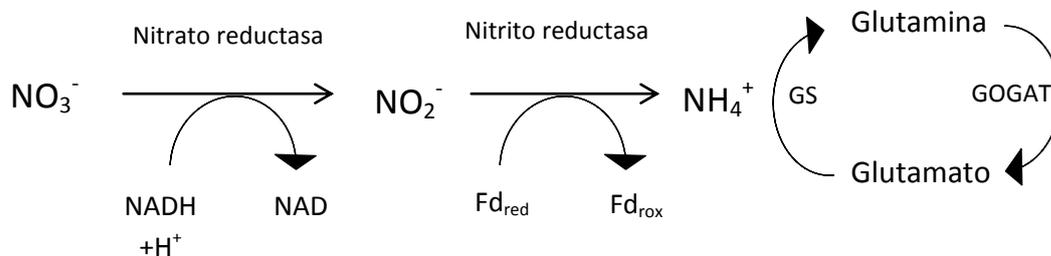
## 2. LA ACLIMATACIÓN FOTOSINTÉTICA

Teniendo en cuenta que la actividad fotosintética de las plantas C<sub>3</sub> está condicionada por la [CO<sub>2</sub>], hay estudios que sugieren que el incremento de [CO<sub>2</sub>] conllevará un incremento en la actividad fotosintética y el crecimiento de las plantas, además de una disminución de la apertura estomática (Aranjuelo et al., 2011). La Rubisco es la proteína mayoritaria (puede llegar a representar el 50 % de las proteínas foliares) en las plantas y por tanto la que ha sido caracterizada en mayor medida en estudios previos. La Rubisco es capaz de llevar a cabo dos reacciones diferentes dependiendo de si reacciona con CO<sub>2</sub> (asimilación de C) o con oxígeno (fotorespiración). Estudios previos (Long et al., 2004) indican que la exposición prolongada al [CO<sub>2</sub>] elevado disminuye la capacidad fotosintética, lo que se conoce como aclimatación fotosintética. Según Bloom, et al. (2010; 2014) el descenso en la fotorespiración, así como el desajuste en la capacidad fuente / sumidero de carbono y la limitación de nitrógeno (N), son los procesos clave que condicionan la capacidad de respuesta de las plantas al incremento de [CO<sub>2</sub>]. El descenso de la actividad fotorespiratoria disminuiría la disponibilidad de poder reductor y ATP, con las consiguientes limitaciones en la disponibilidad energética necesaria para poder asimilar el N absorbido (Bloom, 2010). Debido al aumento de la tasa fotosintética de las plantas expuestas se produce un aumento de los carbohidratos, que muchas veces la planta no es capaz de utilizar debido a la falta de sumideros de C, con la consiguiente acumulación de almidón (Aranjuelo et al., 2011). Se ha visto que las plantas que sufren la aclimatación fotosintética tienen una menor cantidad de Rubisco y una menor actividad en la enzima (Aranjuelo et al., 2011). Según el modelo descrito por Moore et al. (1999), el incremento de fotoasimilados induce la actividad de la enzima hexoquinasa. El incremento en la actividad de esta enzima genera una señal que inhibe la síntesis de la Rubisco.

### 3. INTERACCIÓN ENTRE CO<sub>2</sub> Y EL NITRÓGENO

Hay que tener en cuenta que el crecimiento en un ambiente de CO<sub>2</sub> elevado conlleva a una mayor demanda de nutrientes minerales por parte de la planta, que podría afectar al estado nutricional de la planta (Stitt & Krapp, 1999). Uno de los elementos más importantes es el N, forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas. Las plantas sometidas a una concentración elevada de CO<sub>2</sub> pueden sufrir una situación de limitación de N (Bloom, 2010). Así la aclimatación de la fotosíntesis es habitualmente más severa en plantas con fuente de nitrógeno limitada (Stitt & Krapp, 1999). Cuando las plantas crecen en condiciones de escasez de N, la aclimatación fotosintética asociada al [CO<sub>2</sub>] elevado, puede ser debida a la redistribución de N fuera del aparato fotosintético (sobre todo fuera de la Rubisco). La disminución en la concentración de Rubisco puede reflejar una disminución general de proteínas de la hoja debido a la reubicación de N en otras partes de la planta. Por tanto, la capacidad de respuesta del aparato fotosintético y, por consiguiente, el rendimiento de las plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> estarán influidas por la disponibilidad de N del suelo.

Tal y como se ha indicado anteriormente, estudios recientes indican que el crecimiento en condiciones de elevada concentración de CO<sub>2</sub> inhibe la asimilación de N (Bloom, 2010). La óptima absorción y asimilación de N edáfico es esencial para el óptimo crecimiento de las plantas. Las fuentes de N más habituales para las plantas son el nitrato y el amonio presentes en el suelo. Las plantas absorben el N por la raíz dónde el nitrato es reducido a nitrito a través de la nitrato reductasa (NR), y después a amonio por acción de la nitrito reductasa (NiR). El amonio es un compuesto tóxico, por lo que debe ser incorporado rápidamente al glutamato para formar la glutamina gracias a la glutamato sintasa (GS) (Maldonado, 2008) (Figura 3.3).



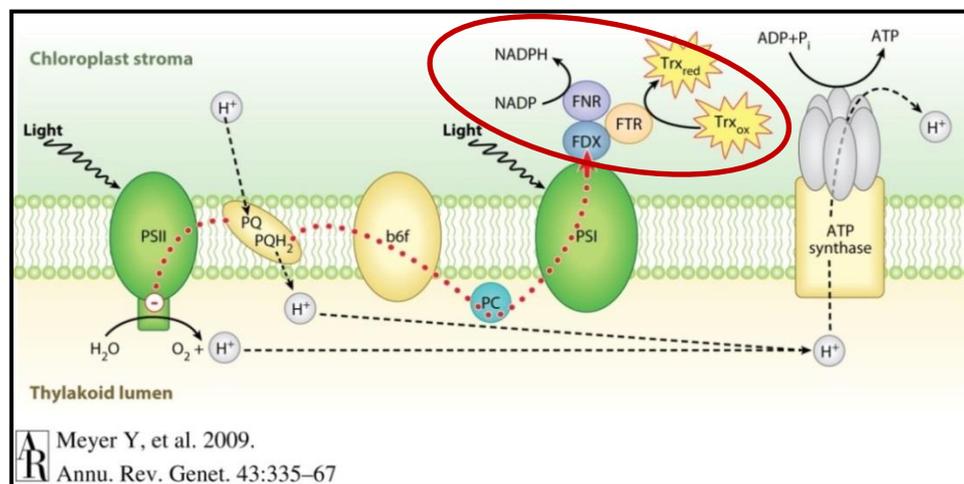
**Figura 3.3:** Representación del proceso de asimilación de N con las enzimas principales que participan en el: Nitrato reductasa (NR), Nitrito reductasa (NiR), GS (Glutamato sintetasa), GOGAT (Glutamato sintetasa). Para que se asimile N que forma parte del nitrato hace falta consumir 8 electrones que son proporcionados por NADH y Ferredoxina (Fd). (Maldonado, 2008).

Algunos autores (Bloom et al., 2010; Geiger et al., 1999; Stitt & Krapp, 1999) indican que la capacidad de respuesta de las plantas al [CO<sub>2</sub>] elevado varía en función de la fuente nitrogenada que se suministra a las plantas. Se ha observado cómo en condiciones de alta [CO<sub>2</sub>], las plantas asimilan, de forma preferencial, el amonio frente al nitrato. Es más, estudios previos (Matt et al., 2001) revelan que la actividad nitrato reductasa foliar/radicular se ve inhibida por la exposición al [CO<sub>2</sub>] elevado. Dicha inhibición estaría causada por el descenso en la actividad fotorespiratoria (fuente de poder reductor (NADH)) de las plantas. De manera que la disminución de la actividad de la nitrato reductasa puede explicarse por la falta de NADH (Bloom, 2010). Por otra parte, también se piensa que [CO<sub>2</sub>] elevado disminuye el transporte de nitrito al cloroplasto, y que NR compite con Ferredoxina- NADP reductasa por la ferredoxina reducida teniendo menor afinidad por este último. Todos estos mecanismos podrían explicar la

disminución de la actividad de NR en un ambiente de  $[\text{CO}_2]$  elevado (Bloom et al., 2010; 2014). Además la asimilación del amonio requiere menor cantidad de energía que la asimilación de nitrato, por lo que sería acertado pensar que la planta en una situación de falta energética muestre una preferencia por el amonio. De hecho en experimentos realizados con fertilización de amonio se observó una mejor respuesta fisiológica de las plantas sometidas a  $[\text{CO}_2]$  elevado (Bloom et al., 2002).

#### 4. TIORREDOXINA M (*TrxM*)

Las tiorredoxinas (*Trx*) son pequeñas proteínas que se encuentran en todos los organismos de vida libre. Catalizan reacciones redox, ayudan en la formación de puentes disulfuro y actúan de manera sinérgica con isomerasas y chaperonas para controlar un amplio rango de reacciones (Sanz-Barrio et al., 2011). La familia de las *Trxs* se caracteriza por poseer un motivo llamado plegamiento *Trx*. Este motivo se compone de una lámina  $\beta$  central (formada por 4 cadenas  $\beta$ ) rodeada por 3 hélices  $\alpha$ . Las glutaredoxinas, también miembros de la familia *Trx*, presentan esta estructura básica. Las *Trxs* además presentan una lámina  $\beta$  y hélice  $\alpha$  adicionales en el extremo N-terminal. La característica principal de este motivo es el sitio activo compuesto por Cys-X-X-Cys (Berndt et al., 2008), el cual participa en la reducción de puentes disulfuro. Por tanto, la función principal de las *Trxs* es reducir los puentes disulfuro expuestos de las proteínas diana oxidadas. La reacción ocurre en dos pasos: primero la cisteína N-terminal de la *Trx* ataca el puente disulfuro de la proteína diana, y libera un grupo thiol mientras forma un puente disulfuro con la segunda Cys de la proteína diana. En segundo lugar, el residuo thiol C-terminal de la *Trx* rompe el puente disulfuro formado entre *Trx* y la proteína diana y se libera la proteína diana reducida (Meyer et al., 2009).



**Figura 3.4:** Representación esquemática de la cadena transportadora de electrones del tilacoide. El círculo rojo envuelve el proceso en el que se da la reducción de *Trx*.

En las plantas el sistema *Trx* es particularmente complejo. Se han escrito múltiples isoformas presentes en distintos compartimentos celulares: núcleo, citoplasma, retículo endoplasmático, mitocondria y cloroplastos, que regulan infinidad de procesos metabólicos (Schürmann & Buchanan, 2008). Para poder llevar a cabo su función las *Trxs* deben estar reducidas. En el cloroplasto las *Trxs* son reducidas por la ferredoxina (Fd) y la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) (Figura 3.4). La Fd es reducida por la cadena transportadora de electrones del tilacoide, y además de transferir los electrones al NADP, trasmite el flujo a FTR reduciendo así

a las Trxs (Anderson et al., 2008)(Figura3.4). En los cloroplastos iluminados Trx se reduce durante las horas de luz y durante la noche Trx permanece oxidada, con la mayoría de sus enzimas diana desactivadas. Sin embargo, hay enzimas, como glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, que permanecen activas cuando están oxidadas, de manera que permanecen activas durante la noche, tal y como lo requieren las necesidades del cloroplasto (Meyer et al., 2009).

En los cloroplastos se conocen cinco tipos de Trxs: f, m, x, y, z. Las isoformas f y m actúan como intermediarios enviando las señales del sistema de señalización Fd/Trx a las enzimas diana (Meyer et al., 2009). Cuando se descubrió la Trx m (TrxM) se denominó de esta manera porque era capaz de activar la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NADP llevando a cabo su reducción. La Trx M también se ha observado que está involucrada en la activación del metabolismo del carbono y en la regeneración de la actividad de enzimas que participan en mecanismos de detoxificación (Rey et al., 2013). Estos investigadores consiguieron sobreexpresar de manera estable la TrxM en los cloroplastos de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana) y observaron que estas plantas presentaban una coloración verde pálida debida a una disminución en el contenido de clorofila y un crecimiento más lento en comparación con el genotipo silvestre de la misma especie. Por otra parte, mostraban también un mal funcionamiento del fotosistema II. Sin embargo, presentaron una mayor tolerancia a tratamientos de estrés oxidativo como la exposición a alta luz y baja temperatura (condiciones que dañan las membranas tilacoidales) o a metil viologeno (herbicida que genera radicales superóxido) (Rey et al., 2013). Por lo que, TrxM parece tener una implicación en situaciones de estrés oxidativo. La inactivación de tres genes de TrxM en *Arabidopsis thaliana* también produce una coloración verde pálida y una disminución en el contenido de clorofila, además de un mal funcionamiento del fotosistema II (Wang et al., 2013). En plantas de arroz (*Oryza sativa*) con TrxM silenciado se ha visto también una disminución en la cantidad de clorofila y una coloración verde poco intensa, además de un desarrollo anormal del cloroplasto y un crecimiento reducido de las plantas (Chi et al., 2008).

## 5. RELACIÓN ENTRE TrxM Y EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO

Hasta la fecha se han descrito numerosas proteínas diana de las Trxs (Montrichard et al., 2009), por lo que se les han asociado funciones variadas. En las primeras investigaciones se trataban las proteínas diana con ditionitrosol (DTT) para observar el cambio en la actividad de estas enzimas y deducir su posible regulación por Trxs. Más tarde comenzaron a utilizarse sondas fluorescentes específicas con grupos thiol, combinado con la separación de proteínas en geles bidimensionales y con la secuenciación de moléculas. Otro marcaje utilizado es el basado en etiquetas de afinidad codificadas por isótopos (ICAT) (Montrichard et al., 2009). También se han ido identificando proteínas diana de las Trxs mediante secuestro de éstas en matrices que contienen Trx mutadas. En este caso, las proteínas diana se unen a la Trx mutada y después de un lavado con DTT son liberadas para ser estudiadas mediante secuenciación o espectrometría de masas (Montrichard et al., 2009). En base a estos estudios y otros bioquímicos, a TrxM se le han asignado distintas funciones: detoxificación de radicales de oxígeno, ya que una inactivación de TrxM puede llevar a la acumulación de ROS en *A. thaliana* (Wang et al., 2013) y en arroz (Chi et al., 2008), y se ha visto que interactúa con la peroxiredoxina (Prx) reduciendo el peróxido de agua (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); regulación de proteínas del ciclo

de Calvin (Anderson et al., 2008; Balmer et al., 2003); metabolismo del cloroplasto, ya que activa NADP-malato deshidrogenasa (Balmer et al., 2003); ciclo oxidativo de las pentosas fosfato inactivando la enzima glucosa-6 fosfato deshidrogenasa durante las horas de luz (Wenderoth et al., 1997); síntesis de lípidos (Balmer et al., 2003); metabolismo del nitrógeno (Motohashi et al., 2001; Balmer et al., 2003); biosíntesis del fotosistema II; síntesis de clorofila (Wang et al., 2013; Luo et al., 2012); plegamiento de proteínas (Sanz-Barrio et al., 2012; Balmer et al., 2003).

Dentro de las proteínas que participan en el metabolismo del nitrógeno, se han descrito como posibles dianas de TrxM glutamina sintasa (Motohashi et al., 2001; Balmer et al., 2003) y ferredoxina:glutamato sintasa (Fd:GOGAT) (Balmer et al., 2006), enzimas importantes en la asimilación de N; y fosfoglicerato deshidrogenasa que participa en la síntesis de serina (Balmer et al., 2003).

Como se ha comentado anteriormente, la aclimatación fotosintética puede ser resultado de una deficiencia en nitrógeno debido a una mala asimilación de la misma por falta de energía y poder reductor. Por ello, consideramos que sería interesante observar la implicación de TrxM en el metabolismo del nitrógeno y para ello, someter a plantas con sobreexpresión de TrxM a una situación en la que podrían sufrir aclimatación fotosintética (exposición a [CO<sub>2</sub>] elevado). Así podría estudiarse el comportamiento de TrxM y su acción sobre sus proteínas diana como puede ser glutamina sintasa, enzima que puede verse afectada en situaciones de aclimatación fotosintética y limitación de N, como se ha visto anteriormente en tabaco (Matt et al., 2001).

## 4. OBJETIVOS

---

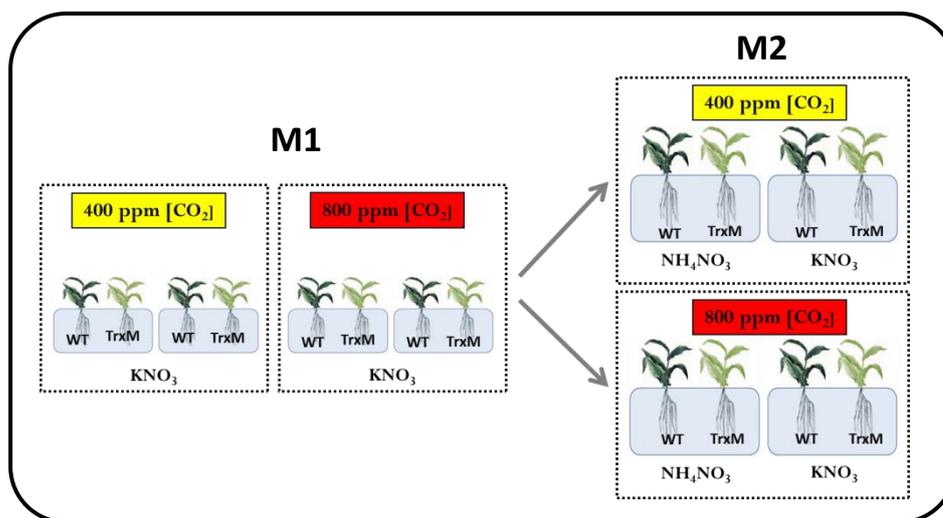
1. Observar el proceso de aclimatación fotosintética en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana) de genotipo silvestre y plantas con sobreexpresión de TrxM expuestas a una elevada concentración de CO<sub>2</sub> (800 ppm).
2. Analizar las implicaciones de las diferentes fuentes nitrogenadas (nitrato vs nitrato amónico) sobre la actividad fotosintética de las plantas sometidas a concentraciones de CO<sub>2</sub> elevado.
3. Analizar la implicación de TrxM en la regulación del metabolismo del nitrógeno y aparato fotosintético en condiciones de [CO<sub>2</sub>] elevado.

# 5. MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la intención de estudiar los objetivos de este trabajo se planteó un diseño experimental con dos periodos temporales (Figura 5.1). En el primer periodo, denominado momento 1 (M1) se aplicaron dos tratamientos de concentración de CO<sub>2</sub>: [CO<sub>2</sub>] ambiente (400 ppm) y [CO<sub>2</sub>] elevado (800 ppm). Estos tratamientos se aplicaron sobre dos genotipos diferentes: plantas de tabaco *Wild Type* (Wt) y plantas de tabaco con tiorredoxina m sobreexpresada (TrxM), por lo tanto en M1 había dos factores. El segundo periodo, denominado momento 2 (M2), comenzó una vez que se observaron síntomas de que las plantas crecidas a [CO<sub>2</sub>] elevado podían estar sufriendo la aclimatación fotosintética. En él se mantuvieron los factores [CO<sub>2</sub>] y genotipo, pero además se añadió el factor de fertilización nitrogenada (2mM de KNO<sub>3</sub> vs. 1mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). El número total de tratamientos en M1 fueron 4 y en M2 8 (Figura 5.1):

<b>M1:</b>	
Plantas Wt	<ul style="list-style-type: none"> <li>- [CO<sub>2</sub>] ambiente</li> <li>- [CO<sub>2</sub>] elevado</li> </ul>
Plantas TrxM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- [CO<sub>2</sub>] ambiente</li> <li>- [CO<sub>2</sub>] elevado</li> </ul>
<b>M2:</b>	
Plantas Wt	<ul style="list-style-type: none"> <li>- [CO<sub>2</sub>] ambiente + KNO<sub>3</sub></li> <li>- [CO<sub>2</sub>] ambiente + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></li> <li>- [CO<sub>2</sub>] elevado + KNO<sub>3</sub></li> <li>- [CO<sub>2</sub>] elevado + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></li> </ul>
Plantas TrxM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- [CO<sub>2</sub>] ambiente + KNO<sub>3</sub></li> <li>- [CO<sub>2</sub>] ambiente + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></li> <li>- [CO<sub>2</sub>] elevado + KNO<sub>3</sub></li> <li>- [CO<sub>2</sub>] elevado + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></li> </ul>



**Figura 5.1:** Representación esquemática del diseño experimental.

## 2. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En este experimento se utilizaron dos genotipos diferentes de *Nicotiana tabacum* cv Petite Havana, el genotipo silvestres y un genotipo transplastómico que tiene la proteína TrxM sobreexpresada desde el genoma plastidial (Sanz-Barrio et al., 2013). Se partió de semillas germinadas *in vitro*. Para ello, en un primer momento, las semillas se esterilizaron con etanol y con lejía diluida en agua (1:4) con 0.1% Tween-20. Tras 20 minutos de fuerte agitación las semillas se lavaron con agua estéril 6 veces en la cabina de flujo laminar. Tras el último lavado, sin descartar el agua, las semillas no transformadas (Wt) se depositaron en medio P3, y en medio P3 con 500 mg/L espectinomicina las semillas con sobreexpresión de TrxM. Se cultivaron las semillas, en condiciones *in vitro*, dentro de una cámara de cultivo y posteriormente se individualizaron en tarros Magenta (Sigma-Aldrich, S Louis, MO). El medio P3 se compone de sales de Murashige & Skoog (Duchefa, Haarlem, Países Bajos), 3% sacarosa, 0,6% microagar (Duchefa) en un medio en el que el pH se ajustó a 5,8. A las tres o cuatro semanas las plantas cultivadas *in vitro* se aclimataron durante tres días, dejando la tapa del bote abierta, para que las plantas adquirieran la capacidad de ajustar la tasa transpiratoria a las condiciones de humedad atmosférica no saturante.

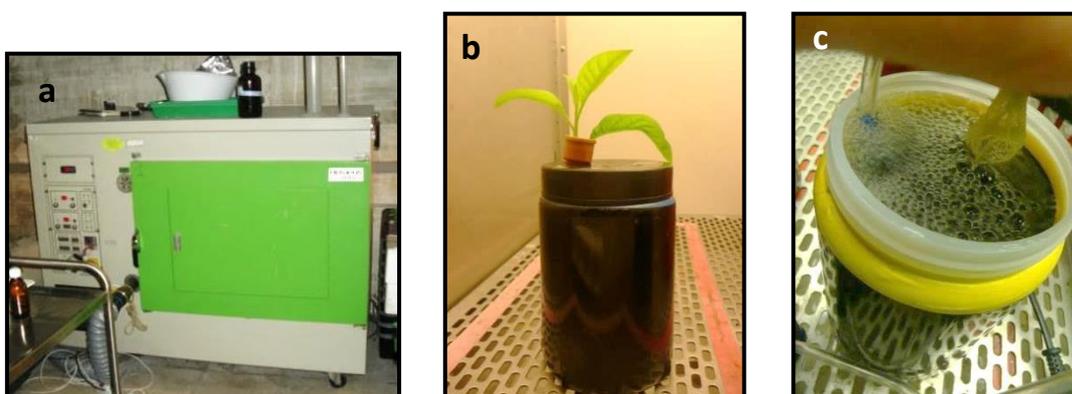
**Tabla 5.1: Macronutrientes que forman parte de la composición de solución nutritiva Rigaud y Puppo (1975)**

MACRONUTRIENTES	CONCENTRACIÓN (g/L)
$K_2HPO_4$	0.2
KCL	0.2
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.12
$Na_2FeEDTA$	0.025
$CaCO_3$	0.059
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.025

Pasado este periodo de tiempo se comenzó el cultivo de las plantas en cultivo hidropónico en las cámaras de crecimiento (Figura 5.2A; Heraeus- Votsch HPS-500, Norrköping, Suecia). Para ello, se dispusieron las plantas en recipientes de 1L de capacidad (Figura 5.2 b). La mitad de las plantas se colocaron en la cámara 1 (en la que crecieron en condiciones de  $[CO_2]$  ambiente, 400 ppm), y la otra mitad en la cámara 2 (en la que crecieron en condiciones de  $[CO_2]$  elevado, 800 ppm). Las plantas se crecieron en condiciones controladas de temperatura 18-22°C, de humedad relativa 80% y con un fotoperiodo de 16 h de luz a  $200 \mu Em^{-2}s^{-1}$ . Las plantas fueron cultivadas en las diferentes  $[CO_2]$  durante 40 días. La solución nutritiva llevaba una composición de macronutriente (Tabla 5.1) y micronutrientes (Tabla 5.2) descrita por Rigaud y Puppo (1975) y se ajustó su pH a 5,8-6 para evitar la precipitación de las sales. Se realizó el reemplazo de solución cada 3-4 días durante los 40 días que duró el experimento. La oxigenación de la solución nutritiva se llevó a cabo mediante bombas de aireación (Figura 5.2 c).

**Tabla 5.2:** Contenido en micronutrientes de la solución nutritiva con la concentración expresada en miligramos por litro de solución.

MICRONUTRIENTES	CONCENTRACIÓN (mg/L)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03
KI	0.01



**Figura 5.2:** A) Cámara de cultivo en la que se han crecido las plantas de tabaco. B) Disposición de las plantas en los botes de un litro de capacidad. C) Burbujeo producido por el sistema de aireación en la solución nutritiva.

### ***Tratamiento fertilización nitrogenada***

En una primera fase (que duró 25 días) la fuente nitrogenada aportada a las plantas fue de 2mM de  $\text{KNO}_3$ . En la segunda fase, de 15 días de duración, la mitad de las plantas se fertilizaron con 2mM de  $\text{KNO}_3$  y la otra mitad con 1mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Esta segunda fase dio inicio cuando las plantas crecidas en concentraciones de  $\text{CO}_2$  elevado mostraron síntomas de aclimatación fotosintética. Con el fin de poder identificar dicha aclimatación, a partir de los 15 días de inicio del experimento se llevaron a cabo los análisis de intercambio de gases descritos en el apartado 4.

### 3. MUESTREO Y ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO

A lo largo del experimento se llevaron a cabo dos muestreos. El primer muestreo (M1) corresponde al periodo de tiempo en el que las plantas alcanzaron la aclimatación. El segundo momento (M2) corresponde al periodo en el que se aplicaron los tratamientos de fertilización nitrogenada (nitrato vs nitrato amónico) y duró hasta que las plantas alcanzaron la madurez (justo antes de la emisión de la inflorescencia). Los muestreos se realizaron el último día de cada periodo. En M1 se muestreó la última hoja más extendida y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para almacenarla después a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En M2, además del muestreo de la última hoja totalmente extendida (almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), se muestreó la planta entera (resto de hojas, tallo y raíz). Las plantas se secaron en una estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 48h y se midió el peso seco de la parte aérea y de la raíz por separado.

### 4. DETERMINACIÓN DE INTERCAMBIO GASEOSO

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron con el equipo LI-COR 6400 XT (Figura 5.3; LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Los análisis se llevaron a cabo dos días antes del muestreo de M1 y M2. Se realizaron medidas de intercambio gaseoso de 4 réplicas por tratamiento. Las medidas se llevaron a cabo (en todas las plantas) a 400 y 800 ppm  $\text{CO}_2$ . Así la medida a 800 ppm de las plantas crecidas a 400 ppm será considerada como la capacidad potencial de las plantas crecidas a 800ppm. El valor del potencial nos sirvió para saber si las plantas estaban sufriendo aclimatación.



**Figura 5.3:** Aparato Li-COR 6400 con el que se midió el intercambio gaseoso.

### 5. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES Y ALMIDÓN

Se homogenizaron 0,08g de material congelado de hoja en 1ml de etanol al 80%. Se sonicaron los homogenizados a  $30^{\circ}\text{C}$  y se recogió el sobrenadante. Se evaporó el etanol del sobrenadante en el Turbovap (Zymark, Carmel, IN, USA). Una vez evaporado el etanol del sobrenadante se resuspendió la muestra en 800 $\mu\text{l}$  de agua miliQ en baño de ultrasonidos. El contenido en azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) se midió en esta fase por electroforesis capilar (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)

El pellet obtenido tras el sonicado, se secó a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas para medir el contenido en almidón. Para ello se resuspendió la muestra secada en la estufa en 750  $\mu\text{l}$  de agua miliQ en baño de ultrasonidos y a  $100^{\circ}\text{C}$ . Después se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de amiloglicosidasa, después de que se hubiera preparado la enzima (eliminación de glucosa) en una columna de acilamida.

Una vez añadida la enzima a la muestra, esta se incubó a 50°C durante toda la noche. Finalmente se recogió el sobrenadante y se midió el contenido de glucosa equivalente por electroforesis capilar (Beckman Instruments).

#### 6. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS TOTALES

La determinación de aminoácidos totales se llevó a cabo en la muestra obtenida en la extracción de azúcares solubles. Sobre una alícuota de esta muestra se añadió un buffer citrato 0,2M y ninhidrina 0,2M. Se sometieron las muestras a 100°C durante 15 minutos, periodo en el cual la ninhidrina reacciona con los residuos de los aminoácidos dando un viraje de color de amarillo a violeta. Se detuvo la reacción con etanol al 60% y finalmente se midió la absorbancia a 570nm. Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con una recta patrón de glicina para obtener la concentración de las muestras.

#### 7. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE TOTAL

Se realizó la extracción de proteína soluble total en ≈0.1g de material fresco congelado de hoja. Sobre la muestra homogenizada se añadió tampón fosfato 0.1M pH 7,4 en una proporción 1:2 (p/v). Se incubaron las muestras 10 minutos en hielo, periodo durante el cual se agitaron las muestras de vez en cuando. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas. Se realizó este paso dos veces. La cuantificación de proteínas de cada muestra se llevó a cabo por Bradford, en el que se realizó una recta patrón con seroalbumina bovina (BSA).

**Tabla 5.3:** Composición del buffer de extracción de proteínas.

Compuesto	Cantidad (g) para 500mL de agua miliQ
Tris	3,0275
EDTA	0,186
<b>Añadir en el día de extracción</b>	<b>Cantidad para 25ml de buffer</b>
Ditiotreitol (DTT)	0,0195g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0616g
Polivinilprrolidona (PVPP)	0,15g
Cisteina	0,0039g
2-mercaptoetanol	18µl
PMSF	2,5 µl

## 8. CONFIRMACIÓN DE SOBREENPRESIÓN DE TrxM

Para confirmar la sobreexpresión de TrxM en hojas de tabaco se llevó a cabo un análisis por Western Blot. Para extraer las proteínas se homogeneizaron  $\approx 0.1\text{g}$  de material congelado con nitrógeno líquido y se solubilizó la muestra en buffer de extracción de proteínas (Tabla 5.3) en una dilución 1:2 (peso/volumen). Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante un ensayo Bradford utilizando BSA como estándar.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Después se llevó a cabo un análisis Western Blot para analizar los niveles de TrxM utilizando un anticuerpo específico producido en conejo (Sanz-Barrio et al., 2011).

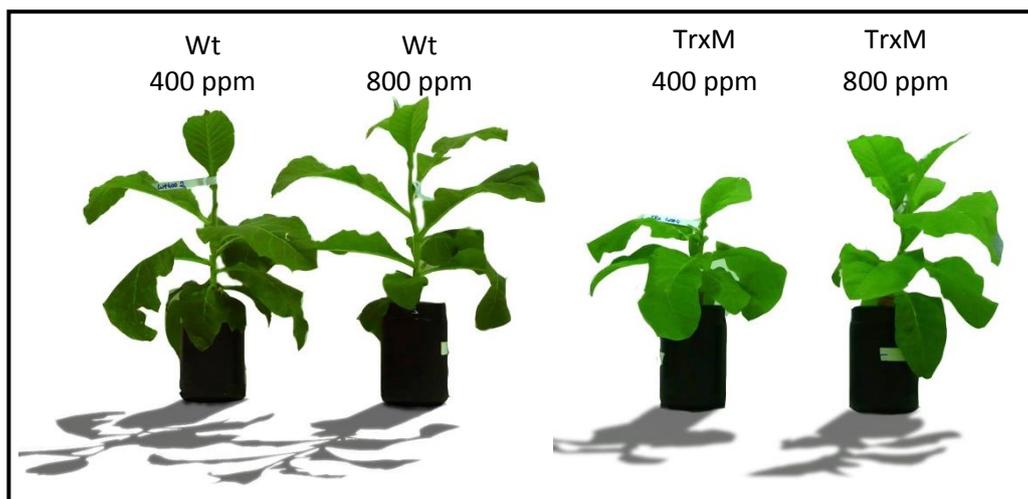
## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objetivo de establecer las diferencias entre los distintos tratamientos aplicados en el experimento se llevaron a cabo test estadísticos t de Student mediante el programa SPSS (v 15.0) con un nivel de significación del 95%. Por otra parte, también se realizaron análisis t de Student para una muestra con un nivel de significación del 95%, mediante el programa R (v 3.0.2) Los datos se graficaron mediante la herramienta informática SigmaPlot (v 10.0).

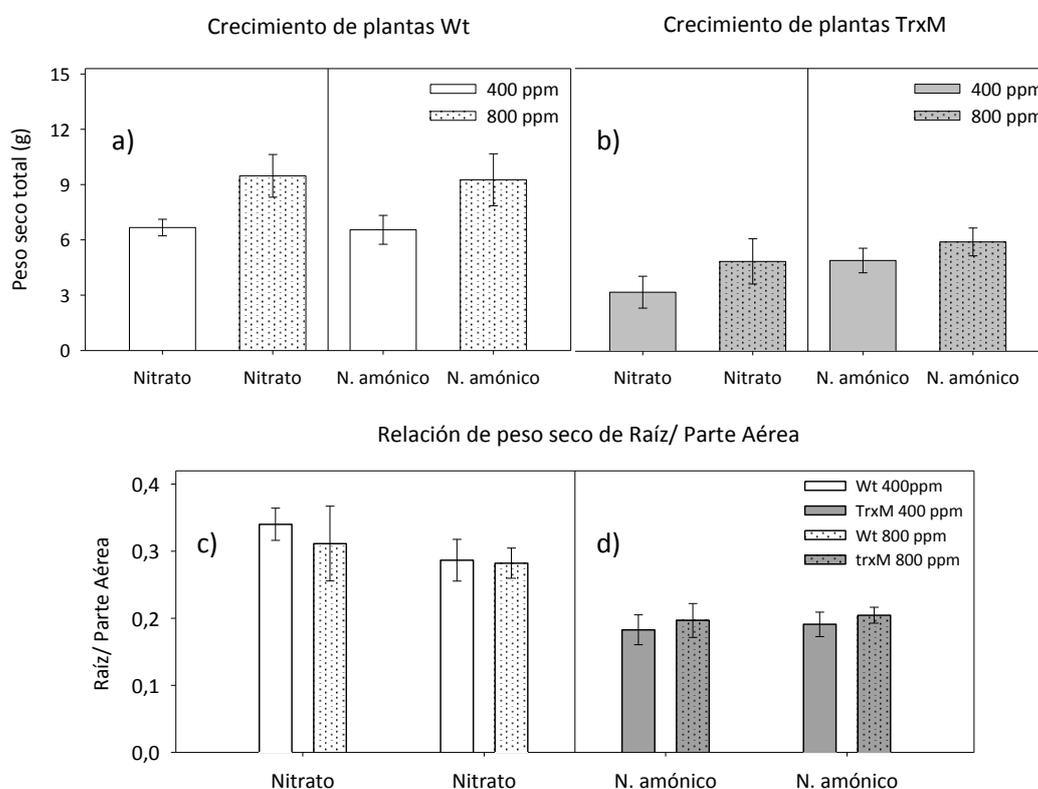
# 6. RESULTADOS

## 1. CRECIMIENTO

Tal y como se observa en la Figura 6.1, el incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> estimuló ligeramente el crecimiento de las plantas. La imagen también constata las diferencias en el crecimiento entre los dos genotipos, mostrando las plantas TrxM un crecimiento más reducido que las control sin transformar (Wt).



**Figura 6.1:** Aspecto de las plantas de tabaco al final del M1.



**Figura 6.2:** a,b) Peso seco total (g) y c,d) Relación entre el peso seco de la raíz/parte aérea de plantas *Wild type* y TrxM crecidas a 400ppm o crecidas a 800ppm. Se muestrearon 4 plantas de cada tratamiento.

En el momento 2, aunque no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, las plantas Wt sometidas a 800 ppm pesaron un 30% más que las plantas sometidas a 400 ppm, independientemente de la fuente nitrogenada (Figura 6.2 a). En el caso de las plantas mutantes de TrxM las plantas sometidas a 800 ppm y fertilizadas con nitrato pesaron 34% más, y las plantas fertilizadas con nitrato amónico y sometidas a 800 ppm crecieron 17% más (Figura 6.2 b). Por otra parte, las plantas del genotipo Wt al estar fertilizadas con nitrato tenían un porte mayor que las plantas TrxM (+52% en el caso de 400 ppm, y +49% en el caso de 800 ppm). Sin embargo, cuando las plantas se fertilizaron con nitrato amónico las diferencias entre ambos genotipos eran menores (del 25% y 36%, las plantas crecidas a 400 ppm y 800 ppm, respectivamente) indicando que la fertilización de las plantas TrxM con nitrato amónico mejoró el rendimiento de las plantas (datos no mostrados).

La relación de peso seco de raíz/parte aérea indica que el crecimiento de la planta se da al mismo nivel en las distintas partes de la planta, es decir, la raíz y la parte aérea crecieron al mismo nivel (Figura 6.2 c y 6.2 d). Igualmente, cabría destacar que la exposición al nitrato amónico redujo la relación raíz/parte aérea. Dicho descenso indica que el nitrato amónico favoreció el crecimiento de la parte aérea.

## 2. FOTOSÍNTESIS O INTERCAMBIO GASEOSO

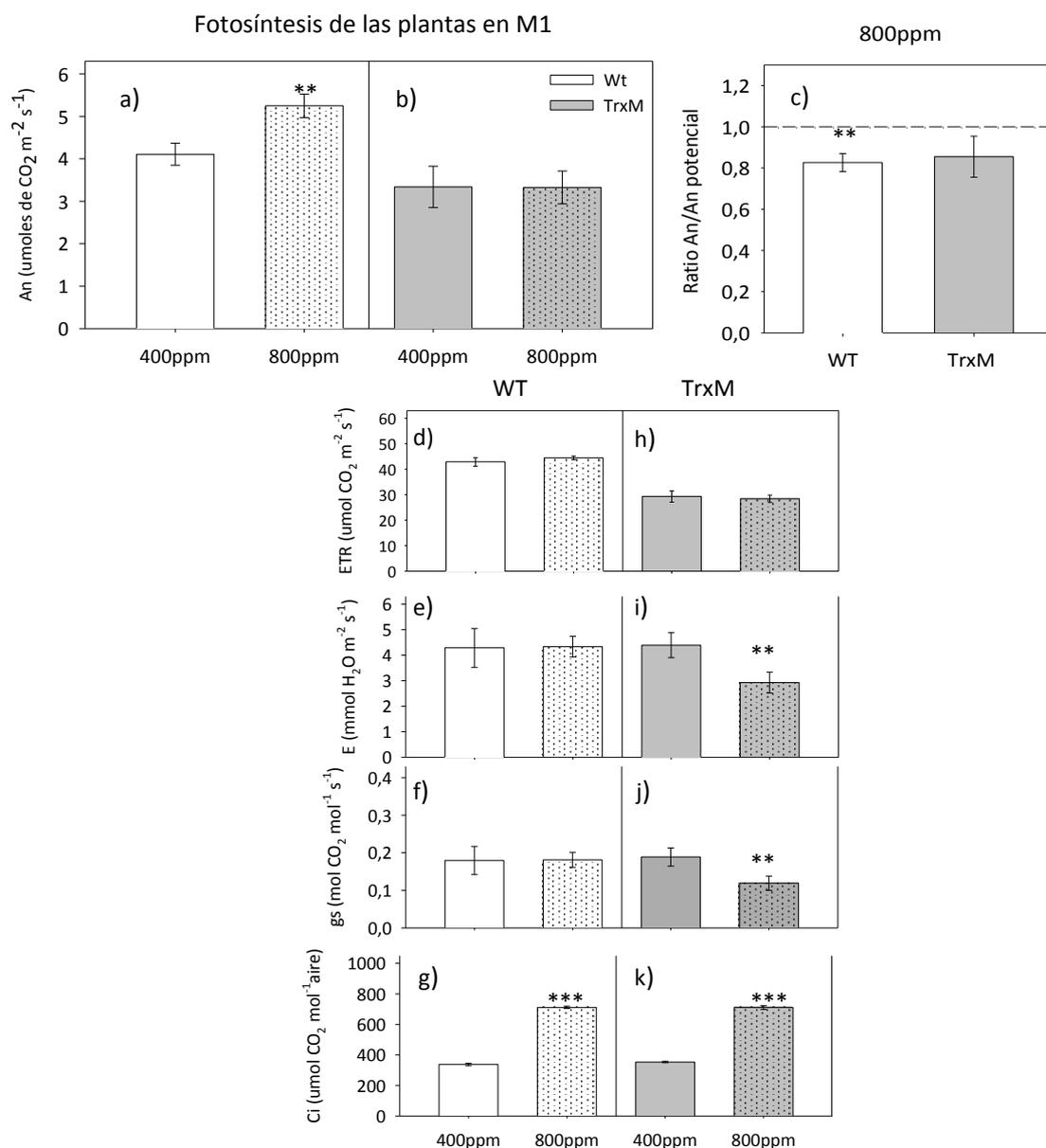
Se midió el intercambio gaseoso de las plantas en dos momentos diferente. El objetivo era que las plantas fertilizadas con nitrato y crecidas a 800 ppm de  $[CO_2]$  llegasen al estado de aclimatación fotosintética para poder analizar el efecto del nitrato amónico sobre la fotosíntesis. Por ello, se tras fertilizar las plantas durante 25 días con nitrato, se confirmó que el aparato fotosintético estaba aclimatado. Para ello, se analizó la actividad fotosintética de todas las plantas a 400 y 800 ppm. Con el objetivo de saber si las plantas se había aclimatado o no, se calculó el ratio  $An_{800}/An_{400}$  potencial para las plantas crecidas a 800ppm. El cálculo se realizó obteniendo la media de la tasa fotosintética potencial de las plantas crecidas a 800 ppm ( $An$  medida aplicando 800 ppm a plantas crecidas a 400 ppm) y dividiendo la tasa fotosintética de la plantas de 800 ppm por la media del  $An$  potencial. Basándose en el ratio se consideró que las plantas que tenían 1 o más de ratio tenían una tasa fotosintética superior a la potencial, y por consiguiente, no estaban aclimatadas, mientras que las plantas con un valor inferior a 1 fotosintetizaban a niveles menores a su capacidad potencial, y por lo tanto, estaban aclimatadas.

### **Fotosíntesis en M1:**

Las plantas Wt sometidas a 400 ppm mostraron menor  $An$  que las plantas sometidas a 800 ppm, mientras que en el caso de las plantas con sobreexpresión de TrxM no mostraron diferencias en la tasa fotosintética asociadas a la concentración de  $CO_2$  (Figura 5.3a y 5.3b).

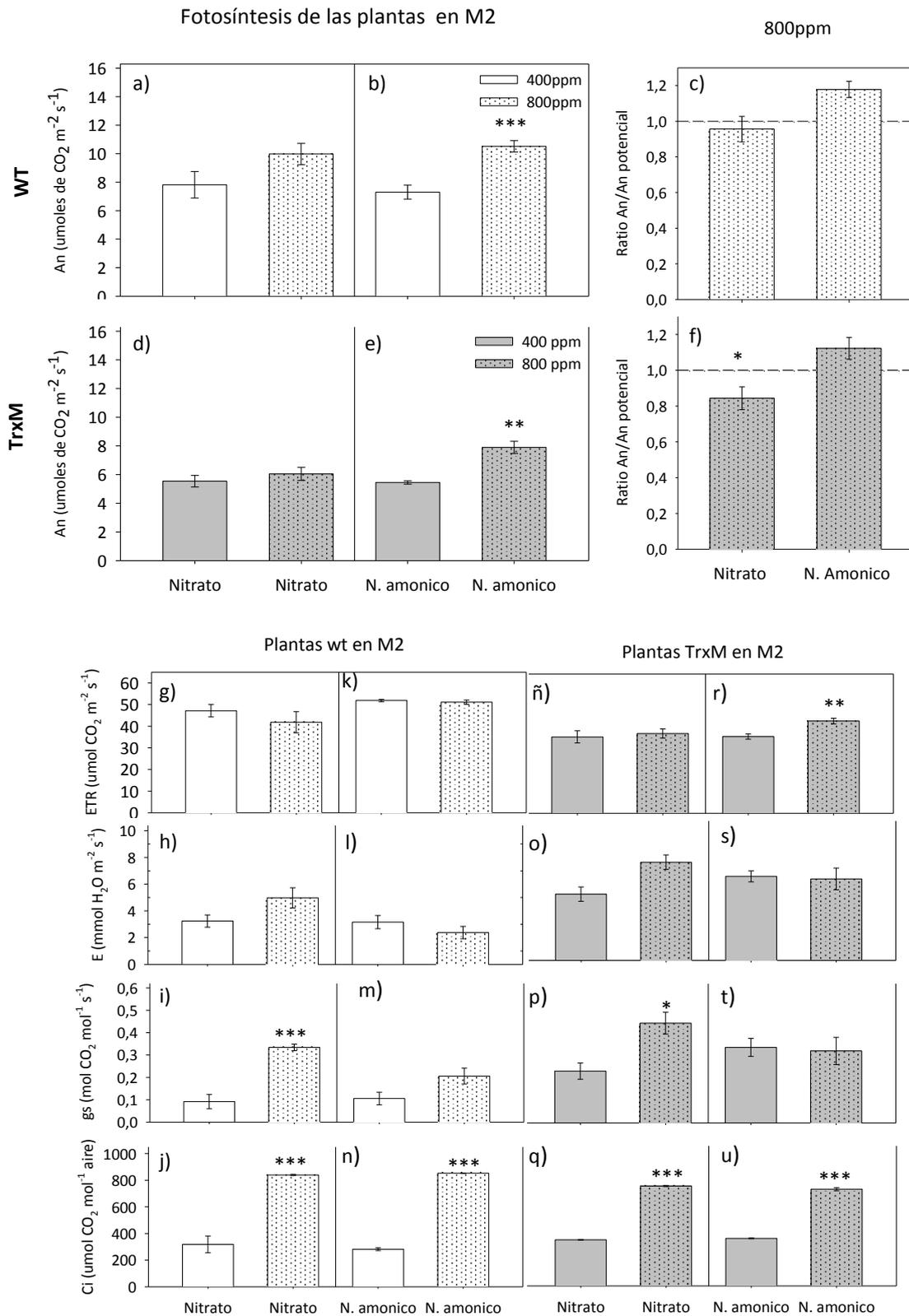
El análisis del ratio  $An_{800}/An_{400}$  potencial de las plantas sometidas a 800 ppm indica que las plantas Wt estaban aclimatadas (el ratio es significativamente menor a 1). Aunque no de manera estadísticamente significativa, los datos indican que las plantas Trx M mostraron síntomas de aclimatación fotosintética (Figura 6.3 c). La concentración interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) fue superior en las plantas cultivadas a 800 ppm (Figura 6.3 g y k). Además la tasa transpiratoria en

el caso de TrxM sometida a 800 ppm es menor que las plantas crecidas a  $[CO_2]$  ambiente (Figura 6.3 i). No obstante, el incremento en el  $C_i$ , descartó limitaciones en la disponibilidad de  $CO_2$  como los factores causantes de la aclimatación.



**Figura 6.3:** a, b) Tasa fotosintética de las plantas al final de M1 ( $An$ ). c) Ratio  $An_{800}/An_{400}$  potencial de plantas crecidas a 800 ppm en M1. d, h) Tasa de transporte de electrones (ETR), e, i) Tasa transpiratoria de la hoja ( $E$ ), f, j) Conductancia estomática ( $g_s$ ), g, k) Concentración interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) de ambos genotipos en M1. Las mediciones se realizaron en la hoja joven y más extendida de 4-5 plantas. Las diferencias significativas se detectaron por una prueba t y las diferencias con una p igual o menor a 0.05 se marcan con un asterisco, con una p igual o menor a 0.01 con dos asteriscos, y con una p igual o menor a 0.001 con tres asteriscos. En el caso del ratio  $An_{800}/An_{400}$  potencial (c) se llevó a cabo un test t de una muestra con una cola a la izquierda, comparando el ratio con el valor 1. Los valores p igual o menores a 0.05 se marcan con un asterisco, y los valores p igual o menores a 0.01 con dos asteriscos.

Por otra parte, las plantas del genotipo TrxM mostraron una tasa de transporte de electrones (ETR) menor que las plantas Wt (Figura 6.3 d y h), lo cual podría indicar algún problema en la



**Figura 6.4:** a, b, d, e) Tasa fotosintética neta de las plantas al final del M2 (An). c, f) Ratio  $An_{800}/An_{400}$  potencial de plantas crecidas a 800 ppm en M2. g, k, ñ, r) tasa de transporte de electrones (ETR), h, l, o, s) Tasa transpiratoria de la hoja (E), i, m, p, t) Conductancia estomática ( $g_s$ ), j, n, q, u) Concentración interna de  $CO_2$  (Ci) de ambos genotipos en M2. Todas las mediciones se realizaron en la hoja joven y más extendida de 3-4 plantas. Las diferencias significativas se detectaron por una prueba t y las diferencias con una p igual o menor a 0.05 se marcan con un asterisco, con una p igual o menor a 0.01 con dos asteriscos, y con una p igual o menor a 0.001 con tres asteriscos. En el caso del ratio  $An_{800}/An_{400}$  potencial (c, f) se llevó a cabo un test t de una muestra con una cola a la izquierda, comparando el ratio con el valor 1. Los valores p igual o menores a 0.05 se marcan con un asterisco.

actividad de los tilacoides, como ya se ha visto en trabajos anteriores (Rey et al., 2013; Wang et al., 2013).

### **Fotosíntesis en M2**

Tal y como se indicó anteriormente, a partir del M1, la mitad de las plantas se fertilizaron con nitrato amónico y el resto siguió fertilizándose con nitrato. Al final de M2 se tomaron las mismas medidas que al final de M1. Tal y como se observaba en M1 las plantas Wt sometidas a 800 ppm presentaban una mayor tasa fotosintética que las plantas sometidas a 400 ppm, aunque únicamente las plantas fertilizadas con nitrato amónico mostraban diferencias significativas (Figura 6.4 a y b). En el caso de las plantas fertilizadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y crecidas a 400 ppm la fotosíntesis era menor en un 30% con respecto a las plantas crecidas a una  $[\text{CO}_2]$  elevada, y en el caso de las plantas fertilizadas con  $\text{KNO}_3$  se observó una diferencia del 22%. Las plantas transplastómicas mostraron un comportamiento similar, ya que las plantas fertilizadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mostraban una diferencia del 30% y las plantas fertilizadas con  $\text{KNO}_3$  una diferencia mucho menor, del 8% (figuras 6.4 d y f). Esto demuestra que (respecto del nitrato) el nitrato amónico mejoró la actividad fotosintética de las plantas en condiciones de  $\text{CO}_2$  elevado.

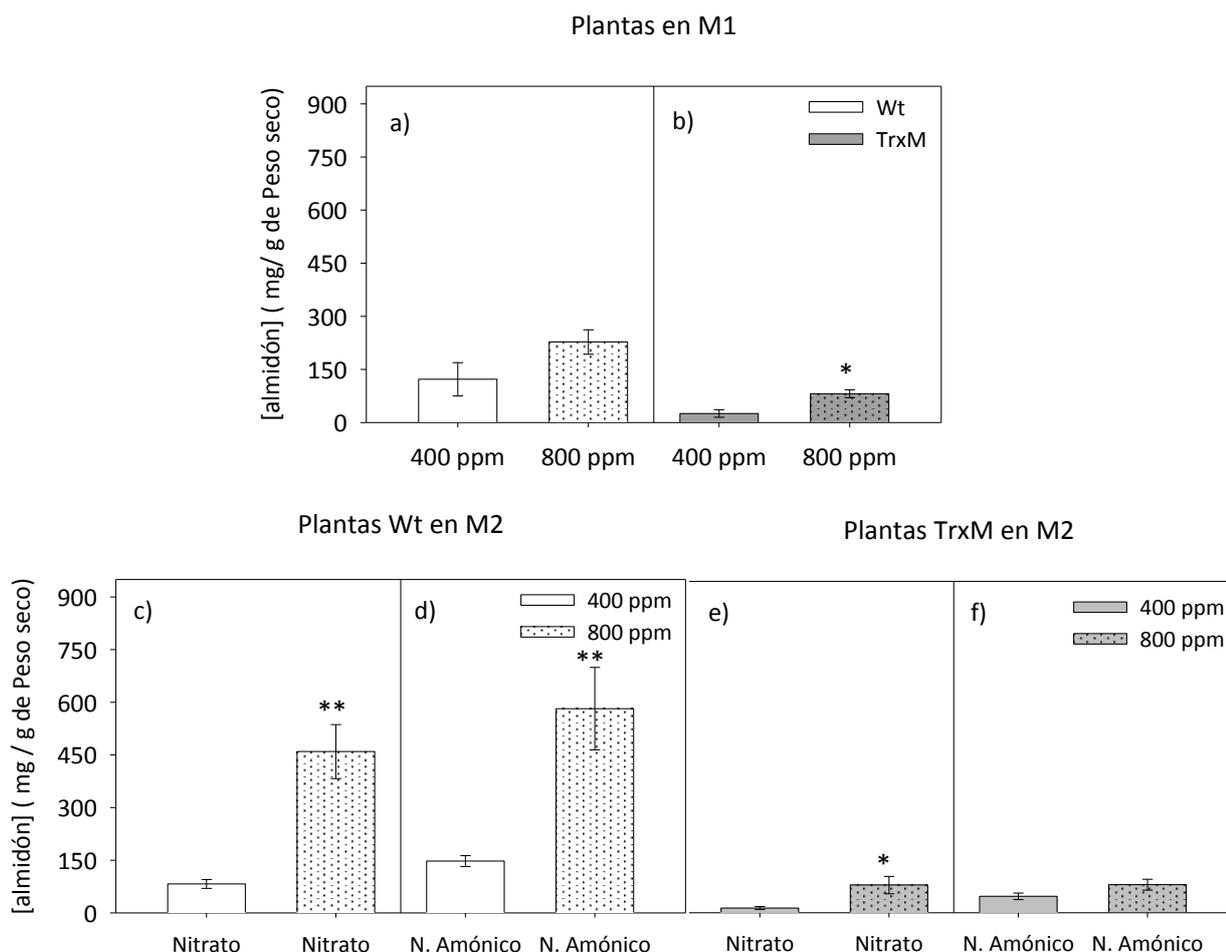
El ratio  $\text{An}_{800}/\text{An}_{400}$  potencial indica que las plantas de ambos genotipos fertilizados con nitrato amónico superaron la aclimatación, ya que su ratio superó al 1. Por otra parte, en el caso de las plantas regadas con nitrato, el valor medio del citado ratio no alcanzó el 1 indicando que estas plantas no superaron la aclimatación fotosintética (Figuras 6.4 c y f). Las plantas Wt fertilizadas con nitrato parecían mostrar un incremento en gs (Figura 6.4 i) lo cual explicaría la mejoría en la capacidad fotosintética. Sin embargo las plantas fertilizadas con nitrato amónico y sometidas a 800 ppm presentaron una gs similar a las plantas cultivadas en  $[\text{CO}_2]$  ambiente en el caso de ambos genotipos, por lo tanto su mejoría en An debería estar explicada por alguna otra razón. Por otra parte, se observó una mejoría en ETR de plantas TrxM cultivadas a 800 ppm y con nitrato amónico. ETR indica la tasa de transporte de electrones que se da en la maquinaria fotosintética de los tilacoides. El hecho de que ETR sea más alto demuestra una mayor disponibilidad energética, y por tanto la fertilización con nitrato amónico parece haber ayudado a superar problemas en la maquinaria fotosintética que se observaban en M1 (menor ETR).

### **3. ALMIDÓN**

Se llevaron a cabo medidas de la concentración de almidón en la hoja joven más expandida para comprobar el efecto de la aclimatación fotosintética al final de cada momento (M1, M2) sobre la acumulación del polisacárido. En general, un aumento en la  $[\text{CO}_2]$  llevó a un aumento en el contenido de almidón tanto en M1 como en M2 (Figura 6.5). Sin embargo, en M1, solo mostró diferencias significativas el genotipo TrxM (Figura 6.5 a y b). En M2 las plantas presentaron un comportamiento similar. Independientemente de la fertilización nitrogenada, ambos genotipos acumularon mayor cantidad de almidón cuando fueron cultivados a 800 ppm (Figura 6.5 c-f). De hecho, en la mayoría de las condiciones, las diferencias fueron más acusadas que en M1. Así, las plantas Wt fertilizadas con nitrato y sometidas a 800 ppm mostraron un 82% de aumento con respecto al tratamiento de 400 ppm, mientras que la planta Wt fertilizadas con nitrato amónico mostraron un incremento de 74% (Figura 6.5 c y d).

En el caso del genotipo TrxM, no se observaron diferencias significativas en los niveles de almidón entre plantas sometidas a diferentes [CO<sub>2</sub>] cuando fueron fertilizadas con nitrato amónico (Figura 6.5 f), lo cual indicaría que estas plantas pudieron desarrollar mayor capacidad sumidero y tuvieron que almacenar menor cantidad de carbohidratos en forma de almidón, lo cual le ayudaría superar la aclimatación.

Comparando ambos genotipos, independientemente de las condiciones de [CO<sub>2</sub>] y fertilización nitrogenada, el almidón acumulado en hoja fue significativamente menor en las plantas TrxM que en las Wt, como ya se había descrito con anterioridad (Sanz-Barrio et al, 2013).



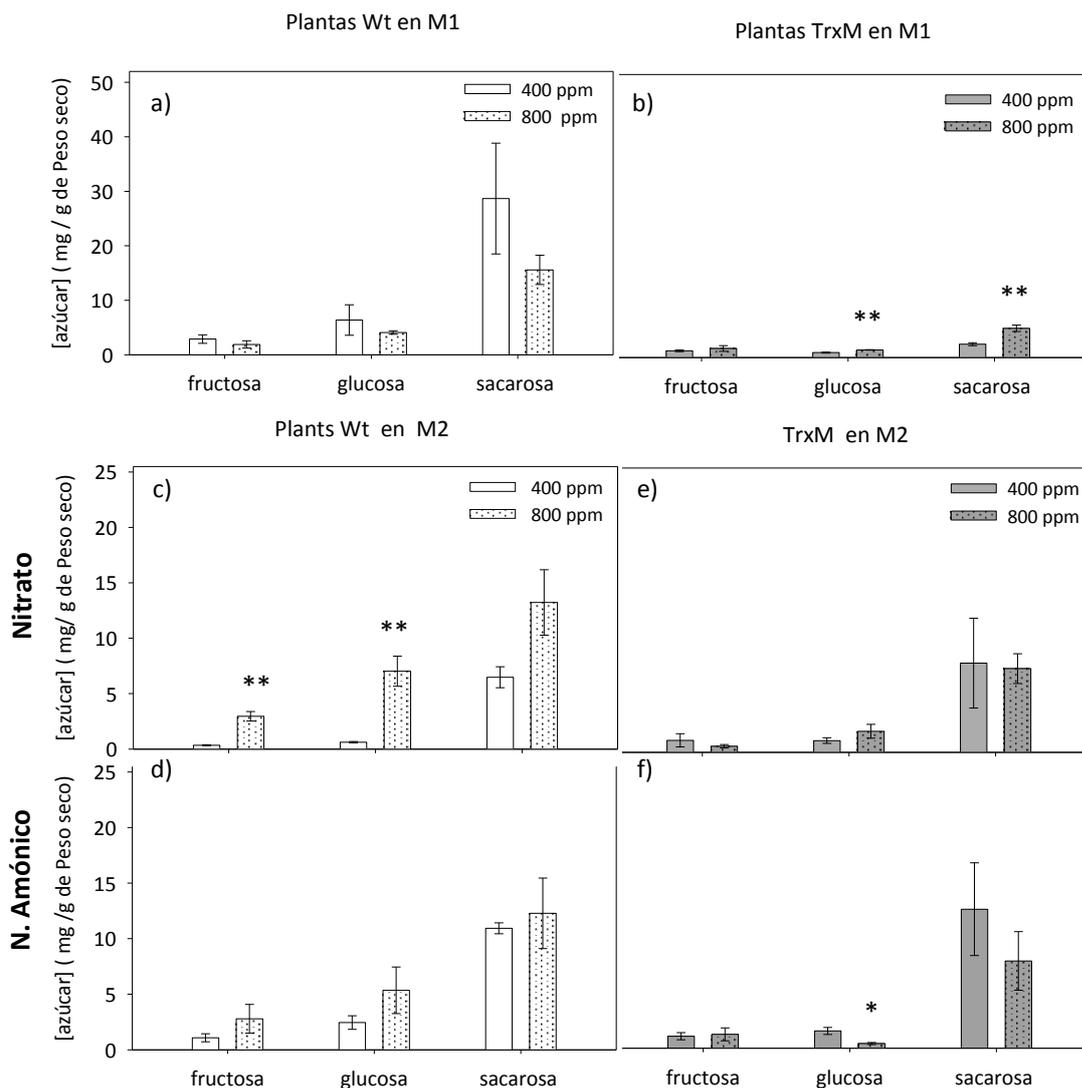
**Figura 6.5:** a, b) Concentración de almidón en las hojas al final de M1. c, d, e, f) Concentración de almidón en las hojas al final de M2. Las mediciones se realizaron en la hoja joven más extendida de 3-4 plantas. Las diferencias significativas se detectaron por una prueba t y las diferencias con una p igual o menor a 0.05 se marcan con un asterisco, con una p igual o menor a 0.01 con dos asteriscos, y con una p igual o menor a 0.001 con tres asteriscos.

#### 4. AZUCARES SOLUBLES

Al igual que el almidón, los azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) se midieron en la hoja joven más extendida (Figura 6.6). En M1 los niveles de azúcares de las plantas Wt no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos [CO<sub>2</sub>] (en parte debido a la variabilidad de los datos). Sin embargo, los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa fueron

ligeramente superiores en las plantas sometidas a 400 ppm (Figura 6.6 a), indicando que en las plantas crecidas a 800 ppm los azúcares se acumulan preferiblemente en forma de almidón. En el caso de las plantas TrxM ocurrió todo lo contrario, sobre todo en el caso de glucosa y sacarosa, donde hubo un aumento significativo de los niveles de azúcares en las plantas cultivadas a 800 ppm (+51% de glucosa y +66% de sacarosa) (Figura 6.5 b).

En M2 el comportamiento de las plantas Wt se invirtió, y es que las plantas sometidas a 400 ppm mostraron menor contenido en azúcares que las plantas crecidas a 800 ppm (Figura 6.6 c y d), aunque solo las plantas fertilizadas con nitrato lo hicieron de manera significativa (Figura 6.6 c).



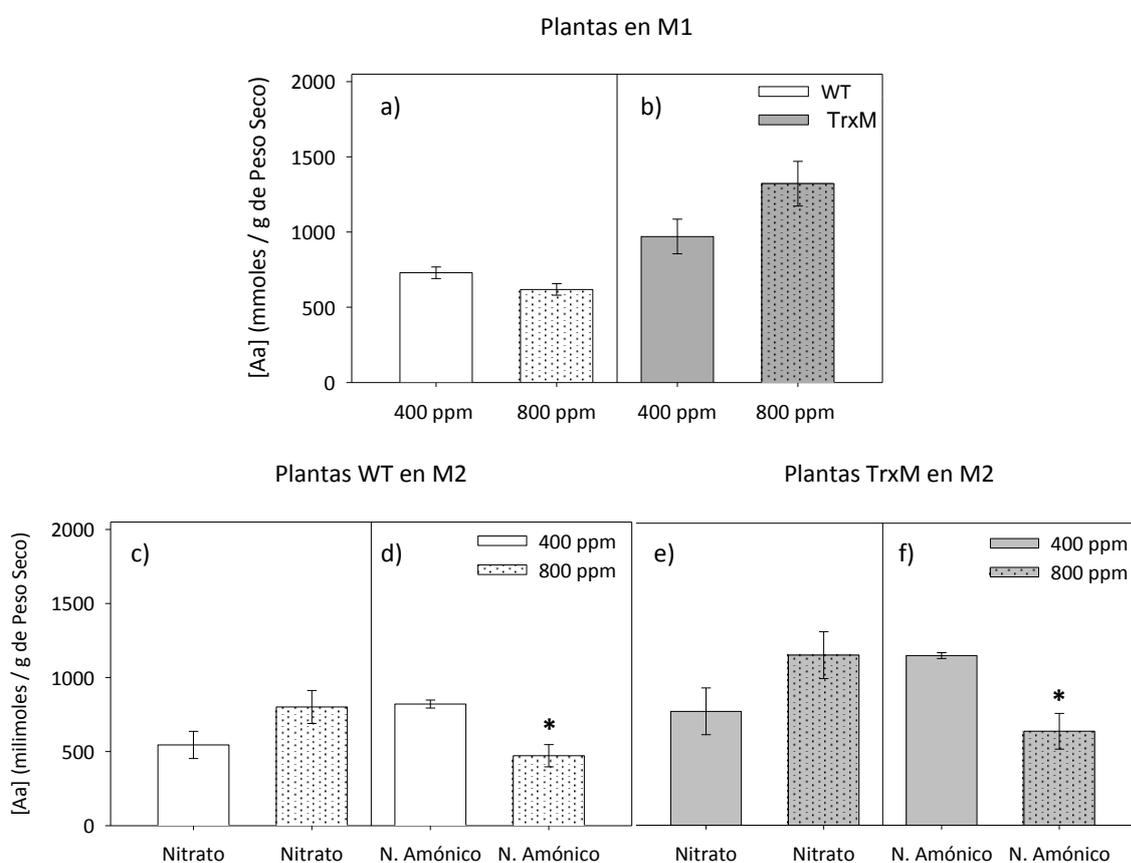
**Figura 6.6:** a, b) Concentración de azúcares de las plantas al final de M1. c,d,e,f) Concentración de azúcares en las plantas al final de M2. Las mediciones se realizaron en la hoja joven más extendida de 3-4 plantas. Las diferencias significativas se detectaron por una prueba t y las diferencias con una p igual o menor a 0.05 se marcan con un asterisco, con una p igual o menor a 0.01 con dos asteriscos, y con una p igual o menor a 0.001 con tres asteriscos.

En el caso de las plantas TrxM, y para cualquiera de los tratamientos de fertilización nitrogenada, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de los azúcares

(Figura 6.6 e y f). Todo indica que en M2 los niveles de azúcares de las plantas cultivadas a 800 ppm se estaban igualando a los niveles de azúcares de las plantas cultivadas a 400 ppm.

## 5. AMINOÁCIDOS TOTALES

La determinación de aminoácidos totales se realizó en la muestra obtenida por la extracción hidroalcohólica mediante el protocolo de extracción de azúcares solubles. En M1, tanto las plantas silvestres como las plantas transplastómicas no mostraron diferencias significativas al comparar los tratamientos de  $[CO_2]$ , aunque se observaron tendencias opuestas entre los dos genotipos. Mientras que las plantas del genotipo Wt crecidas a 400 ppm presentaban mayor cantidad de aminoácidos (15% más), las plantas TrxM crecidas a  $[CO_2]$  ambiente tenían menor cantidad de aminoácidos totales (27% menos) (Figuras 6.7 a y b). Por otra parte, indicar que las plantas TrxM mostraron mayor cantidad de aminoácidos que Wt en M1, siendo las diferencias significativas en el caso de las plantas sometidas a 800 ppm (datos no mostrados).



**Figura 6.7:** a, b) Concentración de aminoácidos (Aa) totales de plantas en M1. c, d, e, f) Concentración de Aa de las plantas en M2. Las mediciones se realizaron en la hoja joven más extendida de 3 plantas. Las diferencias significativas se detectaron por una prueba t y las diferencias con una p igual o menor a 0.05 se marcan con un asterisco, con una p igual o menor a 0.01 con dos asteriscos, y con una p igual o menor a 0.001 con tres asteriscos.

En lo que respecta a las medidas obtenidas en M2, podría decirse que ambos genotipos mostraron un comportamiento similar, observándose en las plantas fertilizadas con nitrato amónico y sometidas a una concentración de  $CO_2$  ambiental (400 ppm) unos niveles de aminoácidos totales significativamente superiores a los mostrados en plantas cultivadas a



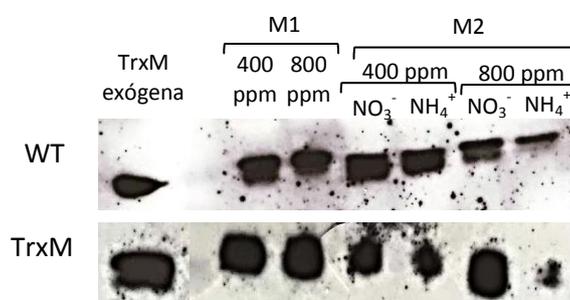
que en las Wt, siendo las diferencias significativas en el caso de plantas cultivadas a 400 ppm de CO<sub>2</sub> (datos no mostrado).

En M2 dicho comportamiento en ambos genotipos se mantuvo, es decir, las plantas cultivadas a 800 ppm mostraron menor cantidad de proteína soluble que las plantas sometidas a una concentración de CO<sub>2</sub> ambiental (Figura 6.8 c-f). Sin embargo, solo las plantas Wt fertilizadas con nitrato mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos de [CO<sub>2</sub>] (Figura 6.8 c).

En el otro genotipo (TrxM) se observó el mismo comportamiento al comprobar que las plantas con tratamiento 800 ppm+ KNO<sub>3</sub> sufrían un descenso del 16% al compararlas con las plantas de tratamiento 400 ppm + KNO<sub>3</sub> (Figura 6.8 e), y en cambio, las plantas fertilizadas con nitrato amónico sufrían un descenso del 31% al comparar los dos tratamientos de [CO<sub>2</sub>] (Figura 6.8 f).

## 7. SOBREEXPRESION DE TrxM

Mediante Western Blot se comprobó la sobreexpresión de TrxM en las plantas transplastómicas (Figura 6.9, panel inferior). La presencia de TrxM también se visualizó en las plantas Wt, si bien fue necesario cargar 8 veces más de proteína que en la transgénica (Figura 6.9, panel superior; 40µg vs. 5 µg). A pesar de que la cantidad de proteína total cargada en los geles SDS-PAGE en las plantas Wt fue mayor, las bandas observadas en el genotipo TrxM fueron incluso más gruesas e intensas que las del Wt, lo cual indica que la proteína TrxM estaba sobreexpresada en la línea transplastómica (Figura 6.9).



**Figura 6.9:** Análisis por Western blot de extractos de proteína de los 4 tratamientos aplicados en M1 y de los 8 tratamientos aplicados en M2. Se incluyó una TrxM exógena (10 µg) como control positivo. Se cargaron 20 µg de proteína de las muestras Wt y 5 µg de proteína de las muestras de TrxM.

## 7. DISCUSIÓN

---

En los últimos años numerosos trabajos (Geiger et al., 1999; Bloom et al., 2010; Aranjuelo et al., 2011) han analizado el efecto del incremento de CO<sub>2</sub> sobre la fisiología y el crecimiento de las plantas. Anteriormente se ha comentado que la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> va en aumento y es muy probable que las plantas sufran aclimatación fotosintética, lo cual les llevará a una situación de menor productividad y rendimiento de las plantas. Trabajos recientes (Bloom et al., 2010; 2014) se centran en el estudio del suministro de N de las plantas (Geiger et al., 1999; Matt et al., 2001), ya que se ha visto que el crecimiento y la fotosíntesis en condiciones de [CO<sub>2</sub>] elevado puede variar en función de la fuente de nitrógeno (Bloom et al., 2010). Dichos estudios sugieren que la asimilación de N y por lo tanto la capacidad de respuesta de las plantas a [CO<sub>2</sub>] elevado podría ser mayor cuando las plantas son fertilizadas con nitrato amónico que con nitrato (Geiger et al., 1999; Matt et al., 2001).

### *Fertilización con nitrato y respuesta fisiológica de las plantas al [CO<sub>2</sub>] elevado*

En este experimento se ha visto que el crecimiento y la fotosíntesis de plantas de tabaco aumentan en respuesta a una concentración elevada de CO<sub>2</sub>, sin embargo, tal y como demuestran trabajos anteriores (Geiger et al., 1999; Stitt & Krapp, 1999), las plantas sufrieron la aclimatación fotosintética al estar expuestas a [CO<sub>2</sub>] elevado. No solo en tabaco se ha visto este fenómeno, respuesta similares se han descrito en otros cultivos (Aranjuelo, 2011; Stitt & Krapp, 1999). La aclimatación fotosintética se pudo observar tanto en plantas de tabaco Wt como en plantas con sobreexpresión de TrxM. Además de eso, se pudo confirmar que el genotipo transplastómico mostraba un crecimiento y una fotosíntesis reducida en comparación con el genotipo Wt. De hecho, esto se puede corroborar al comprobar que la tasa de transporte de electrones de del genotipo TrxM era mucho menor que la del genotipo Wt. En trabajos anteriores ya se había visto que este genotipo transplastómico mostraba una menor actividad fotosintética (Rey et al., 2013) y un descenso del nivel de clorofilas (Rey et al., 2013; Sanz-Barrio et al., 2013). Teniendo en cuenta que las clorofilas son las encargadas de absorber la energía luminosa que se utiliza para realizar la fotosíntesis, un descenso de estos pigmentos puede suponer menor disponibilidad de energía que se traducirá en un descenso de la fotosíntesis. Por otra parte, ambos genotipos mostraron un Ci aumentado al ser sometidas a 800 ppm de [CO<sub>2</sub>], lo cual indica que la causa de la aclimatación no fue un problema de disponibilidad de Ci (Jifon & Wolfe, 2002). En lo que respecta a la capacidad de respuesta fotosintética al incremento de CO<sub>2</sub> de Wt y de TrxM, los datos obtenidos mostraron que estas plantas sufrieron la aclimatación fotosintética, probablemente debido a una disminución en la cantidad y actividad de Rubisco y otras proteínas del Ciclo de Calvin siendo el incremento en el contenido de almidón el factor desencadenante de dicha aclimatación (Aranjuelo et al., 2013). En el caso de ambos genotipos, se observó un aumento de almidón al estar crecidas a 800 ppm de CO<sub>2</sub>. Si bien no disponemos de información directa sobre la actividad enzimática de las proteínas del ciclo de Calvin, se podría intuir una disminución de la actividad Rubisco al comprobar la disminución en la cantidad de proteínas en las plantas sometidas a [CO<sub>2</sub>] elevado. Además de un descenso en el nivel de proteína soluble total también se observó una pequeña disminución (no significativa) en la cantidad de

aminoácidos totales en el genotipo Wt. Este mismo comportamiento ya se había observado en plantas de tabaco sometidas a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Matt et al., 2001). Como se ha comentado anteriormente las plantas expuestas a [CO<sub>2</sub>] elevado acumulan mucho almidón causando una disminución en la cantidad proteica (Krapp y Stitt, 1998; Moore et al., 1999). El genotipo TrxM, sin embargo, presentó niveles mayores de aminoácidos al estar sometido a 800 ppm. Los datos disponibles no permiten saber el porqué de esto.

#### *Fertilización con nitrato amónico y respuesta fisiológica de las plantas al [CO<sub>2</sub>] elevado*

Tras someter las plantas a dos tratamientos diferentes de fertilización (nitrato vs nitrato amónico) se vio que las plantas fertilizadas con nitrato amónico (a diferencia de las de nitrato) consiguieron superar la aclimatación. En los tratamiento de [CO<sub>2</sub>] elevado. Las plantas de ambos genotipos fertilizados con nitrato amónico mostraban un ratio An<sub>800</sub>/An<sub>400</sub> potencial mayor que las plantas fertilizadas con nitrato. Dicho incremento fue especialmente marcado en el caso de TrxM. Estos resultados apoyan los descubrimientos realizados por Bloom et al. (2010). Estos resultados sugieren que, en ambos genotipos, el hecho de crecer en un ambiente de [CO<sub>2</sub>] elevado hizo disminuir la fotorrespiración de las plantas que condicionó la disponibilidad energética e las plantas y la asimilación de nitrógeno. En consecuencia, las plantas fertilizadas con nitrato amónico tuvieron mayor disponibilidad de N, puesto que la asimilación de amonio no requiere de este poder reductor. Así la disponibilidad de más N pudo haber evitado la disminución de la actividad de Rubisco, y la planta pudo fotosintetizar más.

En los análisis del contenido de proteína soluble total, no parece haber una mejoría producida por el nitrato amónico en todos los casos. Ambos tratamientos de N mostraron el mismo patrón de niveles de proteínas en ambos genotipos. El hecho de fertilizar las plantas con nitrato amónico no hizo aumentar los niveles de proteína en [CO<sub>2</sub>] elevado. Sin embargo, hay veces que efecto del CO<sub>2</sub> elevado sobre Rubisco es diferente al efecto sobre la proteína soluble total. Por ello, sería interesante analizar el contenido y actividad de Rubisco. En el caso de los aminoácidos totales, los tratamientos de N mostraron distintos comportamientos en ambos genotipos: mientras que las plantas fertilizadas con nitrato mostraban un aumento en [Aa] (aunque no de manera significativa) al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub>, las plantas fertilizadas con nitrato amónico mostraron un descenso en sus niveles. Una explicación a esto podría ser que los aminoácidos se hubiesen incorporado a proteínas, sin embargo, no hubo mayor cantidad de proteínas en esas plantas. En otro estudio (Matt et al., 2001) con plantas de tabaco fertilizadas con nitrato se observó que se producía una disminución en la actividad de GS, sobre todo en [CO<sub>2</sub>] elevado. Cuando las plantas fueron fertilizadas con nitrato amónico, en cambio, la actividad de la enzima aumentó en [CO<sub>2</sub>] ambiente, pero disminuyó en [CO<sub>2</sub>] elevado (Matt et al., 2001). Esto podría explicar el descenso en la cantidad de aminoácidos en las plantas Wt fertilizadas con nitrato amónico, pero no así el caso de las plantas fertilizadas con nitrato. Para saber qué es lo que ocurrió sería interesante analizar los niveles de determinados aminoácidos, como por ejemplo, el glutamato, para observar la cantidad de amonio asimilado en la planta. El aumento del nivel de aminoácidos totales de las plantas fertilizadas con nitrato podría deberse a una degradación de las proteínas, de ahí la disminución del nivel de proteínas en estas plantas. El genotipo TrxM no pareció mostrar grandes diferencias en sus respuestas con respecto al genotipo silvestre. Es difícil deducir la implicación de esta enzima en los procesos metabólicos que ocurrieron en estas plantas. Por

ello, sería recomendable llevar a cabo análisis de actividades enzimáticas de enzimas como GS o GOGAT, ya que se conoce que están reguladas por TrxM.

En cuanto a la hipótesis que defiende la acumulación de carbohidratos en la parte aérea como la causante del descenso del nivel de N y proteínas en las hojas, no parece tener demasiado fundamento en la segunda parte de este experimento. Por un lado, el genotipo Wt mantuvo los niveles altos de almidón en las plantas crecidas a 800 ppm de [CO<sub>2</sub>] en ambos tratamientos de N. La fertilización con nitrato amónico no parece haber ayudado mucho a disminuir la acumulación de carbohidratos de esta planta. Sin embargo, el análisis del contenido de azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) mostró que su concentración disminuyó en el caso de las plantas fertilizadas con nitrato amónico, mientras que las plantas fertilizadas con nitrato mostraron niveles más altos de azúcares simples al estar sometidas a [CO<sub>2</sub>] elevado. Esto quiere decir que la fertilización con nitrato amónico permitió una mejora en el contenido de N y que la planta pudiera utilizar los carbohidratos producidos. Así, la utilización de los fotoasimilados produjo que pudiera aumentarse la tasa fotosintética. En el caso del genotipo TrxM el efecto de la fertilización con nitrato amónico sobre el almidón parece mostrar mejores resultados. En las plantas fertilizadas con nitrato amónico los niveles de almidón fueron similares en ambos tratamientos de [CO<sub>2</sub>], mientras que en el tratamiento de nitrato las plantas crecidas a 800 ppm presentaron mayor cantidad de almidón. En cuanto a los azúcares simples, ambos tratamientos de [CO<sub>2</sub>] mostraron niveles similares de azúcares tanto en nitrato, como en nitrato amónico.

Parece ser que en el caso del genotipo silvestre la fertilización con nitrato amónico permitió reducir la acumulación de azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) en [CO<sub>2</sub>] elevado, mientras que en el genotipo transplastómico permitió una disminución del contenido en almidón y de azúcares simples.

### ***Perspectivas futuras***

Este experimento (y otros estudios anteriores) confirma la importancia del estudio de la fertilización con N de las plantas crecidas en condiciones de [CO<sub>2</sub>] elevado. Los resultados indican que el uso del nitrato amónico como fertilizante podría suponer un mayor incremento en el crecimiento de las plantas. Los resultados obtenidos indican que de cara a poder delimitar los mecanismos que explicarían los cambios en la actividad fotosintética, habría que realizar ensayos de actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de N para poder estudiar el efecto de los dos tratamientos de N sobre las enzimas, e incluir análisis de Rubisco para confirmar el efecto de [CO<sub>2</sub>] elevado sobre su actividad. Incluir análisis de aminoácidos (individuales) e iones (nitrato, nitrito, amonio...) nos permitiría saber las rutas de síntesis de aminoácidos y rutas del metabolismo de N que se ven favorecidas al aplicar cada tratamiento de N. Todo ello podría ser de ayuda para explicar la mejora de la tasa fotosintética al aplicar nitrato amónico y la razón por la que se observan comportamientos diferentes en los niveles de aminoácidos entre los dos genotipos en M1.

## 8. CONCLUSIONES

---

1. Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petite Havana) exclusivamente fertilizadas con nitrato que son expuestas a una concentración elevada de CO<sub>2</sub> (800 ppm) sufren el proceso de la aclimatación fotosintética.
2. Las plantas del genotipo silvestre y transplastómico aclimatadas contienen una cantidad de carbohidratos (especialmente almidón) significativamente mayor que las plantas cultivadas a una concentración de CO<sub>2</sub> ambiental.
3. Las plantas aclimatadas sufren una limitación de nitrógeno, que se manifiesta por un descenso en la cantidad de proteína soluble total.
4. Las plantas de tabaco sometidas a [CO<sub>2</sub>] elevado y fertilizadas con nitrato amónico presentan mejores tasas fotosintéticas que las plantas fertilizadas con nitrato, especialmente las plantas de tabaco con sobreexpresión de TrxM.
5. El comportamiento presentado por el genotipo transplastómico no permite establecer relaciones directas de TrxM con el metabolismo del nitrógeno.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

- Anderson, L. E., Fadowole, D., Reyes, B. A., & Carol, A. A. (2008). Distribution of thioredoxins f and m with respect to seven light-activated enzymes and three redox-insensitive proteins in pea leaf chloroplasts. *Plant Science*, *174*(4), 432–445. doi:10.1016/j.plantsci.2008.01.001
- Aranjuelo, I. (2011). Does ear C sink strength contribute to overcoming photosynthetic acclimation of wheat plants exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, *62*(11), 3957–3969. doi:10.1093/jxb/err095
- Aranjuelo, I., Sanz-sáez, Á., Jáuregui, I., Irigoyen, J. J., Araus, J. L., & Sánchez-díaz, M. (2013). Harvest index, a parameter conditioning responsiveness of wheat plants to elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, *64*(7), 1879–1892. doi:10.1093/jxb/ert081
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., & Buchanan, B. B. (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 370–5. doi:10.1073/pnas.232703799
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P., Hurkman, W. J., & Buchanan, B. B. (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2988–93. doi:10.1073/pnas.0511040103
- Berndt, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1783*(4), 641–50. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.02.003
- Bloom, A. J., Burger, M., Kimball, B. A., & Pinter, P. J. (2014). Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO<sub>2</sub> in field-grown wheat. *Nature*, 6–9. doi:10.1038/NCLIMATE2183
- Bloom, A. J., Burger, M., Rubio Asensio, J. S., & Cousins, A. B. (2010). Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5980), 899–903. doi:10.1126/science.1186440
- Bloom, A. J., Smart, D. R., Nguyen, D. T., & Searles, P. S. (2002). Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(3), 1730–5. doi:10.1073/pnas.022627299
- Chi, Y. H., Moon, J. C., Park, J. H., Kim, H.-S., Zulfugarov, I. S., Fanata, W. I., Lee, S. Y. (2008). Abnormal chloroplast development and growth inhibition in rice thioredoxin m knock-down plants. *Plant Physiology*, *148*(2), 808–17. doi:10.1104/pp.108.123547
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., & Stitt, M. (1999). The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment*, *22*(10), 1177–1199. doi:10.1046/j.1365-3040.1999.00466.x

- Jifon, J. L., & Wolfe, D. W. (2002). Photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub> in *Phaseolus vulgaris* L. is altered by growth response to nitrogen supply. *Global Change Biology*, *8*(10), 1018–1027. doi:10.1046/j.1365-2486.2002.00531.x
- Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., ... Luo, M. (2012). Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHL1 subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants. *Plant Physiology*, *159*(1), 118–30. doi:10.1104/pp.112.195446
- Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, a., & Stitt, M. (2001). Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment*, *24*(11), 1119–1137. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00771.x
- McMichael A.J. (2013). Globalization, Climate Change, and Human Health. *The New England Journal of Medicine*, *368*(14), 1335-1343. doi:10.1056/NEJMra1109341
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual Review of Genetics*, *43*, 335–67. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134201
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. J., & Buchanan, B. B. (2009). Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of Proteomics*, *72*(3), 452–74. doi:10.1016/j.jprot.2008.12.002
- Motohashi, K., Kondoh, a, Stumpp, M. T., & Hisabori, T. (2001). Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20), 11224–9. doi:10.1073/pnas.191282098
- Rey, P., Sanz-Barrio, R., Innocenti, G., Ksas, B., Courteille, A., Rumeau, D., Farran, I. (2013). Overexpression of plastidial thioredoxins f and m differentially alters photosynthetic activity and response to oxidative stress in tobacco plants. *Frontiers in Plant Science*, *4*(October), 390. doi:10.3389/fpls.2013.00390
- Sanz-Barrio, R., Corral-Martinez, P., Ancin, M., Seguí-Simarro, J. M., & Farran, I. (2013). Overexpression of plastidial thioredoxin f leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(5), 618–27. doi:10.1111/pbi.12052
- Sanz-Barrio, R., Fernández-San Millán, A., Carballeda, J., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J. M., & Farran, I. (2012). Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *Journal of Experimental Botany*, *63*(1), 365–79. doi:10.1093/jxb/err282
- Sanz-Barrio, R., Millán, A. F.-S., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J. M., & Farran, I. (2011). Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal*, *9*(6), 639–50. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00608.x
- Schürmann, P., & Buchanan, B. B. (2008). The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(7), 1235–74. doi:10.1089/ars.2007.1931

- Stitt, M., & Krapp, A. (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition : the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*, 22, 583–621. doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x
- Wang, P., Liu, J., Liu, B., Feng, D., Da, Q., Shu, S., Wang, H.-B. (2013). Evidence for a role of chloroplastic m-type thioredoxins in the biogenesis of photosystem II in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163(4), 1710–28. doi:10.1104/pp.113.228353
- Wenderoth, I., Scheibe, R., & Schaewen, A. Von. (1997). ENZYMOLOGY : Identification of the Cysteine Residues Involved in Redox Modification of Plant Identification of the Cysteine Residues Involved in Redox Modification of Plant Plastidic Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 26985-26990. doi: 10.1074/jbc.272.43.26985