

## **Resumen.**

## **Abstract.**

### **1. Introducción.**

- 1.1. Biocombustibles y tabaco.
- 1.2. Tiorredoxinas.
- 1.3. Transformación plastidial.

### **2. Objetivos.**

### **3. Materiales y métodos.**

- 3.1. Material vegetal.
- 3.2. Caracterización molecular de las plantas transformadas.
  - 3.2.1. Homoplasma.
  - 3.2.2. Expresión de Tiorredoxina en hojas.
- 3.3. Determinación de almidón y azúcares solubles.
- 3.4. Parámetros fenológicos.
- 3.5. Análisis estadístico.

### **4. Resultados y discusión.**

- 4.1. Caracterización molecular de las plantas transformadas.
  - 4.1.1. Homoplasma.
  - 4.1.2. Expresión de Tiorredoxina en hojas.
- 4.2. Determinación de almidón y azúcares solubles.
- 4.3. Parámetros fenológicos.
- 4.4. Valoración de la variedad Havana 503B como cultivo energético.

### **5. Conclusiones.**

### **6. Bibliografía.**

## **Resumen.**

El actual aumento de la demanda de combustibles fósiles para múltiples usos hace necesaria la búsqueda de una alternativa renovable y sostenible para satisfacer la creciente demanda. En los últimos años se ha empezado a investigar acerca de nuevas fuentes de energía renovables para conseguir biocombustibles capaces de sustituir total o parcialmente a los actuales combustibles fósiles. El biocombustible más usado hoy en día es el bioetanol que proviene de azúcar o almidón de granos de cereales generalmente comestibles. El uso de cultivos comestibles supone un enfrentamiento entre los sectores energético y alimentario por lo que el reto actual consiste en buscar cultivos energéticos alternativos. Recientes estudios perfilan al tabaco como un posible sustituto de los cultivos alimenticios, al haber transformado plastidialmente una variedad de tabaco no comercial para que sobreexpresara el gen de la tiorredoxina f. Esta planta transformada fue capaz de acumular hasta 10 veces más almidón que la planta control y más del doble de sacarosa.

El principal objetivo de este trabajo es comprobar el efecto que provoca en la variedad comercial Havana 503B la transformación plastidial con tiorredoxina f y el corte de la inflorescencia en la planta, sobre los caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares de la planta. También es objeto de este trabajo valorar dicha variedad como materia prima para la producción de bioetanol a gran escala.

Tras la ejecución de este trabajo se comprobó que, tanto la sobreexpresión de tiorredoxina f, como el descabezado de la planta, tienen un efecto positivo que aumenta hasta dos veces la cantidad de almidón acumulado. No obstante, los azúcares solubles acumulados apenas se vieron aumentados ligeramente en las plantas transformadas. Por otro lado las características morfológicas tales como altura, número de hojas, peso específico de las hojas y contenido en agua de hojas, no se vieron afectados por ninguno de los dos factores. Finalmente, se estimó una producción de bioetanol de 500 L/ha en las plantas de tabaco transformadas frente a la producción de aproximadamente 370 L/ha en las plantas control.

Pese a mejorar los niveles de almidón y, levemente, los de azúcares solubles, además de aumentar la producción estimada de bioetanol, estos resultados quedan muy lejos de los obtenidos anteriormente en otras variedades no comerciales con producciones de bioetanol de aproximadamente 2000 L/ha; por todo ello, será necesario esperar a los estudios que se están realizando actualmente de esta variedad en condiciones de campo para poder concluir la validez de la variedad Havana 503B como materia prima en la producción de bioetanol.

## **Abstract.**

The current increase in demand for fossil fuels for many uses, require to search for renewable and sustainable alternative to satisfy the growing demand. In recent years it has begun to investigate new sources of renewable energy to make biofuels able to replace all or part of existing fossil fuels. The most widely used biofuel today is bioethanol which comes from sugar or starch from cereal grains usually edible. The use of food crops is a confrontation between energy and food sectors so the challenge now is to find alternative energy crops. Recent studies have outlined tobacco, modified by genetic engineering, as a possible replacement of food crops. The overexpression of the thioredoxin f in the plastid allowed the accumulation of up to 10 times more starch than the control plant and more than double sucrose.

The main aim of this study was to analyze the effect caused in the commercial variety Havana 503B by the plastidial transformation with thioredoxin f and by the cutting of the inflorescence in the plant, testing the plant morphological, biochemical and molecular characters. Another target of this work was to appreciate this variety as a feedstock for bioethanol production on a large scale.

Upon execution of this work, it was found that both overexpression of thioredoxin f and cutting the inflorescence in the plant, have a positive effect increasing twice the amount of accumulated starch in leaves. However, the soluble sugars were only slightly increased in the transformed plants. Furthermore, the morphological characteristics such as height, number of leaves, specific leaf weight and leaf water content were not affected by either of the two factors. Finally, the estimated production of bioethanol was 500 L/ha in the transformed tobacco plants compared to a production of approximately 370 L/ha in the control plants.

Despite improving levels of starch and, slightly, soluble sugar, while increasing the estimated production of bioethanol, these results are far from those obtained previously in other non-commercial varieties with bioethanol productions of approximately 2000 L/ha; therefore it will be necessary to wait for the studies currently being conducted of this variety under field conditions to conclude the validity of the Havana 503B variety as raw material for bioethanol production.

## 1. Introducción.

### 1.1. Biocombustibles y tabaco.

En la actualidad, ha aumentado la necesidad de combustibles para transporte, calefacción y procesos industriales; además, los combustibles fósiles que se usan hoy en día tienen efectos negativos como la emisión de gases perjudiciales que contribuyen al efecto invernadero y, al proceder de fuentes no renovables, su precio se encarece cada día más debido a que las reservas de petróleo están disminuyendo considerablemente. Por todo ello, se hace necesario buscar alternativas menos agresivas con el medio ambiente y que procedan de fuentes renovables.

Los biocombustibles son combustibles líquidos de origen biológico que resultan adecuados para sustituir a la gasolina y al gasóleo de manera total o parcial. Éstos pueden proceder de material vegetal sólido como leña, astillas, paja..., de material vegetal líquido como aceites, alcoholes..., o de gaseosos como los biogases. ). En el año 2020 la normativa de la UE obligará a que el 10% de los combustibles se obtengan de fuentes renovables.

Para que un biocombustible pueda ser una alternativa viable tiene que producir un balance de energía positivos, es decir, tiene que proporcionar más energía de la que se gasta en fabricarlo, también debe ser beneficioso con el medio ambiente, económicamente rentable y tiene que poder ser producido en grandes cantidades sin reducir el suministro alimenticio. Estudios anteriores demuestran que el bioetanol reduce un 12% las emisiones respecto a los combustibles fósiles y proporciona un 25% más de energía que la invertida en su producción (Hill *et al.*, 2006).

Los biocombustibles se dividen en dos tipos:

- **Bioaceites:** genéricamente llamados biodiesel, se obtienen por la reacción de aceites vegetales con un alcohol (transesterificación). Se emplean en motores de encendido por propulsión (diesel). Para su fabricación se usan principalmente aceites usados, soja, colza y girasol.
- **Bioalcoholes:** son derivados de productos vegetales con alto contenido en hidratos de carbono y sirven para motores de encendido provocado (Otto). Los más conocidos son el ETBE (Etil-ter-butil-éter) y el bioetanol. El bioetanol se produce a partir de la fermentación alcohólica de azúcares y el ETBE se obtiene mezclando etanol con isobutileno. Para la obtención del bioetanol se emplean principalmente cereales, remolacha y caña de azúcar.

El biocombustible más usado hoy en día es el bioetanol producido a partir de azúcar o de almidón de granos de cereal (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). No obstante, la producción de bioetanol a partir de granos de cereal no es una opción viable debido al choque con el mercado alimentario que supone. La competencia por el grano entre ambos sectores, supone un encarecimiento del grano como fuente de alimentación, es por ello que hay que buscar una fuente alternativa que no interfiera con la alimentación.

El bioetanol presenta muchas ventajas sobre los combustibles fósiles, tiene una baja toxicidad, es biodegradable y produce menos gases contaminantes. Por otro lado, la producción de cultivos para bioetanol reduce los niveles de gases de efecto invernadero porque emplean el dióxido de carbono del ambiente para la fotosíntesis. Además, aunque la conversión de biomasa a bioetanol y su posterior combustión producen gases, éstos son menores que los producidos por combustibles fósiles, en conclusión, el uso de bioetanol no contribuye al aumento del dióxido de carbono atmosférico (Sticklen, 2008).

Otra de las grandes ventajas de los biocombustibles es que pueden producirse en cualquier parte del mundo, pueden usarse especies autóctonas de los que ya se conocen sus técnicas y materiales de cultivo. Por ejemplo, en Brasil se produce bioetanol a partir de caña de azúcar; en Malasia a partir de aceite de palma; en Suiza, Reino Unido y Austria emplean madera; en Canadá usan trigo y maíz; y en los Estados Unidos maíz (Herrera, 2006).

En la Tabla 1 se pueden ver los diez productores principales de bioetanol del mundo, siendo Brasil el mayor productor a nivel mundial.

*Tabla 1 Los diez mayores productores de bioetanol a nivel mundial con su producción en millones de galones. Fuente: Renewable Fuels Association and Citigroup (2006).*

<b>País</b>	<b>Bioetanol (millones de galones)</b>
<b>Brasil</b>	3.989
<b>Estados Unidos</b>	3.535
<b>China</b>	964
<b>India</b>	562
<b>Francia</b>	219
<b>Rusia</b>	198
<b>Sudáfrica</b>	110
<b>Reino Unido</b>	108
<b>Arabia Saudí</b>	79

Por otro lado, las principales desventajas del bioetanol son el aumento del gasto en combustible ya que el bioetanol se consume entre un 25% y un 30% más rápido que la gasolina, aumento de gases nocivos en pasos previos a la elaboración del biocombustible como la quema de la caña de azúcar que podrían solucionarse mecanizando las prácticas de cultivo pero que originarían nuevos problemas de desempleo; estas desventajas hacen que, por el momento, la producción de bioetanol sólo sea rentable mediante subvenciones (IICA, 2007).

Otra gran desventaja es que las principales fuentes de biomasa empleada para su producción son cereales; esto, como hemos dicho antes, entra en conflicto con el sector alimentario y crea la necesidad de encontrar cultivos alternativos para su elaboración. Por ello se buscan cultivos energéticos que estén adaptadas a distintas zonas geográficas por lo que ya se conozcan sus técnicas de cultivo y manejo. Muchas especies cumplen estos requisitos pero hay que buscar las que produzcan un buen rendimiento entre el combustible consumido en su obtención y el generado al final. En la actualidad las materias primas que se emplean para la producción de etanol se basan en que tengan un alto contenido en sacarosa (caña de azúcar, remolacha), o un alto contenido en almidón (patata, maíz), o un alto contenido en celulosa (madera, residuos agrícolas).

Una posible especie alternativa es el tabaco, esta especie produce mucha biomasa (hasta 170 t/ha de tejido verde cuando se cultiva para biomasa (Vyacheslav *et al.*, 2009)) y la mayor parte es cosechable, además gracias a su capacidad de rebrote, pueden hacerse varios cortes a lo largo del ciclo de la planta. En España, la producción total se estima en unas 34.064 t repartidas entre varias Comunidades Autónomas entre las que destaca Extremadura con un 92,5% de la producción nacional, seguida de Andalucía con un 6% y de Castilla y León, Castilla La Mancha, Navarra y País Vasco que cultivan el resto (MAPA, 2007). La disminución de las ayudas europeas y los estrictos requisitos de calidad, han hecho que la producción de tabaco baje su rentabilidad y por tanto disminuya su cultivo en el territorio español; por ello es necesario una reactivación del sector que puede ser provocada por el valor añadido de la planta de tabaco como materia prima para la producción de bioetanol.

El tabaco como tal, no es una especie capaz de acumular mucho almidón en sus hojas; por ello se ha investigado la transformación genética de plantas de tabaco con el fin de aumentar sus niveles de acumulación de almidón. Estudios anteriores consiguieron una producción de hasta 10 veces superior que las plantas control, transformando plastidialmente una variedad no comercial para que sobreexpresase el gen de la tiorredoxina f (Mingo-Castel *et al.*, 2009). Esta variedad de tabaco podría ser una alternativa interesante para sustituir a los cereales como materia prima para la producción de bioetanol. Por ejemplo, en Extremadura ya se poseen las infraestructuras necesarias para el cultivo del tabaco, por lo que con este cultivo de valor añadido podría ser una opción muy rentable para la producción de bioetanol.

### 1.2. Tiorredoxinas.

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas (12 kDa) termoestables presentes en todos los organismos, su función es catalizar los intercambios tiol-disulfuro y regular el ambiente redox de la célula controlando numerosos procesos bioquímicos. En plantas el sistema tiorredoxina es muy complejo ya que existen numerosas isoformas y genes que codifican cada tipo de tiorredoxina, esto hace dudar de la función y especificidad de las mismas.

Las tiorredoxinas de los cloroplastos se activan con la luz y participan en el metabolismo fotosintético de los carbohidratos. Una de las tiorredoxinas de los cloroplastos es la tiorredoxina f (Trx f) que se denomina así porque es capaz de activar la enzima fructosa-1,6-bis-fosfatasa, está codificada nuclearmente y tiene origen eucariota. Regula la activación específica de muchos enzimas implicados en el ciclo de Calvin incrementando la biosíntesis en condiciones de luz. Está demostrado que la Trx f es capaz de activar numerosas enzimas del ciclo de Calvin como: fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), Rubisco activasa, fosforibuloquinasa (PRK), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa (SBPasa). También regula la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) involucrada en el catabolismo de azúcares, la NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH) importante en la asimilación de carbono en las plantas C4 y en la exportación de poder reductor en las plantas C3, y la ATP sintetasa. En el metabolismo del almidón, regula la ADP-glucosa-pirofosforilasa (AGPasa) que cataliza el primer paso de la biosíntesis del almidón y la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucano agua diquinasa (GWD) (Schurmann & Buchanan, 2008).

### 1.3. Transformación plastidial.

La transformación plastidial consiste en integrar un transgén en el genoma de los cloroplastos, obteniéndose así plantas transplastómicas. Presenta numerosas ventajas frente a la transformación nuclear como:

- *Niveles de expresión de la proteína recombinante muy superiores:* la transformación plastidial permite alcanzar el 70% de la proteína soluble total, mientras que la nuclear apenas llega al 1% (Oey *et al.*, 2009).
- *Evita la dispersión del transgén vía polinización:* debido a que los granos de polen de la mayoría de las plantas no llevan plastidios se impide así el flujo de genes de especies transformadas a otras especies similares o emparentadas no transformadas, evitando así un posible riesgo medioambiental (Daniell *et al.*, 1998).
- *Eliminación del "efecto de posición":* debido a que la transformación se hace por recombinación homóloga, el transgén se introduce empleando dos regiones flanqueantes del genoma plastidial por lo que se conoce su localización exacta

en el genoma plastidial y se ahorra el análisis de un gran número de plantas, ya que se evita la variabilidad que el "efecto de posición" provoca (Maliga, 2002).

- *Producción de proteínas de origen tanto procariota como eucariota:* el cloroplasto puede producir proteínas de ambos tipos sin necesidad de una adaptación previa de codones, además de su correcto plegamiento (Staub *et al.*, 2000).

- *El silenciamiento génico no tiene lugar:* no existen casos conocidos de silenciamiento génico en plantas transplastómicas (Daniell *et al.*, 2002).

## **2. Objetivos.**

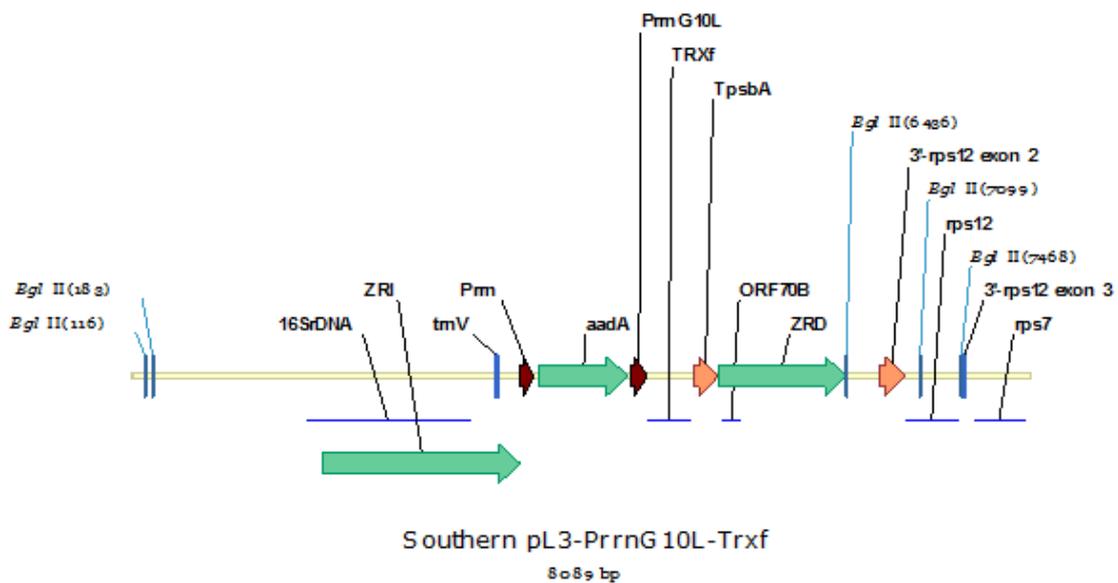
Los objetivos del presente trabajo son:

1. Caracterización molecular de plantas transplastómicas de tabaco de la variedad Havana 503B transformadas con el gen tiorredoxina f.
2. Comparar el efecto de la sobreexpresión de tiorredoxina f y el efecto del descabezado floral en la producción de carbohidratos en plantas transplastómicas y plantas control sin transformar.
3. Estudio de parámetros fenológicos de las plantas cultivadas en invernadero.
4. Valorar dicha variedad de tabaco transformada genéticamente como posible materia prima para la producción de bioetanol.

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Material vegetal.

La variedad de tabaco empleada es Havana 503B, la generación T<sub>0</sub> fue obtenida por transformación plastidial con el fin de que sobreexpresase el gen de la tiorredoxina f. En la Figura 1 se representa el esquema de la zona de inserción del vector pL3-PrrnG10L-Trxf de sobreexpresión de Trx f en plastidio y los sitios de restricción para la enzima BglII.



**Figura 1** Esquema de la zona de inserción del transgen pL3-PrrnG10L-Trxf en el genoma plastidial con los sitios de restricción BglII. ZRI y ZRD son las zonas de recombinación homóloga, trnV es el gen de ARN de transferencia de la valina, Prn es el promotor de la 16SrARN de tabaco, aadA es el gen de adenilil-transferasa para la inactivación de antibióticos, PrrnG10L es el promotor de la 16SrARN y región líder del gen 10 del bacteriófago T7, Trxf es el transgén de la tiorredoxina f de tabaco, TpsbA es el terminador del gen psbA de tabaco.

Las zonas ZRI y ZRD representan las zonas de recombinación homóloga, trnV es el gen de ARN de transferencia de la valina, Prn es el promotor de 16SrARN de tabaco, aadA es el gen de adenilil-transferasa para la inactivación de antibióticos, en este caso la espectinomomicina, PrrnG10L es el promotor de 16SrARN y región líder del gen 10 del bacteriófago T7, Trxf es el transgén de la tiorredoxina f de tabaco y TpsbA es el terminador del gen psbA de tabaco. Este vector fue elegido porque en trabajos anteriores con una variedad no comercial, dio resultados de hasta 10 veces más almidón acumulado en plantas con ese vector que en plantas sin transformar.

El presente trabajo comenzó el 21 de Septiembre de 2010 con la germinación de las semillas obtenidas de la regeneración de esas plantas; para ello primero se desinfectaron las semillas mediante el siguiente protocolo: previamente se preparó una solución desinfectante compuesta de ClONa al 1% de cloro activo y 0'01% de Tween20, la desinfección se llevo a cabo en dos pasos, primero se le añadió 1ml de etanol al 70%, se les dejó un minuto y después se retiró el etanol para mezclar las semillas con 1 ml de la solución desinfectante e incubarlas en agitación fuerte durante 20 minutos. A continuación, se lavaron las semillas con agua estéril 6 veces en cabina de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones. Tras el último lavado, no se descartó el agua y se cogió con una pipeta con la punta cortada 1 ml de agua con semillas para echarlas en una caja Magenta con medio de cultivo P3. Por último se sellaron las cajas magenta con cinta adhesiva porosa y se almacenaron en cámaras de cultivo a 27°C y fotoperiodo de 16 horas de luz.

El medio de cultivo P3 se preparó con sales minerales y vitaminas de Murashige & Skoog, 30 g/l de sacarosa, después se ajustó el pH a 5,7-5,8 con HCl o KOH, a continuación se añadieron 6 g/l de Microagar y se esterilizó 20 minutos a 121 °C. Una vez que la temperatura bajó a 60°C, se le añade 500 mg/l de espectinomicina y se agitó para finalmente dispensarlo en cajas magenta en condiciones estériles.

El día 5 de Octubre de 2010 se procedió a la individualización de las plantas germinadas; para ello, en cabina de flujo laminar, se cogieron cajas Magenta con medio de cultivo P3 nuevas y se traspasaron 3 plántulas por caja de las germinadas anteriormente. Éstas se dejaron de nuevo en las cámaras de cultivo para que enraizasen, en las mismas condiciones que cuando se pusieron a germinar.

El día 15 de Noviembre, esas plantas se trasplantaron a Jiffy en un mini invernadero con tapa de plástico transparente durante 1 semana, para mantener alta humedad relativa y favorecer la aclimatación, y se dejaron en fitotrón a 27°C y fotoperiodo de 16 horas de luz para que se aclimatasen y crecieran antes de pasarlas a invernadero.

El día 13 de Diciembre de 2010, las plantas se traspasaron a una maceta en invernadero y se les iluminó con focos (SON T-Agro 400, Philips) para mantener un fotoperiodo de 16 horas. Se sacaron a invernadero 10 plantas control y otras 10 transformadas, que se organizaron en dos filas, cada una con 5 plantas de cata lote.



**Figura 2** Evolución del proceso de obtención de las plantas de estudio. (A) Plantas de tabaco germinadas e individualizadas en cajas Magenta con medio P3 (con espectinomicina), (B) Plantas de tabaco individualizadas en Jiffy para aclimatarlas antes de pasarlas a invernadero, (C) Plantas de tabaco en invernadero iluminadas con focos para mantener el fotoperiodo.

La primera floración tuvo lugar el 24 de enero de 2011, a partir de entonces se empezó a controlar la fecha de floración de las 20 plantas hasta la última el día 2 de Febrero.

El día 3 de Febrero se procedió a cortar la inflorescencia, o descabezar la planta, a la mitad de las plantas de cada lote, obteniéndose así 4 lotes de estudio diferentes:

- Control sin transformar con inflorescencia
- Control sin transformar sin inflorescencia
- Transformada con inflorescencia
- Transformada sin inflorescencia

Por último, el mismo día, se les hizo un tratamiento con STOMP (1 litro al 1% con Pendimetalina 33%) pulverizándolo por el tallo de la planta para inhibir el rebrote lateral, evitando así patrones de ramificación no deseados de la planta y la acumulación de almidón en zonas no deseadas de la misma.

### 3.2. *Caracterización molecular de las plantas transformadas.*

#### 3.2.1. *Homoplasma.*

Al modificar el genoma del cloroplasto, puede que no todos los plastomas queden transformados teniendo así una situación de heteroplasma; el objetivo de la transformación plastidial es conseguir plantas que tengan todos los plastomas transformados, lo que se denomina homoplasma. La heteroplasma, en ausencia del agente de selección, resulta inestable y puede revertirse al genotipo silvestre. La homoplasma se consigue tras varias rondas de selección en las que se exponen las plántulas a un factor condicionante y se seleccionan las supervivientes. Para comprobar la homoplasma se llevó a cabo un Southern blot, esta técnica sirve para encontrar, gracias a una sonda, un fragmento específico de DNA dentro de una secuencia completa. Los pasos básicos que hay que seguir en esta técnica son:

1. *Extracción de DNA total:* las muestras que utilizamos provenían de plantas de tabaco transformado y sin transformar recién trasplantadas a cajas Magenta tras germinar, es decir, de las plantas individualizadas de tres en tres que estaban enraizando en cámara de cultivo; a estas muestras primero se les extrajo el DNA según el método que utiliza Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y se cuantificó (Murray & Thompson, 1980).

2. *Digestión del DNA:* Después de cuantificarlo, se puso en la digestión 20 µg con 3 µl de la enzima BglII que da un patrón distinto entre la planta transformada y la que está sin transformar. Se dejó digiriendo toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se separaron los fragmentos de distinto peso molecular de la digestión, en un gel de agarosa al 0,7% durante unas 4-5 horas y después se fotografió el gel con luz UV.

3. *Desnaturalización del DNA:* primero se hizo la depurinización para fragmentar el DNA y facilitar su transferencia a la membrana, para ello se sumergió el gel en una solución 0.2N HCl 10 minutos y después se lavó con agua. A continuación, se llevó a cabo la desnaturalización para pasar de doble cadena a simple y así permitir la unión de la sonda; se incubó el gel 45 minutos con una solución de desnaturalización compuesta de 1.5M NaCl y 0.5M NaOH. Por último, se hizo la neutralización sumergiendo el gel 30 minutos en la solución compuesta de 1M tris HCl con pH 7.4 y 1.5M NaCl.

4. *Transferencia:* este paso consiste en pasar el DNA del gel a una membrana de nylon; para ello se incubó el gel en una solución de transferencia compuesta de 20x SSC (175,3 g de NaCl y 88,2 g de Citric Acid Trisodium Dihydrate) durante 10 minutos. Después se hizo el montaje de la transferencia según el siguiente orden: papel Whattman de 15x25 cm, gel boca abajo, membrana de nylon, papel Whattman de 15x15 cm, una gran capa de servilletas de papel y algo de peso para facilitar la transferencia. El montaje se puso sobre una cubeta de geles rellena de solución de transferencia y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Tras la transferencia se le hizo un cross link a la membrana para fijarlo mediante UV.

5. *Hibridación de la membrana:* primero se pre-hibridó la membrana, para ello se precalentaron a 42°C 20 ml del buffer de pre-hibridación Dig EasyHyb (Dietzgen *et al.*, 1998), se añadieron a la membrana y se dejó pre-hibridando durante 4 horas en agitación suave en un horno de hibridación. Diez minutos antes de quitar el tampón de prehibridación, se precalentó a 68°C la solución que lleva 15 ml de Dig EasyHyb y la sonda SH desnaturalizada a 99°C. Se añadió el buffer con la sonda SH a la membrana y se dejó toda la noche girando en el horno de hibridación a 42°C.

6. *Lavado de la membrana:* se hicieron una serie de lavados a la membrana con distintas soluciones, primero dos lavados de 5 minutos con 250 ml de SSC 0.1% SDS (10% de 20X SSC, 2,5% de SDS 20%) en una cubeta a temperatura ambiente, después otros dos lavados de 15 minutos con 100 ml de 0.5X SSC 0.1% SDS (2,5% de 20X SSC, 0,5% de SDS 20%) girando en el horno de hibridación a 68°C, y finalmente en una cubeta en agitación con 100 ml de Washing buffer compuesto de ácido maleico y Tween 20 (0,3%). Después se bloqueó en una bandeja en agitación durante unos 45 minutos con 100 ml de Blocking solution hecha de ácido maleico (90%) y 10X Blocking solution (10%). A continuación, se incubó una hora con Antibody solution al 0,01% que contiene Anti-Digoxigenina-AP y Blocking solution. Por último, se hicieron dos lavados de 15 minutos con 50 ml de Washing buffer.

7. *Revelado:* para el revelado se llevó a cabo con el DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II de Roche. Primero se puso en contacto 5 minutos con Detection Buffer que contiene Tris 0,1M, NaCl 0,1M y agua MQ. Después se puso la membrana en un plástico con el DNA hacia arriba y se le añadió 1 ml de solución 5 (CSPD ready to use) para dejarlo a temperatura ambiente 5 minutos y a continuación incubarlo 10 minutos a 37°C. Por último, se expuso aproximadamente 20 minutos y se reveló en cámara oscura.

### 3.2.2. *Expresión de Tiorredoxina en hojas.*

Para comprobar si la tiorredoxina f se expresa en las plantas transformadas, se llevó a cabo un western blot; esta técnica consiste en la búsqueda de una proteína en concreto dentro de nuestra muestra problema. Antes de llevar a cabo el western blot, se prepararon las muestras procedentes de hoja vieja, madura y vieja de dos plantas distintas, una transformada y la otra no, tomadas en la segunda cosecha. Para ello se pesaron 150 gramos de muestra y se le añadió el doble de Laemmli buffer. La mezcla se puso a hervir 5 minutos a 99°C en termomixer para desnaturalizar las proteínas e inmediatamente después se sacaron a hielo para que no se renaturalizasen. Por último, se centrifugaron dos minutos y se usó el sobrenadante para cargarlo en el gel de proteínas.

Una vez preparadas las muestras, el western blot consiste en tres fases distintas:

1. *Electroforesis:* la electroforesis consiste en separar las proteínas según su tamaño en un gel vertical de poliacrilamida. Para ello se prepararon dos geles: el de separación que es el encargado de separar las proteínas por tamaños y tiene un 18% de poliacrilamida, y el de concentración al 5% que sirve para que todas las muestras comiencen a correr al mismo tiempo ya que cuando llegan al final de éste, se aumenta el voltaje para que corran por el gel de separación.

2. *Transferencia:* después de correr el gel, se transfirieron las distintas proteínas a una membrana de nitrocelulosa para que se pudiese unir el anticuerpo a la proteína de interés. Para la transferencia se montó un "sándwich" empezando por una esponja empapada de solución de transferencia (100 ml EB 10X, 200 ml Metanol, 500 µl SDS 20% y 700 ml Agua MQ), seguido de un papel Whattman que hacía de filtro, el gel, la membrana, otro papel Whattman y otra esponja. La transferencia se llevó a cabo en una cubeta con hielo y en agitación durante una hora. A continuación, se bloquearon las proteínas en la membrana sumergiéndola con solución de bloqueo (5% de leche en polvo y 95% de PBS-Tween) durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se lavó la membrana con PBS-Tween (100 ml PBS 10X, 1ml 0,1% Tween 20, agua MQ hasta 1 L) 5 minutos en agitación y se procedió a la hibridación con el anticuerpo primario, en este caso un anti-tiorredoxina F obtenido en conejo, diluido en Blocking Buffer (concentración 1/7.500), éste se le añadió a la membrana y se dejó incubando en agitación suave durante una hora. A continuación, se llevaron a cabo tres lavados de 5, 10 y 5 minutos con PBS-Tween y posteriormente se le añadió el anticuerpo secundario, en este caso un anti-fracción constante de anticuerpos de conejo, diluido también en Blocking buffer (concentración 1/20.000) y se le dejó otra hora en agitación suave. Finalmente, se hicieron cuatro lavados con PBS-Tween de 5, 10, 5 y 5 minutos.

3. *Revelado*: para este revelado se usó el kit ECL Plus Western Blotting Detection System de GE Healthcare. Primero se depositó la solución de revelado del kit sobre la membrana y se dejó actuar durante cinco minutos sin dejar que se secase la membrana. Después se escurrió la membrana y se dejó sobre la funda de plástico con la cara de transferencia hacia arriba y se introdujo en el cassette de revelado. Por último, se colocó encima la película y se expuso durante un minuto aproximadamente, para después revelarlo en cámara oscura.

### 3.3. *Determinación de almidón y azúcares solubles.*

Quince días después del descabezado se llevó a cabo la primera cosecha, seguida de otras tres, espaciadas quince días en el tiempo. En cada cosecha se tomaron cuatro discos por hoja, en hojas alternas de cada planta y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En la segunda cosecha, se cosecharon además tres discos de los diferentes tipos de hoja (joven, madura y vieja) y un disco apical de cada hoja.

- *Almidón*

Para las muestras de cada cosecha se siguió el mismo procedimiento para extracción y cuantificación de almidón. Cada muestra fue pulverizada con un homogeneizador y después se recogió una alícuota de unos 200 mg que se guardaría a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación. El proceso cuenta con tres fases principales:

1. *Homogeneización*: tras pesar la muestra y anotar su peso fresco, la muestra se mezcló con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 100% y se homogeneizó con ultraturrax. Después se le añadieron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 80% y se extrajeron los azúcares solubles a  $70^{\circ}$  en agitación durante una hora y media en termomixer a 1100 rpm. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó la muestra 10 minutos a 14000 rpm para recoger el sobrenadante y guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de azúcares solubles. Por último se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 80% y se dejó secar 20 minutos a  $45^{\circ}\text{C}$  en el termomixer para guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  también.

2. *Solubilización* del almidón: se resuspendió el precipitado en 400  $\mu\text{l}$  de KOH 0,2N hasta obtenerse una solución viscosa de color claro. A continuación, se incubaron las muestras a  $95^{\circ}\text{C}$  en agitación (termomixer a 1100 rpm) durante una hora para disolver las muestras. Una vez disueltas, se les ajustó el pH a 4,6-4,8 con aproximadamente 70  $\mu\text{l}$  de ácido acético 1N para que la enzima que interviene en el proceso de la cuantificación pudiese actuar. Por último, se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm y se recogió el sobrenadante para guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3. *Cuantificación del almidón:* este paso se llevó a cabo con el kit Starch de Boehringer Mannheim de extracción de almidón. Primero se descongelaron las muestras y se precalentaron a 45°C, después se le añadió a cada muestra 25 µl del buffer 1 que contiene amiloglucosidasa para romper los oligosacáridos en D-glucosa. Además se prepararon dos blancos sin buffer 1 que nos sirvieron para restar posibles glucosas que no perteneciesen al almidón. La mezcla se dejó incubar a 56°C durante 45 minutos y después se diluyó en proporción 1:5 con 200 µl de agua. A continuación, se preparó una placa microtiter en la que se introdujeron las digestiones y los blancos, a cada pocillo se le añadió un mix formado por 127,5µl del buffer 2, que contiene NADP y ATP, y 2,5µl del buffer 3 que contiene hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Este mix se encargó de llevar a cabo la reacción que nos permitió leer con el espectrofotómetro la cantidad de almidón en cada muestra; la reacción es muy rápida por lo que nada más añadir el mix hay que leer las placas, se midió la absorbancia a 340nm cada cierto tiempo hasta que se llegó a la saturación.

- *Azúcares solubles*

La cuantificación de azúcares solubles se llevó a cabo a partir de los sobrenadantes recogidos de la primera fase (homogeneización) de la cuantificación del almidón. Se recogieron los datos sobre cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa.

La concentración de azúcares solubles se determinó mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC) con detección amperométrica, en un sistema DX-500 Dionex ajustado a una columna Carbo-Pac PA1 (Rolletschek *et al.*, 2002).

### 3.4. *Parámetros fenológicos.*

Los caracteres fenológicos que se midieron fueron la altura total de la planta, número de hojas, contenido en clorofila, peso fresco y peso seco.

La altura de las plantas se midió en dos ocasiones, la primera fue el día del descabezado de las plantas y la segunda en la primera cosecha, quince días después, para observar posibles cambios en altura debidos al descabezado.

El número de hojas se contó el día del descabezado para establecer las diferencias entre los distintos lotes de plantas.

El contenido en clorofila en las hojas se determinó con un medidor de clorofila SPAD 502 y sirve para estimar ciertos parámetros como la entrada en senescencia de la planta. En las dos primeras cosechas, se midió el contenido en clorofila en hojas alternas

de la planta y se hizo la media de los datos para cada planta. En la última cosecha se midió la cantidad de clorofila en las cinco hojas más viejas para evaluar la fecha de senescencia de la planta. Todos los datos fueron tomados hacia las diez de la mañana para intentar que, al comparar los datos, el resultado fuese lo más fiable posible.

El peso fresco y el peso seco fueron medidos en muestras recogidas en la segunda cosecha; para ello se recogió un disco apical de cada hoja de la planta con un sacabocados de diámetro conocido. Una vez recogidos todos, se pesaron y se anotó su peso fresco, después se pusieron a secar cinco días en una estufa a 70°C para obtener su peso seco. Con los resultados de dichos pesos, se calculó el SLW (Specific Leaf Weight) que mide los miligramos de peso por centímetro cuadrado de hoja, y el LWC (Leaf Water Content) que mide el porcentaje de agua contenido en hoja.

### *3.5. Análisis estadístico.*

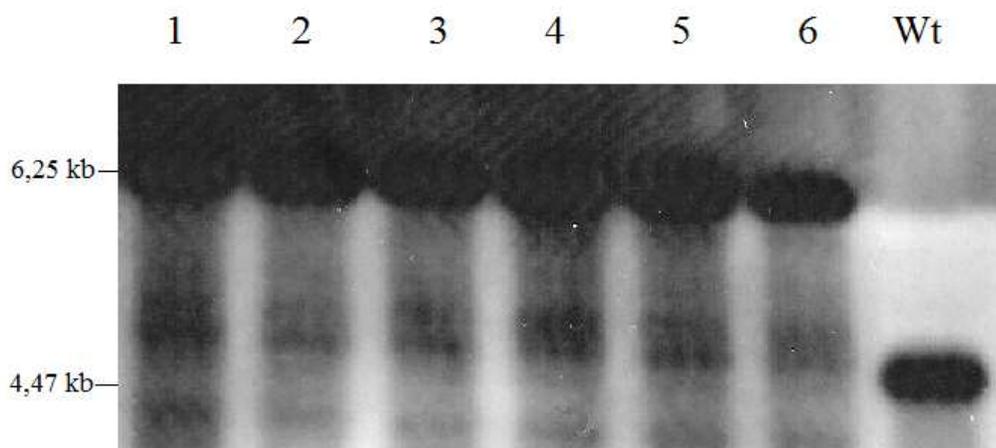
El análisis estadístico se llevó a cabo para determinar si la división en lotes de las plantas (según si estaban descabezadas o no y según si estaban transformadas o no) estaba justificada. Para ello se utilizó el programa estadístico R (Rick Becker, John Chambers y Allan Wilks; en AT&T Bell Laboratories) y se siguió un diseño factorial del experimento ya que éste permite el estudio con dos factores tratamiento (en este caso transformación y descabezado de la planta).

## 4. Resultados y discusión.

### 4.1. Caracterización molecular de las plantas transformadas.

#### 4.1.1. Homoplasma.

El Southern blot se llevó a cabo para comprobar la homoplasma en las plantas transformadas. El DNA total de la planta fue digerido con BglII, dando un fragmento de 4,47 kb en la planta control y otro de 6,25 kb en las plantas transformadas (Figura 3). La ausencia del fragmento de 4,47 kb en las plantas transformadas confirma la homoplasma de éstas.



**Figura 3** Southern blot de seis muestras de plantas transformadas que sobreexpresan tiorredoxina F; WT, planta control.

#### 4.1.2. Expresión de Tiorredoxina en hojas.

En el western blot se detectó una banda de 12 kDa perteneciente a la proteína de interés (tiorredoxina f de tabaco); las muestras empleadas en el ensayo procedían de los tres tipos de hoja (joven, madura y vieja) de plantas transformadas y sin transformar. La banda de 12 kDa se muestra en los tres tipos de hoja de las plantas transformadas (Figura 4), la ausencia de banda indica que, pese a que la proteína existe en la planta por ser de tabaco, el nivel de ésta es muy bajo e indetectable con la técnica western blot.

Además, la banda de 12 kDa es más débil en la línea de hoja vieja, lo que nos indica que, previsiblemente, las hojas viejas son las que menos expresan la proteína.

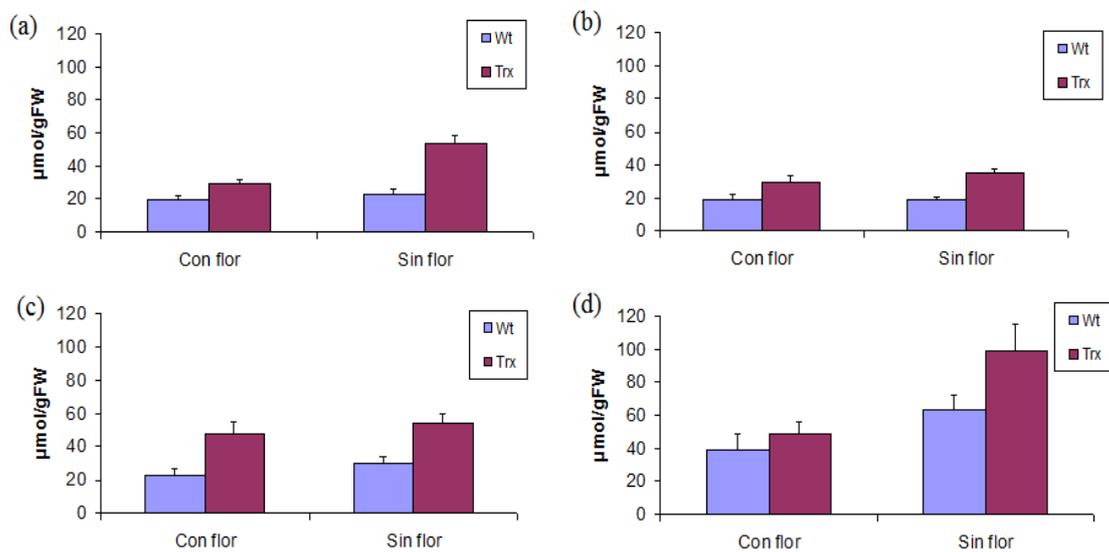


**Figura 4.** Western blot de los distintos tipos de hoja de planta transformada y planta control, HJ hoja joven, HM hoja madura, HV hoja vieja. La banda corresponde a la proteína tiorredoxina f de 12 kDa.

#### 4.2. Determinación de almidón y azúcares solubles.

##### ➤ Almidón

La cantidad de almidón acumulada se midió en cuatro cosechas distintas espaciadas quince días para conocer la evolución en el tiempo del almidón acumulado y establecer las diferencias entre planta control sin transformar y planta transformada. Los datos obtenidos de la cuantificación de almidón de los distintos lotes se representaron en la Figura 5.



**Figura 5** Cantidad acumulada de almidón en hojas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor, en las cuatro cosechas efectuadas. (a) Primera cosecha el 17 de Febrero de 2011, (b) Segunda cosecha el 3 de Marzo de 2011, (c) Tercera cosecha el 17 de Marzo de 2011, (d) Cuarta cosecha el 31 de Marzo de 2011. Los datos representan la media de cinco plantas en cada lote y sus desviaciones típicas correspondientes.

Como resultado general, el nivel de acumulación de almidón es superior en las plantas transformadas que en las plantas control sin transformar. Tras realizar el análisis de la varianza se observó que estas diferencias eran significativas (95%).

Además, los lotes de plantas descabezadas acumulan más almidón que los lotes de plantas que mantienen su inflorescencia. Estas diferencias también fueron significativas (95%).

Fijándonos en la evolución de todas las cosechas, se aprecia la tendencia ascendente de la cantidad de almidón acumulado a lo largo del tiempo; aunque los niveles de almidón en la segunda cosecha son muy parecidos, e incluso inferiores, a los de la primera, se debe a que el tratamiento con STOMP que sirve para inhibir el rebrote lateral fue insuficiente, por lo que la planta desarrolló un patrón de ramificación que hizo que el material cosechable de nuestro interés no creciera tanto y por lo tanto acumulase un nivel de almidón menor al esperado; estos rebrotes alcanzaron el metro de longitud en las plantas con la inflorescencia cortada y fueron menores y más escasos en las plantas en las que se mantuvo la inflorescencia. En la tercera cosecha también hubo rebrotes pero éstos fueron menores y no afectaron tanto a los resultados, se observa que los niveles de almidón han empezado a crecer aunque a un nivel más bajo de lo esperado. En la cuarta cosecha los niveles de almidón en los lotes de plantas descabezadas se disparan mientras que en los lotes con la inflorescencia intacta se mantienen parecidos a los de la cosecha anterior.

En la primera cosecha (Figura 5 a) destaca la acumulación superior de almidón en plantas transformadas respecto a plantas control, y en plantas descabezadas respecto a plantas con inflorescencia. También se observa que en las plantas control apenas hay diferencia entre descabezadas y no descabezadas, siendo las primeras las que acumulan 1,21 veces más. La diferencia entre plantas con inflorescencia y sin ella, es mucho más notable en plantas transformadas con 1,86 veces más de almidón acumulado en plantas descabezadas. Por último, la diferencia entre planta control y planta transformada es mayor en los lotes con la inflorescencia cortada (2,35 veces más en transformadas) que en lotes con la inflorescencia intacta ( 1,53 veces más en transformada).

En la segunda cosecha (Figura 5 b) se observan cuatro lotes de acumulación similar, aunque sigue siendo mayor el cúmulo de almidón en plantas transformadas que en plantas control sin transformar. Aunque la diferencia no es muy notable, también se acumula un poco más en plantas descabezadas que en plantas con inflorescencia. Las plantas control acumulan 1,05 veces más en los lotes de plantas descabezadas frente a los lotes de plantas con inflorescencia. Por otro lado, en las plantas transformadas, los lotes de plantas sin inflorescencia acumulan 1,21 veces más que los lotes de plantas sin

descabezar. En los lotes de plantas descabezadas, la diferencia entre plantas control y transformadas es mayor (1,84 veces más en plantas transformadas) que en los lotes de plantas con la inflorescencia intacta (1,61 veces más en transformadas).

En la tercera cosecha (Figura 5 c) los niveles de almidón son parecidos entre lotes pero superiores en plantas transformadas y en plantas descabezadas. Hay una diferencia mayor entre plantas control descabezada y plantas control intactas, acumulando 1,30 veces más las descabezadas. En plantas transformadas la diferencia es algo menor y las plantas sin inflorescencia acumulan 1,15 veces más almidón que las plantas con inflorescencia. Además hay una diferencia mayor entre transformadas y no transformadas en los lotes de plantas con inflorescencia intacta (2,09 veces más en transformadas) respecto a los lotes con plantas descabezadas (1,81 veces más en transformadas).

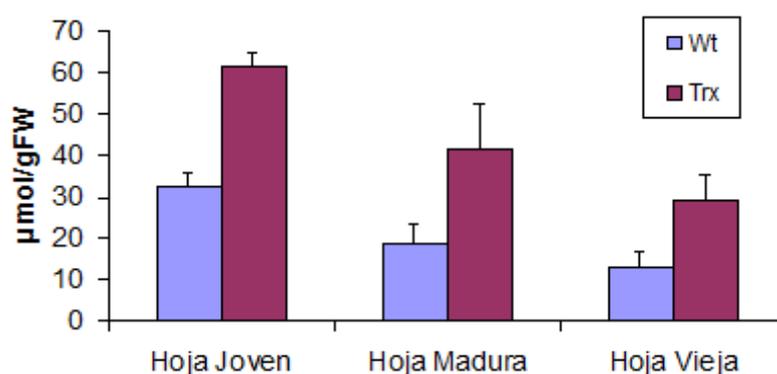
En la cuarta y última cosecha (Figura 5 d), el nivel de acumulación de almidón es superior en plantas transformadas y en descabezadas. Destaca sobre todo el nivel de acumulación de almidón en las plantas transformadas descabezadas. También es importante que las plantas control sin transformar y descabezadas acumulan más almidón que las plantas transformadas con inflorescencia (1,33 veces más). Hay una gran diferencia entre plantas transformadas y plantas control en los lotes descabezados con 1,55 veces más en plantas transformadas. En plantas con la inflorescencia intacta, la diferencia es menor con 1,23 veces más en plantas transformadas. También hay una gran diferencia entre la acumulación de almidón en plantas transformadas descabezadas y plantas transformadas con inflorescencia, acumulando 2,04 veces más almidón las plantas transformadas sin inflorescencia. En plantas control, esta diferencia es menor con 1,63 veces más en lotes descabezados que en lotes con inflorescencia.

La acumulación de almidón en hojas aumenta con la sobreexpresión de tiorredoxina F, se han alcanzado unos máximos de 2,35 veces más en transformadas, que fueron detectados en la primera cosecha. En el resto de cosechas, la diferencia era menor pero siempre entre 1,2 y 2,23 veces superior; comparándolo con los datos de estudios anteriores en los que se obtuvieron cantidades de almidón hasta 10 veces superiores en las plantas transformadas (Mingo-Castel et al., 2009), el rendimiento de esta variedad es muy bajo. Una de las principales causas de ello puede deberse al tratamiento con STOMP que fue insuficiente, por ello los rebrotes que se formaron entre la primera y la segunda cosecha fueron tan grandes que restan fiabilidad a estos resultados ya que, de no haber salido, probablemente las cantidades de almidón acumuladas serían mayores. Otra de las posibles causas, es que el cultivo de la planta se realizó en invierno con baja irradiación, por ello se pusieron focos (SON T-Agro 400, Philips) que sólo consiguieron aumentar el fotoperiodo. No obstante, es conveniente

esperar a los resultados de los estudios que actualmente se están llevando a cabo en condiciones de campo para aceptar o descartar estas hipótesis.

Cortar la inflorescencia a las plantas parece tener un efecto positivo en el almacenamiento de almidón con niveles de hasta 2.06 veces superiores, registrados en la última cosecha. Además, hay que tener en cuenta que los rebrotes que salieron fueron mucho más vigorosos en las plantas sin flor, por lo que éstas podrían haber aumentado la diferencia con las plantas enteras.

En la segunda cosecha, se tomaron muestras de cada tipo de hoja para cuantificar la cantidad de almidón en las distintas clases de hoja, con el fin de saber en cuál se acumula más.

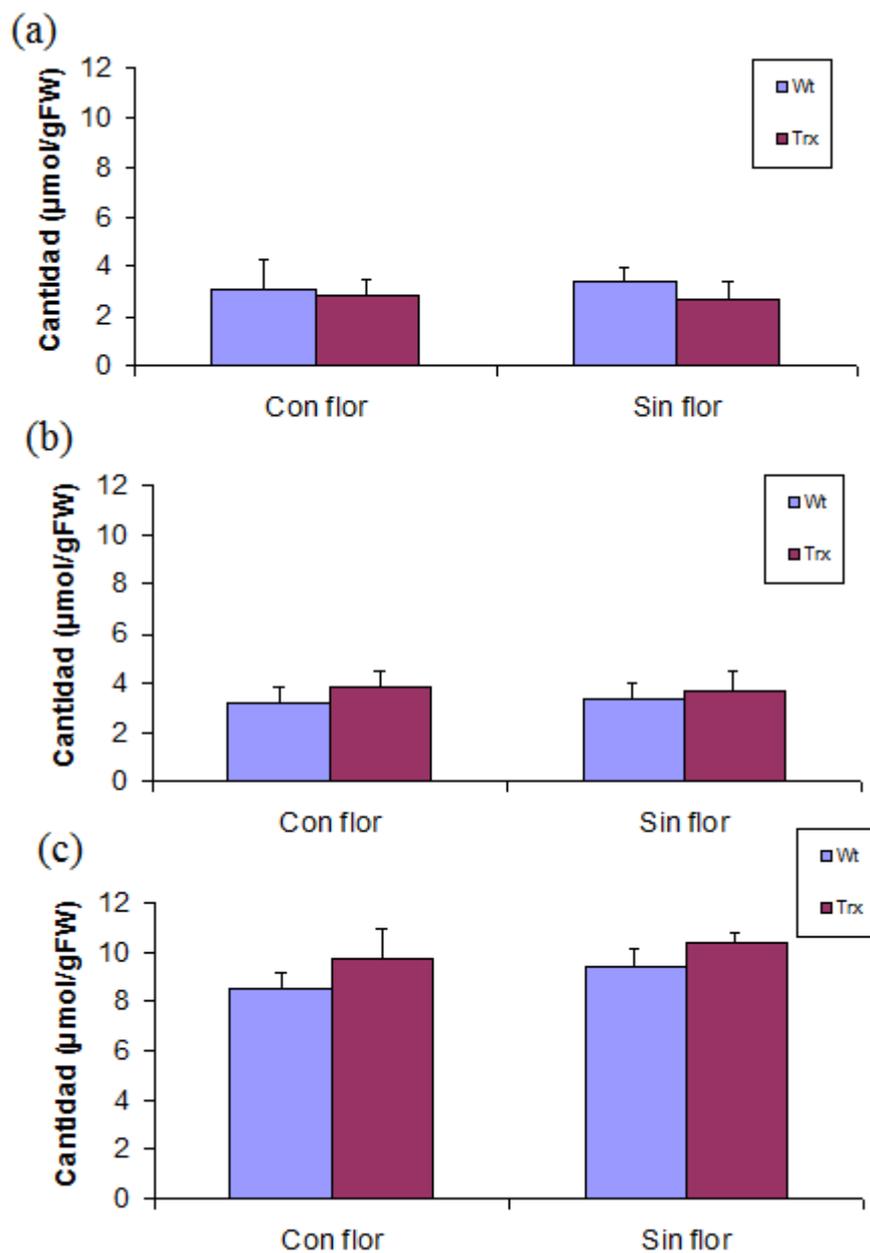


**Figura 6** Cantidad acumulada de almidón en los distintos tipos de hoja (joven, madura y vieja) de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt). Los datos representan la media de tres plantas en cada lote y sus desviaciones típicas correspondientes. Datos tomados en la segunda cosecha con fecha 3 de Marzo de 2011.

En la Figura 6 se observa la cantidad de almidón acumulado en cada tipo de hoja; se aprecia que las hojas jóvenes son las que más almidón acumulan, mientras que las viejas son las que menos, con un nivel de acumulación de 2,14 veces más en el caso de las transformadas y 2,46 veces más en las control. Las hojas maduras también acumulan bastante almidón; éste es el tipo de hoja en el que mayor diferencia se aprecia entre la planta control sin transformar y la transformada con 2,33 veces más en esta última.

➤ *Azúcares solubles*

La cuantificación de los azúcares solubles en hojas de tabaco nos servirá para evaluar el potencial del tabaco como cultivo energético para la producción de bioetanol. Los azúcares que se midieron fueron la glucosa, la fructosa y la sacarosa.



**Figura 7** Cantidad de glucosa (a), fructosa (b) y sacarosa (c) en hojas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor, de la cuarta cosecha con fecha 31 de Marzo de 2011. Los datos representan la media de diez plantas por lote y sus desviaciones típicas correspondientes.

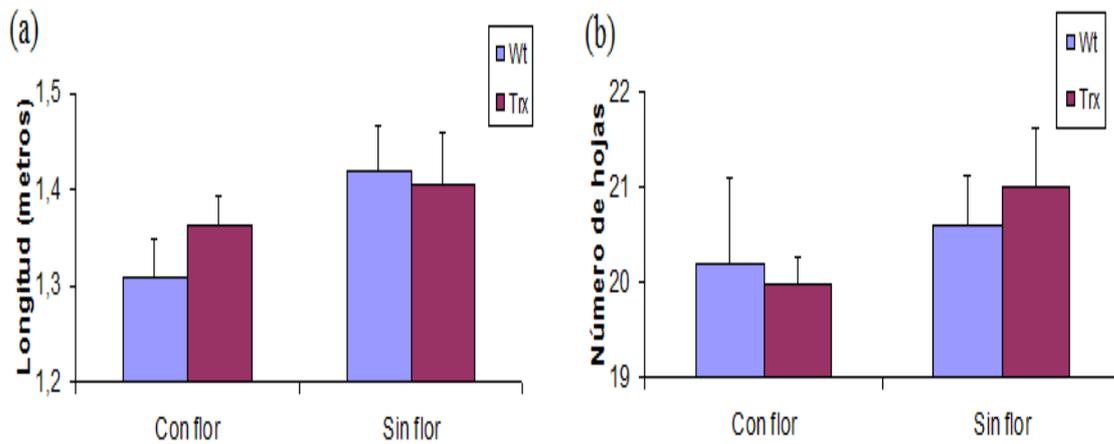
La cantidad de glucosa (Figura 7 a) en hoja es algo mayor en planta de tabaco control sin transformar que en tabaco transformado y apenas hay diferencia entre lotes con inflorescencia y lotes sin inflorescencia. La cantidad de fructosa acumulada en hoja (Figura 7 b) es casi la misma en todos los lotes aunque las plantas transformadas acumulan un poco más, así como las descabezadas. En la Figura 7 c aparece representada la cantidad de sacarosa acumulada en los distintos lotes, las plantas transformadas acumulan más que las plantas control y las descabezadas acumulan un poco más que las plantas con inflorescencia.

Las diferencias en cuantificación de azúcares solubles no son estadísticamente significativas, las transformadas parecen acumular más fructosa y sacarosa que las plantas control, mientras que éstas acumulan más glucosa. Por otro lado, el descabezado tampoco afecta demasiado ya que tampoco existen diferencias significativas, aunque se acumulan más azúcares solubles en las plantas descabezadas que en las que mantienen su inflorescencia. Comparándolo con estudios anteriores (Mingo-Castel et al., 2009), estos resultados no resultan muy positivos ya que en otras variedades se consiguió un aumento en el nivel de sacarosa de más del doble en plantas transformadas lo que supone un transporte más fácil de este disacárido a órganos de reserva y por lo tanto un aumento en el contenido de almidón. En este caso, el hecho de que el nivel de sacarosa esté poco aumentado respecto a las plantas control, ha influido en el hecho de que la cantidad de almidón acumulado tampoco haya conseguido unos niveles demasiado altos respecto a las plantas sin transformar.

#### *4.3. Parámetros fenológicos.*

##### *➤ Altura y número de hojas.*

La altura de la planta se midió en dos momentos: tras cortar la flor y quince días después. Los datos fueron muy similares en ambas fechas, indicando que el descabezado no afectó al crecimiento de las plantas. Así, los datos de la segunda fecha se descartaron y se tuvieron en cuenta sólo los tomados tras el descabezado de la planta que se presentan en la Figura 8 a.



**Figura 8** (a) Altura total expresada en metros de plantas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor. (b) Número de hojas contabilizadas en plantas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y sin flor. Los datos representan la media de cinco plantas en cada lote; y sus desviaciones típicas correspondientes.

Las divergencias entre los distintos lotes no son significativas; no hay una tendencia clara pero en plantas con inflorescencia las plantas más altas son las transformadas y, sin embargo, entre las plantas descabezadas las de mayor altura son las plantas control. La mayor diferencia se encuentra entre plantas control y transformadas que mantienen su inflorescencia y éstas sólo se llevan 6 cm. de altura. Por ello, respecto a la altura, la transformación con tiorredoxina no parece afectar en esta variedad de tabaco.

El número de hojas se contabilizó el día del descabezado de la planta y, al igual que con la altura de planta, se hizo la media de cada lote y los datos están representados en la Figura 8 b. En este caso, las diferencias tampoco son significativas pero ocurre lo contrario que en el caso de la altura, esta vez dentro de las plantas con inflorescencia, son las plantas control las que tienen un mayor número de hojas, y en las plantas descabezadas las plantas transformadas tienen mayor número de hojas. Esto parece indicar una posible relación entre altura y número de hojas que podría resumirse en cuanto más altura tiene la planta, menor número de hojas tiene.

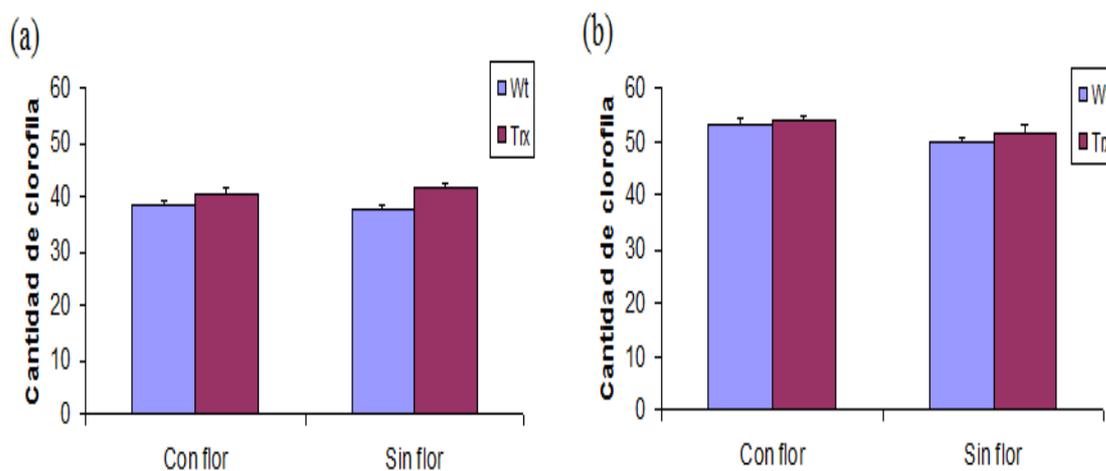


**Figura 9** Dos plantas de tabaco transformadas en invernadero, a la izquierda una con la inflorescencia cortada (descabezada) y a la derecha una con la inflorescencia intacta.

En la Figura 9 se observan dos plantas, a la izquierda una con la inflorescencia cortada y a la derecha una planta con la inflorescencia íntegra, como puede verse no existen diferencias de altura ya que si se cortara la inflorescencia, ambas tendrían una altura similar

➤ *Cuantificación de clorofila.*

Las dos primeras medidas de la cantidad de clorofila se hicieron en hojas alternas de la planta, de cada una se calculó la media con el equipo Spad 502 para obtener un único valor representativo por cada planta, después se hizo la media de cada lote con su desviación típica (Figura 10).

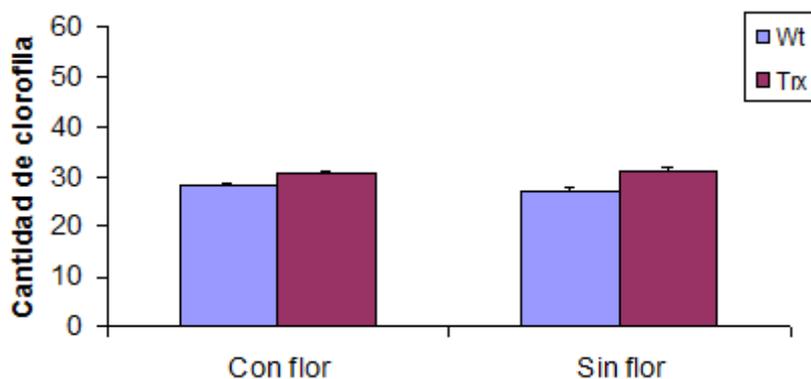


**Figura 10** Cantidad de clorofila, expresada en unidades arbitrarias propias del medidor Spad 502, en hojas alternas de plantas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor. (a) Primera cosecha el 17 de Febrero de 2011. (b) Segunda cosecha el 3 de Marzo de 2011. Los datos representan la media de cinco plantas en cada lote y sus desviaciones típicas correspondientes.

En la primera cosecha (Figura 10 a), las plantas transformadas tienen una cantidad de clorofila levemente superior a las plantas control. No existen diferencias significativas entre los lotes de plantas descabezadas y los que mantienen su inflorescencia; no obstante, en los lotes de plantas con la inflorescencia cortada, se aprecia una diferencia mayor entre las plantas control y las transformadas.

Con el paso del tiempo, en la segunda cosecha (Figura 10 b) las diferencias se acortan entre plantas control y transformadas (aunque siguen sin ser significativas) y la cantidad de clorofila se va igualando entre los lotes. Las plantas transformadas tienen más clorofila que las control sin transformar y las plantas con inflorescencia tienen un nivel de clorofila ligeramente superior a las plantas descabezadas.

La última medida se hizo en las hojas más viejas de la planta, tomando valores en las cinco últimas hojas y, haciendo la media de éstos, se obtuvo un valor representativo de cada planta, después se hizo la media de cada lote con su desviación típica (Figura 11).

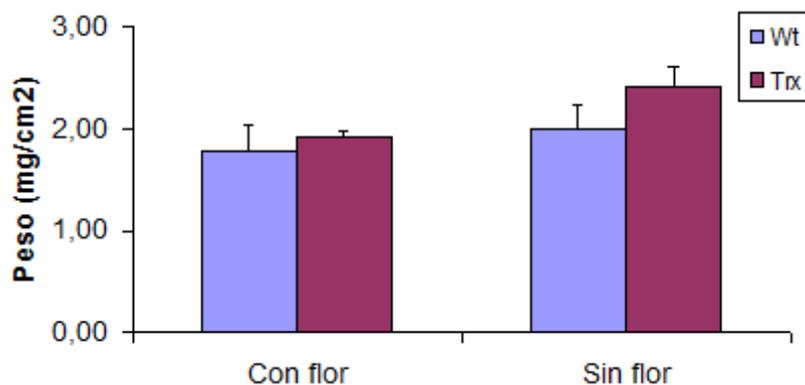


**Figura 11** Cantidad de clorofila, expresada en unidades arbitrarias propias del medidor Spad 502, en las cinco últimas hojas de plantas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor, tomadas en la cuarta cosecha con fecha 31 de Marzo de 2011. Los datos representan la media de cinco plantas en cada lote y sus desviaciones típicas correspondientes.

Las plantas transformadas mantienen un nivel de clorofila ligeramente superior a las plantas control y sigue sin haber diferencias significativas entre plantas descabezadas y con inflorescencia. La entrada de la planta en senescencia se puede predecir fijándonos en la degradación de la clorofila; comparando las medidas de clorofila de la última cosecha con las de la segunda, éstas han perdido entre un 40% y un 47% de la cantidad de clorofila, por lo que ésta se está degradando indicando que la planta está entrando en senescencia; además como las plantas transformadas mantienen un nivel superior de clorofila podría decirse que la fecha de senescencia de las plantas control sin transformar será antes que la de las transformadas. Entre las plantas descabezadas y las que mantienen la inflorescencia no hay diferencias significativas, por lo que el descabezado de las plantas no afecta a la fecha de senescencia.

➤ *Peso fresco y peso seco.*

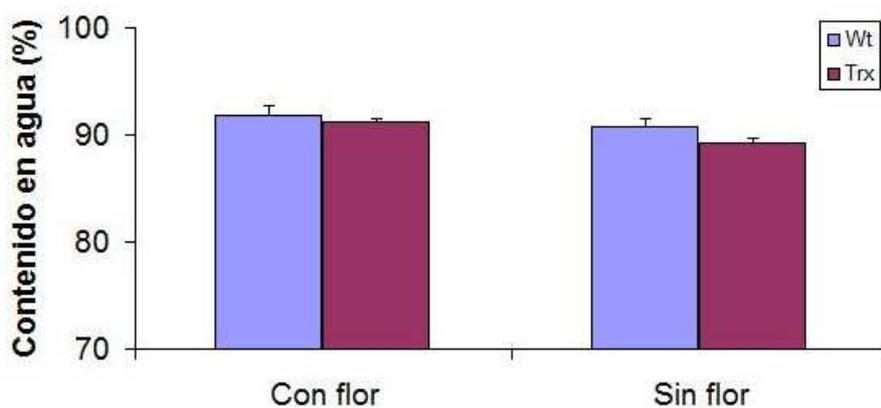
El peso en miligramos por centímetro cuadrado de hoja (Specific Leaf Weight, SLW) se obtuvo al dividir el peso seco entre el número total de discos por el área de cada disco, multiplicándolo todo por mil; después se hizo la media de cada lote con su desviación típica (Figura 12).



**Figura 12** Peso específico de hojas de plantas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor. Los datos representan la media de cinco plantas en cada lote y sus desviaciones típicas correspondientes. Los datos fueron tomados en la segunda cosecha con fecha 3 de Marzo de 2011.

No existen diferencias significativas entre lotes, aunque se observa una ligera tendencia a un mayor peso específico en hojas de tabaco transformado y en lotes de plantas descabezadas. Por ello ni la transformación de la planta ni el corte de la inflorescencia afecta demasiado al peso de las hojas.

El contenido en agua se calculó restando el peso seco del peso fresco y dividiéndolo entre el peso fresco, por cada lote se hizo la media con su desviación típica y se expresó en % (Figura 13).



**Figura 13** Contenido en agua en hojas de plantas de tabaco transformado (Trx) y sin transformar (Wt), en plantas con flor y en plantas sin flor. Los datos representan la media de cinco plantas en cada lote y sus desviaciones típicas correspondientes.

En él se muestran los cuatro lotes prácticamente iguales, con un contenido en agua levemente superior en las plantas control; por ello la planta tampoco parece verse afectada en el contenido de agua de las hojas.

#### *4.4. Valoración de la variedad Havana 503B como cultivo energético.*

Las plantas de tabaco transformadas plastidialmente que sobreexpresan tiorredoxina f para aumentar el nivel del almidón y azúcares solubles acumulados son una alternativa que puede resultar interesante como materia prima para obtención de biocombustibles. Además, el hecho de que sea una especie no comestible y a la que se le puede dar un valor añadido con el fin de reactivar el sector, convierte al tabaco en una opción con muchas ventajas frente a los cultivos tradicionales como los cereales. No obstante, es necesario realizar una valoración de la variedad como cultivo energético y estimar su producción de bioetanol.

Para estimar la producción de bioetanol de la variedad Havana 503B, se tomaron como datos la suma de los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y el almidón acumulado en la cuarta cosecha. Se estima que el rendimiento en la fermentación de los azúcares es del 95% y se ha tomado un valor de conversión de 0,645 L de EtOH/Kg de azúcar (datos facilitados por el Centro Nacional de Energías Renovables, CENER, Navarra). Además, las variedades comerciales de tabaco tienen un rendimiento aproximado de 50 t/ha, lo que les convierte en grandes productoras de biomasa.

En el presente trabajo sobre la variedad de tabaco Havana 503B, se obtuvo una producción estimada de 370 L/ha en las plantas control, mientras que en las plantas transformadas plastidialmente se estimó una producción de 500 L/ha. La planta transformada produce aproximadamente un 30% más que la planta control, este resultado se podía predecir observando los resultados obtenidos en azúcares solubles y en almidón de la cuarta cosecha; en acumulación de azúcares solubles no existían diferencias significativas y en cuanto al cúmulo de almidón, en las plantas transformadas era un 30% mayor que las control sin transformar.

Teniendo en cuenta los rebrotes que surgieron tras la primera cosecha, la producción estimada de bioetanol debería haber sido mayor, aunque no puede predecirse con exactitud, si se puede hacer una aproximación basada en los trabajos realizados con anterioridad con otras variedades de tabaco. En estudios anteriores llevados a cabo en el Instituto de Agrobiotecnología (UPNA, Navarra) sobre la variedad no comercial de tabaco Petite Havana transformada plastidialmente se consiguió una producción estimada de casi 2000 L/ha, mientras que la planta control obtuvo una producción aproximada de 200 L/ha (Mingo-Castel et al., 2009).

La planta control de la variedad Havana 503B parte de una producción estimada mayor que la de la planta sin transformar de Petite Havana; por ello, en condiciones

óptimas, la planta transformada plastidialmente de Havana 503B posiblemente habría alcanzado los 2000 L/ha de la variedad Petite Havana.

Teniendo en cuenta todos estos datos y parámetros se llevó a cabo la valoración del cultivo como materia prima para la producción de almidón. Para poder establecer si este es un cultivo adecuado, primero había que conocer las producciones estimadas de los cultivos que generalmente se emplean para la obtención de bioetanol como el maíz en grano que tiene una producción de entre 1500 y 2000 L/ha, el grano de trigo con 1200 L/ha o la patata con 1800 L/ha (APPA, 2006).

Según los resultados del presente trabajo, la variedad Havana 503B no podría competir con las producciones de cereales o de patata; no obstante, si en condiciones óptimas llegara a alcanzar realmente los 2000 L/ha de bioetanol podría ser una alternativa interesante a los cereales y a la patata, especialmente en zonas como Extremadura en las que las infraestructuras y prácticas de cultivo de tabaco ya están implantadas. Además el tabaco presenta una ventaja añadida que es el alto contenido en agua de sus hojas, esto implica un ahorro de agua en el proceso de hidrólisis para la obtención de bioetanol, lo que supone un descenso en los costes de producción.

Por todo ello, para hacer una valoración mejor de esta variedad como materia prima para la producción de bioetanol, conviene esperar a los resultados de los estudios que actualmente se están llevando a cabo por el Instituto de Agrobiotecnología con esta misma variedad en condiciones de campo.

## 5. Conclusiones.

1. La transformación del genoma plastidial de tabaco de la variedad Havana 503B para sobreexpresar la tiorredoxina f aumenta hasta dos veces los niveles de almidón en hojas de plantas transformadas respecto a plantas control.
2. El corte de la inflorescencia de las plantas también supone un efecto positivo sobre la cantidad de almidón acumulado, incrementándola.
3. Los niveles más altos de almidón se alcanzaron en la cuarta cosecha, ocho semanas después del descabezado.
4. Ni la transformación plastidial de la variedad Havana 503B ni el corte de la inflorescencia producen diferencias significativas en los siguientes parámetros: altura total de la planta, número de hojas, contenido de clorofila, peso específico de las hojas, contenido en agua y cantidad de azúcares solubles en hoja.
5. Las plantas control sin transformar entran antes en senescencia que las plantas transformadas plastidialmente.
6. La producción estimada de bioetanol es de 370 L/ha en plantas control sin transformar y 500 L/ha en plantas transformadas plastidialmente. Esto supone que, en las condiciones del presente estudio, la variedad Havana 503B no es una materia prima para producción de bioetanol capaz de competir frente a los cereales (producción media de 1200-2000 L/ha) o a la patata (producción media de 1800 L/ha).

## 6. Bibliografía.

- APPA, (2006) Bioenergía en la U.E. In. Asociación de Productores de Energías Renovables (ed). [www.appa.es](http://www.appa.es), pp.
- Daniell, H., R. Datta, S. Varma, S. Gray & S. B. Lee, (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature biotechnology* **16**: 345-348.
- Daniell, H., M. S. Khan & L. Allison, (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in plant science* **7**: 84-91.
- Dietzgen, R. G., M. Abedina, C. M. Higgins, S. Karunaratne & J. Vickers, (1998) Nonradioactive Detection of Transgenes in Plant Genomic Southern Blots, a method using DIG chemiluminescent technology. *Biochemica* **1**.
- Hahn-Hagerdal, B., M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden & G. Zacchi, (2006) Bio-ethanol- the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology* **24**: 549-556.
- Herrera, S., (2006) Bonkers about biofuels. *Nature biotechnology* **24**: 755-760.
- Hill, J., E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky & D. Tiffany, (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 11206-11210.
- IICA, I. I. d. C. p. I. A., (2007) Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustibles [www.iica.int](http://www.iica.int): 26.
- Maliga, P., (2002) Engineering the plastid genome of higher plants. *Current opinion in plant biology* **5**: 164-172.
- MAPA, M. d. A., Pesca y Alimentación,, (2007) Manual de gestión de buenas prácticas agrícolas para la producción de tabaco en España. [www.mapa.es](http://www.mapa.es): 38.
- Mingo-Castel, A. M., I. Farran & R. Sanz-Barrio, (2009) Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas. In., pp. 76.
- Murray, M. G. & W. F. Thompson, (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* **8**: 4321-4325.
- Oey, M., M. Lohse, B. Kreikemeyer & R. Bock, (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J* **57**: 436-445.
- Rolletschek, H., M. R. Hajirezaei, U. Wobus & H. Weber, (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.
- Schurmann, P. & B. B. Buchanan, (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & redox signaling* **10**: 1235-1274.
- Staub, J. M., B. Garcia, J. Graves, P. T. Hajdukiewicz, P. Hunter, N. Nehra, V. Paradkar, M. Schlittler, J. A. Carroll, L. Spatola, D. Ward, G. Ye & D. A. Russell, (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature biotechnology* **18**: 333-338.
- Sticklen, M. B., (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature reviews* **9**: 433-443.
- Vyacheslav, A., N. Borisjuk, N. Pogrebnyak, A. Brinker, J. Bixon, S. Spitsin, J. Flynn, P. Matyszczuk, K. Andryszak, M. Laurelli, M. Golovkin & H. Koprowski, (2009) Tobacco as a production platform for biofuel: overexpresion of Arabidopsis DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 1-11.