

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**EVALUACIÓN DEL USO DE VARIEDADES COMERCIALES
DE TABACO TRANSFORMADAS CON EL GEN DE LA
TIORREDOXINA *F* COMO POSIBLE CULTIVO
ENERGÉTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

presentado por

AMAIA ALTUNA ALDAREGUIA(*e*)k

aurkeztua

**INGENIERO AGRONOMO
NEKAZARITZA INGENIARITZA**

Febrero, 2012 / 2012ko, *Otsaila*

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Los biocombustibles.....	5
El bioetanol.....	7
La bioquímica y el metabolismo del almidón.....	9
La tiorredoxina.....	10
Relación entre tiorredoxina y producción de almidón.....	11
Características morfológicas y botánicas del tabaco.....	13
Cultivo del tabaco.....	15
Huella de carbono.....	21
Metodología PAS 2050.....	22
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Material vegetal y obtención de las plántulas de tabaco.....	27
Diseño experimental del ensayo.....	28
Desarrollo y manejo del cultivo en campo.....	28
Seguimiento del cultivo. Determinación del contenido en clorofila y parámetros morfológicos.....	30
Peso específico de hojas.....	31
Determinación del contenido de almidón en hoja.....	31
Rendimiento en la obtención de bioetanol.....	33
Análisis estadístico.....	33
Huella de carbono.....	34
RESULTADOS.....	36
Desarrollo vegetativo del cultivo (altura, nº hojas, clorofila).....	36
Peso específico de las hojas de tabaco.....	40
Acumulación de almidón en las hojas de tabaco.....	41
Rendimiento en la obtención de bioetanol.....	43
Huella de Carbono.....	44
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXO 1: ANOVAS.....	57
Clorofila.....	57

Altura.....	60
Nº hojas.....	61
Almidón.....	63
Peso específico.....	65
ANEXO 2: ENCUESTA HUELLA DE CARBONO.....	66

TÍTULO: Evaluación del uso de variedades comerciales de tabaco transformadas con el gen de la tiorredoxina *f* como posible cultivo energético para la producción de bioetanol.

ALUMNA: Amaia Altuna Aldareguia

DIRECTORA: Inmaculada Farran Blanch

Los biocombustible, y en particular el bioetanol, son una alternativa a los combustibles fósiles. Sin embargo, algunos de los cultivos energéticos utilizados actualmente pueden llegar a provocar una serie de desventajas a nivel social debido a su competencia con los cultivos alimentarios. Para ello, en los últimos años se ha planteado la introducción de especies no convencionales para su aprovechamiento energético.

El tabaco es un gran productor de biomasa verde siendo prácticamente el 100% de la parte aérea cosechable. Sin embargo, las hojas de tabaco no son acumuladoras de almidón. Con el fin de incrementar el contenido de almidón en estas plantas, se ha sobreexpresado el gen de la tiorredoxina *f* desde el cloroplasto de variedades comerciales de tabaco, convirtiéndolas en una atractiva fuente de almidón para la producción de bioetanol.

El cultivo de las plantas transformadas se realizó en campo, en la finca experimental del ITG en el término municipal de Sartaguda. El diseño experimental fue de bloques al azar con parcelas elementales de 60 x 90 cm, con 15 plantas por parcela y tres repeticiones. Se ensayaron dos líneas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de las siguientes variedades: Havana 503-B y Virginia Gold. Además, se incluyeron en el ensayo plantas control sin transformar de cada una de las dos variedades. Se estudiaron parámetros fenológicos y morfológicos (altura, número de hojas, clorofila, peso seco y peso fresco) durante el desarrollo del cultivo.

Tras la cosecha se analizó el rendimiento de las hojas transgénicas de tabaco en la producción de bioetanol a escala de laboratorio, comparándolo con las plantas control. Para ello, se cuantificó la cantidad de almidón, mediante una hidrólisis enzimática y una determinación fotométrica de la cantidad de glucosa siguiendo un kit comercial. Además, se calculó la huella de carbono del cultivo de tabaco, con la ayuda de varios agricultores, para poder valorar si la producción del bioetanol a partir de tabaco puede ser rentable comparándolo con las emisiones que se producen en su cultivo.

La sobreexpresión de Trxf mostró un aumento de las cantidades de almidón en las hojas de las plantas transformadas de hasta 4 veces más que en las control. Los litros de bioetanol por hectárea que se podrían obtener con las hojas de estas plantas transgénicas de tabaco rondaron los 500-700 L. La huella de carbono estimada para este cultivo fue de 774 kg CO₂ eq/t. A pesar de que estos datos no serían los óptimos para recomendar el uso de las plantas de tabaco con sobreexpresión de tiorredoxina *f* como cultivo energético, y teniendo en cuenta que el desarrollo del cultivo en condiciones de campo no fue el deseado, sería aconsejable repetir el ensayo en mejores condiciones de cultivo para poder validar estos datos.

Los biocombustibles

La creciente preocupación por la seguridad del suministro del petróleo y el impacto negativo de los combustibles fósiles sobre el medio ambiente, en particular las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), han ejercido presión sobre la sociedad para encontrar alternativas para combustibles renovables (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Para ser una alternativa viable, un biocombustible debe proporcionar una ganancia neta de energía, beneficios ambientales, ser económicamente competitivo y poder ser producido en grandes cantidades, sin reducir el suministro de alimentos (Hill *et al.*, 2006).

Los biocombustibles o biocarburantes son combustibles líquidos, de origen biológico, obtenidos de manera renovable a partir de restos orgánicos (biomasa), susceptibles de ser empleados en un motor de combustión. Los biocarburantes proceden habitualmente de materias primas vegetales, pudiendo ser sólidos (paja, cardo, leña, astillas y carbón vegetal), líquidos (aceites, metilésteres, alcoholes, etc.) o gaseosos (los diferentes biogases). Todos ellos reducen el volumen de CO₂ que se emite en la atmósfera, ya que se trata de un proceso de ciclo cerrado. La energía contenida en la biomasa procede en última instancia de la energía solar fijada por los vegetales en el proceso fotosintético y acumulada en los enlaces de las moléculas orgánicas que forman su biomasa. Esta energía se libera al romper los enlaces de los compuestos orgánicos en el proceso de combustión, dando como productos finales anhídrido carbónico y agua (Schwietzke *et al.*, 2011).

Los análisis de etanol y biodiesel realizados sugieren que, en general, los biocombustibles podrían proporcionar mayores beneficios ambientales si sus materias primas de biomasa se produjesen con bajos insumos agrícolas (es decir, menos fertilizantes, pesticidas y energía), en tierras agrícolas con un valor bajo o marginales, y requiriesen bajo consumo de energía para convertir las materias primas en biocombustibles (Hill *et al.*, 2006). Ya que, el costo relativamente alto de los aceites refinados hacen que los combustibles resultantes no puedan competir con los combustibles derivados del petróleo (Yadav *et al.*, 2010).

La demanda global de alimentos se duplicará en los próximos 50 años, y la demanda mundial de combustibles para el transporte se espera que aumente aún más rápido. Hay una gran necesidad de fuentes de energía renovables que no causen daño ambiental significativo y que no compitan con el suministro de alimentos. La conservación de la energía y los biocombustibles que no están basados en los alimentos es probable que sean mucho más importantes a largo plazo. (Hill *et al.*, 2006). Por ello, con el fin de que los cultivos bioenergéticos no sean un potencial invasor para los cultivos autóctonos y la bioeconomía, se están buscando regionalmente cultivos apropiados con alto rendimiento, lo que permite una gran flexibilidad en la elección de dichos cultivos (Barney and DiTomaso, 2011).

Una de las mayores ventajas de los biocombustibles es que se pueden producir en cualquier parte del mundo a partir de materia prima propia cosechada con maquinaria agrícola. Brasil, por ejemplo, produce etanol de la caña de azúcar y el biodiesel de la soja, Malasia e Indonesia producen etanol a partir de aceite de palma, Suecia, Reino Unido y Austria utilizan la madera para producir combustibles líquidos y sólidos, Canadá utiliza el maíz y el trigo, y los Estados Unidos en su mayoría utiliza grano y rastrojo de maíz (Herrera, 2006).

El tabaco puede generar una gran cantidad de biomasa de bajo costo de manera más eficiente que cualquier otro cultivo agrícola. En la búsqueda de alternativas de plantas para biocombustible, el tabaco ha sido pasado por alto ya que se considera principalmente como un cultivo caro cuando se utiliza para la industria tabacalera. Sin embargo, un examen más detallado identifica el tabaco, que se cultiva en más de 100 países, como un cultivo de biomasa destacado, que puede generar hasta 170 t/ha de tejidos verdes cuando se cultiva para la producción de biomasa (Andrianov *et al.*, 2010). Por otra parte, el tabaco puede ser cortado para estimular el rebrote después del corte, por lo que varias cosechas de biomasa son posibles en un solo año.

Los aceites de biocombustibles por lo general no se asocian a la biomasa verde, hojas y tallos, pero si con las semillas que acumulan aceite en forma de triglicéridos como reserva de almacenamiento. El tabaco produce hasta un 40% de aceite por peso de semilla seca. Sin embargo, el tabaco produce una cantidad modesta de unos 600 kg de semillas por hectárea, muy inferior a los productores tradicionales de biocombustibles, como la soja o la colza. Recientemente, mediante ingeniería genética se ha conseguido

incrementar hasta un 4% del peso seco los niveles de aceite en hojas de tabaco, por lo que puede considerarse un atractivo y prometedor "cultivo energético" para la producción de biodiesel (Andrianov *et al.*, 2010).

Sin embargo, hay que reconocer que el proceso de extracción de biocombustibles a partir de biomasa verde representa un mayor reto en comparación con el método establecido de extracción de aceite de semillas. Como resultado de los recientes progresos realizados con respecto a la disminución del costo de las enzimas, la optimización del método de tratamiento previo, y el desarrollo de cepas de levadura más eficiente, la fermentación de la biomasa de tabaco a etanol se ha convertido aún más factible. Mediante la generación tanto de biocombustibles como de etanol, el tabaco tiene el potencial para producir más energía por hectárea que cualquier otro cultivo no alimentario (Andrianov *et al.*, 2010).

El bioetanol

El reciente marco establecido por la Unión Europea para la promoción de los biocombustibles espera fomentar el sector de cultivos energéticos. En España, el porcentaje de bioetanol en el sector del transporte es casi diez veces mayor que el de biodiesel, por lo que se ha presentado un renovado interés en la investigación y el desarrollo de cultivos energéticos para la obtención de bioetanol (Fernández and Curt, 2005). A nivel mundial en la actualidad, la mayoría de los biocombustibles son también en la forma de etanol (Sticklen, 2010).

El bioetanol es un alcohol que se obtiene por fermentación de productos azucarados procedentes de cultivos de plantas hidrocarbonadas cuya transformación en biocarburante resulta sencilla. Estos azúcares están en forma de sacarosa, hemicelulosa y celulosa, moléculas orgánicas complejas que se concentran en la parte fibrosa de la planta gracias al proceso de fotosíntesis. Tras la fermentación de los azúcares presentes en la materia orgánica de la planta, se obtiene el alcohol hidrato, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidrato se puede utilizar como biocombustible.

La producción de bioetanol a partir de caña de azúcar representa una de las principales tecnologías capaces de producir biocombustible de manera eficiente y

económica, proporcionando alternativas viables a la gasolina. En este cultivo, la combinación de la inmovilización de CO₂ mediante la fotosíntesis en azúcares solubles, junto con la fermentación alcohólica de éstos ha permitido la producción de un combustible líquido, limpio y de alta calidad que contiene el 93% de la energía original que se encuentra en el azúcar (Amorim *et al.*, 2011). El bioetanol producido a partir de materias primas amiláceas requieren una primera etapa de licuefacción (para solubilizar el almidón), seguida de una fase de hidrólisis (para producir glucosa). Finalmente, la glucosa resultante es fácilmente fermentada (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). En la actualidad, los principales retos científicos son el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de bioetanol a partir de materias primas, la selección de nuevas cepas de levadura, la mejora genética y la tecnología de ADN recombinante aplicada a los procesos de producción de bioetanol (Amorim *et al.*, 2011).

Actualmente, el bioetanol para el mercado de combustibles se produce a partir de azúcar (Brasil) o almidón (EE.UU.). Sin embargo, estas materias primas, que también tienen que ser utilizadas para la alimentación animal y otras necesidades humanas, no serán suficientes para satisfacer la creciente demanda de etanol como combustible y la reducción de gases de efecto invernadero resultantes del uso de azúcares o almidón como sería deseable (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006).

Otra alternativa es la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico (bioetanol de segunda generación) (Dunnett *et al.*, 2008). Se produce a partir de residuos agrícolas, forestales o industriales (con alto contenido en biomasa) tales como la paja de cereal, cáscaras de cereal y arroz, Residuos Sólidos Urbanos (RSU) o madera. Los residuos tienen la ventaja de su bajo coste, ya que son la parte no necesaria de otros productos o procesos (Tang *et al.*, 2011). Aunque existen similitudes entre los procesos lignocelulósicos y el de almidón, los retos tecno-económicos que enfrentan los primeros son mayores. El primer paso en la conversión de biomasa en etanol es la reducción de tamaño y el pretratamiento. La hemicelulosa y la celulosa, deben ser hidrolizados con enzimas o ácidos para liberar los azúcares monoméricos. Los azúcares del pretratamiento son fermentados por las bacterias, levaduras u hongos filamentosos. La hidrólisis enzimática y fermentación también se puede realizar en un paso combinado llamado sacarificación simultánea y fermentación (SSF). Después de la purificación final (por destilación y tamices moleculares, u otras técnicas de separación), el etanol

está listo para ser utilizado como combustible, ya sea puro o mezclado con gasolina. Una parte de la lignina, la parte principal de la biomasa sólida restante, se puede quemar para producir calor y electricidad para el proceso, mientras que el resto se mantiene como un subproducto valioso (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Sin embargo, la producción de etanol celulósico sigue siendo poco rentable debido a la baja concentración de etanol de los productos, que debido a su diversa procedencia pueden contener otros materiales cuyo pre-proceso de separación incrementa mucho el precio de la obtención del bioetanol (Tang *et al.*, 2011).

La bioquímica y el metabolismo del almidón

El almidón constituye la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en plantas. Se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros) y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es utilizado frecuentemente en la industria papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables y en la producción de biocombustibles (Mingo-Castel *et al.*, 2009).

El almidón se encuentra en plantas, algas verdes y cianobacterias. El almidón, principal carbohidrato de reserva de las plantas vasculares, es un homopolímero de moléculas de glucosa agrupadas en cadenas de amilosa y amilopectina (Ball and Morell, 2003). Es una compleja estructura granular (de 0,1 a más de 50 μm de diámetro) que se puede acumular tanto en los cloroplastos de las hojas (almidón transitorio) como en los amiloplastos de las células de los tejidos de almacenamiento (almidón almacenado). Se compone de dos fracciones de polisacáridos diferentes: amilosa y amilopectina (Figura 1). La amilopectina es el compuesto principal, tiene un peso molecular muy alto (10^7 - 10^9 Da) y posee un 5% de enlaces α -1,6. La amilosa es una molécula más pequeña (peso molecular de 10^5 - 10^6 Da) con muy pocos enlaces α -1,6 (menos del 1%). Ambos tipos de polisacáridos se sintetizan en plastidios por similares enzimas utilizando las ADP-glucosas como sustrato (Ball *et al.*, 1996). La *ADP glucosa pirofosforilasa* transforma la glucosa-1-fosfato en ADP-Glucosa, en el proceso se invierte una molécula de ATP y se obtiene ADP-Glucosa y fósforo inorgánico (PPi) (Murata *et al.*, 1964).

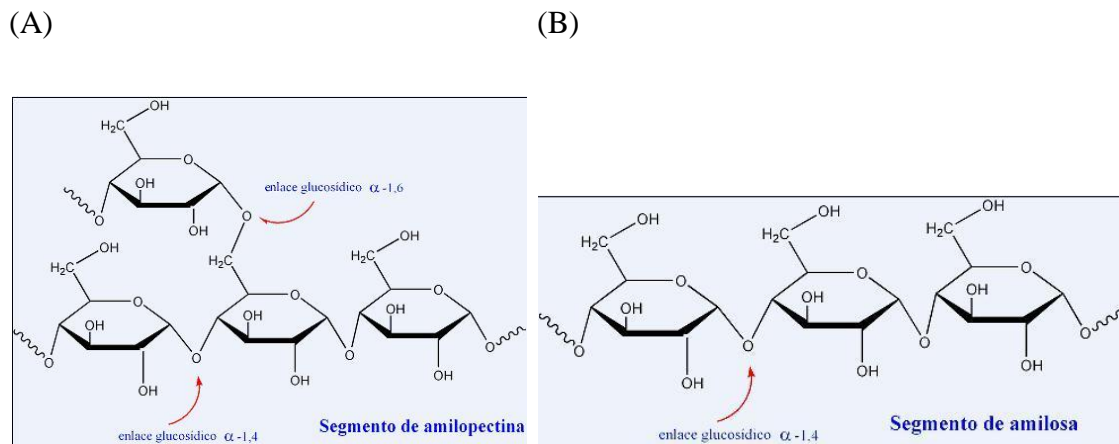


Figura 1: Estructura de los homopolímeros que componen el almidón: (A) amilopectina y (B) amilosa.

El balance amilosa/amilopectina, la forma y el tamaño de los gránulos de almidón cambian según especies y órganos de una misma planta, también dependiendo de la actividad de cada etapa (Murata et al., 1964).

La tiorredoxina

Las tiorredoxinas (Trxs) son pequeñas proteínas (alrededor de 10-12 kDa) presentes en todos los organismos de vida libre, que catalizan las reacciones redox, promueven la formación de puentes disulfuro y controlan una amplia gama de rutas bioquímicas (Berndt et al., 2008; Buchanan y Balmer, 2005).

La función principal de la tiorredoxina es la reducción de puentes disulfuro en proteínas diana en una reacción donde el tiol N-terminal del motivo CXXC ataca el puente disulfuro de la proteína diana, liberando un tiol y formando un puente disulfuro con la segunda cisteína de la proteína diana (Meyer et al., 2009). Las plantas superiores poseen un sistema de tiorredoxinas muy complejo, ya que existen múltiples isoformas y múltiples genes que codifican para cada tipo de tiorredoxina, siendo todos estos genes codificados nuclearmente (Issakidis-Bourguet et al., 2001).

Los cloroplastos contienen 4 tipos de tiorredoxina f, m, x, e y. La evidencia experimental sugiere que las tiorredoxinas f y m representan las formas más abundantes del cloroplasto y las tiorredoxinas x e y, son menos abundantes (Buchanan and Balmer, 2005). Inicialmente, las tiorredoxinas de los cloroplastos m y f fueron denominadas así

en función de la enzima que eran capaces de activar preferentemente: fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa) (tipo f) o NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH) (tipo m) (Montrichard *et al.*, 2009; Arsova *et al.*, 2010). Estas fueron identificadas como enzimas dependientes de luz, capaces de regular las enzimas clave del metabolismo del carbono en la fotosíntesis de los cloroplastos, como las del ciclo de Calvin (Lemaire *et al.*, 2007). Las tiorredoxinas de tipo x e y parecen estar más implicadas en la respuesta de la planta al estrés.

A pesar de que todas las tiorredoxinas plastidiales están codificadas en el núcleo y su estructura general es similar, estudios filogenéticos y comparaciones estructurales han demostrado que la Trx m, x e y tienen un origen procariota, mientras que la Trx f, muestra homología con Trxs de origen eucariota (Sanz-Barrio *et al.*, 2011), pero poco más se sabe acerca de su especificidad fisiológica (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001). Las tiorredoxinas cloroplásticas pueden regular procesos tan importantes como: la síntesis de ADN, la asimilación de azufre, la biosíntesis de lípidos, aminoácidos y nucleótidos, el plegamiento de proteínas, la biosíntesis de ácidos grasos, el ciclo de Calvin, la síntesis de almidón, la síntesis de ATP, el ciclo de las pentosas fosfato, el estrés oxidativo (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001; Buchanan and Balmer, 2005; Meyer *et al.*, 2009; Berndt *et al.*, 2008; Sanz-Barrio *et al.*, 2011; Balmer *et al.*, 2006; Montrichard *et al.*, 2009; Mingo-Castel *et al.*, 2009).

Las tiorredoxinas del cloroplasto obtienen el poder reductor a través del sistema ferredoxina/tiorredoxina (Fdx/Trx) (Montrichard *et al.*, 2009). En el cloroplasto, los electrones liberados en la oxidación del agua durante el proceso de la fotosíntesis son transferidos a través de la cadena de transporte de electrones hasta la ferredoxina (Fdx). La Fdx reducida es capaz de reducir a la Trx por acción de la Fdx-Trx reductasa o FTR (Meyer *et al.*, 2009; Schurmann and Buchanan, 2008). Por lo tanto, en los cloroplastos la reducción de la Trx está vinculada a la luz y la fotosíntesis. Durante la noche, tanto Trx como Fdx, se oxidan dando lugar a la activación/desactivación de las enzimas reguladoras asociadas (Meyer *et al.*, 2009).

Relación entre tiorredoxina y producción de almidón

El metabolismo del carbono empieza en los cloroplastos mediante la fijación de carbono inorgánico en el complejo proceso de la fotosíntesis. El CO₂ atmosférico se

incorpora al ciclo de Calvin y, posteriormente, es exportado al citosol en forma de triosa-fosfato para convertirse en sacarosa (Mingo-Castel *et al.*, 2009).

Las tiorredoxinas plastidiales, activadas por la luz, desempeñan un papel muy importante en el metabolismo de los carbohidratos. Concretamente, la tiorredoxina f desempeña un papel fundamental en la activación específica de muchas de las enzimas implicadas en el ciclo de Calvin, por lo que se cree que ejerce algún control en la asimilación fotosintética del carbono. Se ha demostrado una activación específica de la Trxf para fructosa-1,6-bis-fosfatasa (FBPasa), rubisco-activasa, fosforibuloquinasa (PRK), gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa (SBPasa). Recientemente, se han identificado otras enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos que son reguladas por tiorredoxinas, como la AGPasa, la α -glucano-agua dikinasa y la β -amilasa. (Buchanan *et al.*, 2002; Lemaire *et al.*, 2007).

Al modificar las enzimas que están implicadas en el metabolismo de carbohidratos el almidón se ve influenciado, aumentando o disminuyendo su contenido. La mayoría de trabajos relacionados con la obtención de plantas productoras de almidón giran en torno a la utilización de la AGPasa (Slattery *et al.*, 2000; Stark *et al.*, 1992), por ejemplo, en semillas transgénicas de *Vicia narbonensis* se observa que cuando la AGPasa y la ADP-glucosa descienden bruscamente el almidón se reduce moderadamente (Rolletschek *et al.*, 2002). Sin embargo también se ha conseguido aumentar los niveles de almidón mediante la producción de plantas transgénicas que sobreexpresan sacarosa-sintasa (SS) (Baroja-Fernandez *et al.*, 2004). En plantas de tabaco transgénicas a las que se les ha reducido la actividad SBPasa dan lugar a reducciones en los niveles de carbohidratos, sobre todo en almidón. Sin embargo, estos cambios en el contenido de carbohidratos también dependen del estado de desarrollo de la hoja (Ölçer *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que la reducción de la cantidad de fructosa 2,6-bifosfato (Fru-2,6-bisP) en plantas transgénicas de tabaco disminuyó la producción de almidón en hojas que estaban en oscuridad (Scott *et al.*, 2000). En cambio, al elevar la cantidad de esta enzima, se observó que el contenido de almidón también descendía, probablemente porque la estimulación de síntesis del almidón es unidireccional (Scott and Kruger, 1995). Plantas transgénicas de tabaco con altos niveles de fructosa-1,6-bisfosfatasa, en condiciones atmosféricas, mantienen el crecimiento, la actividad fotosintética, y el peso fresco sin cambios, pero la relación

sacarosa/hexosa/almidón se altera ligeramente. En niveles elevados de CO₂, sin embargo, las ramificaciones laterales, número de hojas y peso fresco se incrementaron significativamente. La actividad fotosintética también se vio incrementada. La hexosa se acumuló en las hojas superiores de las plantas, mientras que la sacarosa y almidón se acumularon en las hojas inferiores y brotes laterales (Tamoi *et al.*, 2011).

Plantas transgénicas de tabaco que expresan FBP/SBPasa de cianobacteria en los cloroplastos mediante transformación nuclear mostraron una mayor eficiencia fotosintética y características de crecimiento (Miyagawa *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando esta proteína se ha expresado mediante las técnicas de transformación del cloroplasto, a pesar de presentar unos niveles mayores de expresión, no se han observado cambios importantes en fotosíntesis, crecimiento y niveles de azúcares respecto a los obtenidos mediante transformación nuclear (Yabuta *et al.*, 2008).

Características morfológicas y botánicas del tabaco

La planta de tabaco es el único vegetal capaz de sintetizar en cantidad importante y conservar en sus hojas después de secas un alcaloide, la nicotina. El tabaco pertenece al género *Nicotiana*, encuadrado en la familia botánica de las *Solanaceae*. El tabaco comercial se obtiene casi en su totalidad de la especie *tabacum*, otra especie la *Nicotiana rustica* se cultiva en cantidades relativamente pequeñas. El origen de la especie *Nicotiana tabacum* se debió al cruzamiento, seguramente casual, de dos especies más antiguas, la *Nicotiana tomentosiformis* y la *Nicotiana sylvestris*. Al género *Nicotiana* pertenecen además de la *tabacum* otras 60 especies, la mayoría originarias de América. Atendiendo a su morfología, a la distribución geográfica de las mismas y al número de sus cromosomas, han sido agrupadas en tres subgéneros: *rustica*, *tabacum* y *petunoides*. La *N. tabacum* comprende numerosas variedades con apariencia, tamaño y cualidades diferentes (Llanos, 1981; Llanos, 1985).

Las *Nicotiana* son plantas anuales, de tallo herbáceo (algunas son vivaces, de tallo subleñoso), del que nacen hojas aisladas enteras. Las flores crecen en inflorescencias y son hermafroditas. El cáliz es tubuloso, ovoide o acampanado. La corola es tubular y termina en un limbo de 5 lóbulos (de color púrpura, rosa, amarillo o blanco). Tiene 5 estambres insertos dentro del tubo de la corola y frecuentemente desiguales. El ovario generalmente con dos cavidades y estigma en forma de cabeza

aplastada. La flor una vez fecundada y madura se convierte en una capsula, que se abre en su vértice por dos valvas, que contienen numerosas semillas muy pequeñas de forma reniforme (de 10.000 a 13.000 semillas pesan un gramo) (Figura 2) (Llanos, 1981; Llanos, 1985).



Figura 2: Morfología de la planta de tabaco. (A) cápsula partida en dos valvas, (B) cáliz tubuloso, (C) semilla pequeña de forma reniforme, (D) hoja aislada y entera, (E) inflorescencia ramificada, (F) anteras, (G) sección vertical del ovario con dos cavidades, (H) sección horizontal del ovario donde se aprecian las dos cavidades, (I) sección vertical de la flor, donde se ve la inserción de los estambres, (J) estigma en forma de cabeza aplastada, (K) pistilo y (L) sección de la semilla.

La variedad Virginia es una planta alta y fuerte de tallo grueso con entrenudos muy cortos en la parte baja del tallo y más distanciados en la parte superior. Las hojas tienen una relación largo-ancho aproximadamente igual a tres, de forma lanceolada, acuminadas y más anchas en la base (oval-lanceolada). La nervadura central es fuerte y la secundaria formando ángulo con aquella. Las hojas de color verde oscuro pasan a marrón cobrizo al secarse. La inflorescencia, son ramos espaciados ramificados y frondosos, reunidos sobre su eje y que llegan todos, aproximadamente, a la misma altura. La flor es más bien larga con pétalos triangulares de color rosa o rojo (Llanos, 1981).

La variedad Havana es una planta medianamente alta y derecha, de tallo no muy grueso, con 20-25 hojas que nacen casi horizontales. Los entrenudos son bastante amplios, sobretudo en la parte alta del tallo. Las hojas son de forma elíptica algo acuminadas en la punta, aproximadamente el doble de largas que anchas, de color verde suave que pasa a color verdoso claro al secarse. El ángulo de inserción de las

nervaciones secundarias en la principal es bastante abierto. Las inflorescencias son abiertas con ramos inferiores espaciados y casi horizontales. Las flores son pequeñas con sépalos terminados en punta adheridos al tubo de la corola, y los pétalos más anchos que largos de color rojo o carmín (Llanos, 1981).

Cultivo del tabaco

Distribución de la producción de tabaco en España

Se evidencia una notoria concentración del cultivo de tabaco en la Comunidad Autónoma de Extremadura, que alcanza el 92,5% de la producción nacional. Le siguen: Andalucía con un 6% de la producción total, Castilla y León, Castilla La Mancha, Navarra y País Vasco, hasta alcanzar una producción estimada de 34.064 t según datos de contratación de la cosecha 2007. En términos de superficie, en España se cultivan, entre todos los grupos de variedades de tabaco, aproximadamente, 9.950 ha. El cultivo del tabaco tiene una gran importancia socioeconómica en determinadas regiones españolas y se concentra en las provincias de Cáceres y Granada. En la Tabla 1 se exponen los datos correspondientes a la cosecha del 2007 de producción en Navarra y en el total del estado (Anuario de Estadística, 2008).

Tabla 1. Producción y superficie de tabaco en Navarra y en España (cosecha 2007).

CONTRATACIÓN DE TABACO EN NAVARRA (COSECHA 2007)				
Comunidad Autónoma	Grupo y variedad	Nº Productores	Kilos contratados	Superficie cultivada (ha)
Navarra	G-III Havana	18	61.050	18,79
Total general		3.341	34.064.186	9.947,11

El clima

El tabaco es originario de regiones subtropicales, con climas cálidos y húmedos. El clima influye sobre la duración del ciclo vegetativo de las plantas, así como en la calidad y el rendimiento de la cosecha.

Los factores del clima que más van a influir en el rendimiento y calidad de las cosechas son: la temperatura del aire y del suelo (no debe haber heladas), la

disponibilidad de agua en el suelo, la humedad relativa del aire y la intensidad de la luz (información obtenida del MARM). En Navarra y, en concreto, en la zona media, donde se da el cultivo del tabaco, las temperaturas medias anuales oscilan entre los 11,5° y 13,5° C, con máximas cercanas a 40° C en julio y agosto. El periodo libre de heladas se extiende desde finales de abril a finales de octubre. La pluviometría media varía de 1.000 a 600 mm anuales. Esta zona pertenece a un clima mediterráneo de veranos frescos (datos obtenidos de meteo.navarra.es).

Características de los suelos tabaqueros

El suelo óptimo para el buen arraigue y desarrollo posterior de las plantas lo ofrecen las tierras porosas, friables y fértiles donde las raíces pueden extenderse libremente en superficie y en profundidad (Llanos, 1981). Al elegir la parcela para cultivar tabaco se tendrá en cuenta que la parcela sea homogénea, con suelo permeable y buen drenaje, para evitar la asfixia de las raíces.

El pH de los suelos de cultivo de tabaco, mediante aportaciones de enmiendas calizas o dolomitas (contienen calcio y magnesio) de forma anual, se deben situar próximos a los 5,8-6,2. El contenido óptimo de materia orgánica en el suelo para el cultivo del tabaco se debe situar entre el 1,8 y el 2,2 %. La materia orgánica puede ser de diferentes orígenes y composición, se recomienda estiércol de vacuno y se aplicará, de media, 20 t/ha y año (información obtenida del MARM).

La producción de plantas en semillero

La semilla de tabaco es extremadamente pequeña (de 10.000 a 13.000 semillas/g) y su germinación delicada (Llanos, 1981), por lo que, habitualmente la producción de todas las variedades de tabaco cultivadas en España, se realiza mediante el sistema de bandejas flotantes, con el fin de mejorar la calidad de las plantas, tanto en potencial radicular como en masa vegetativa.

La técnica de producción de plantas en bandejas flotantes es un método fácil, cómodo y seguro de obtener plantas uniformes, con cepellón, vigorosas, sanas y de calidad, en el momento adecuado para realizar el trasplante al terreno de asiento y en cantidad suficiente, con eliminación del estrés post-trasplante e inmediato arraigue (información obtenida de MARM).

Las labores preparatorias del suelo

El tabaco tiene unas raíces blandas con escaso poder penetrante. Por ello, es preciso trasplantar el tabaco en tierras bien trabajadas que presenten en profundidad y de forma uniforme una estructura suelta conferida por las labores preparatorias (Llanos, 1981).

Se recomienda realizar labores preparatorias dirigidas al mantenimiento de la fertilidad del suelo y para conseguir airear el suelo, activar la vida microbiana, destruir las malas hierbas, romper las capas duras del suelo, mejorar la estructura, etc.

Se realizarán estrictamente las labores necesarias, en el momento adecuado para que sean eficaces. Deben ser profundas, procurando romper la suela de labor y las capas impermeables que limitan el desarrollo radicular; y en caso de fuertes lluvias, facilitarán el desagüe. Se debe respetar la estructura del suelo (información obtenida de MARM).

Plagas y enfermedades

Los animales e insectos de gran tamaño, como las hormigas, tijeretas, topes o ratas, producen daños en la época del semillero, desarraigando las plántulas de los semilleros y comiéndoselas.

Los insectos como *Agrotis segetum* o *Agriotes lineatus*, producen daños en su fase de larva o gusano, comiéndose el tallo de la planta de tabaco. Generalmente, afectan cuando la planta está recién trasplantada, cuando todavía es pequeña y débil. Pueden roerla por el cuello, o introducirse dentro del tallo y crear galerías. Los pulgones (*Myzus persicae*) viven sobre las hojas y los brotes de tabaco creando una secreción que impregna toda la superficie de la planta. Esto impide un buen funcionamiento fisiológico de la planta y atrae a otros organismos parásitos, tales como hongos (Llanos, 1981).

La desinfección del suelo adquiere especial relevancia en el cultivo del tabaco, debido a las altas poblaciones de nematodos existentes. Las especies que generalmente parasitan en las raíces del tabaco, formando numerosos nudos o agallas y produciendo un marchitamiento general, son *Meloidogyne (incognita, arenaria y javanica)* y

Globodera tabacum. El control de nematodos debe hacerse con rotaciones, variedades resistentes, biofumigación y productos fitosanitarios (información obtenida de MARM).

Las enfermedades que más afectan al tabaco son la fusariosis, el oídio, la negrilla y la podredumbre de los semilleros. De los tratamientos en semillero son obligatorios los preventivos contra el moho azul (*Peronospora tabacina*). Las plantas atacadas presentan rodales amarillos en el haz de la hoja y corresponden con otras de color gris azulado en el envés, que pueden acabar necrosándose y formando agujeros (Llanos, 1981).

El trasplante

La base de un buen trasplante comienza por preparar el terreno de asiento mediante labores adecuadas y mejorar su sanidad, para que la plántula encuentre las condiciones que le permitan desarrollarse sin ningún tipo de obstáculos y con la menor parada posible en su crecimiento.

Las plantas a trasplantar, además de la sanidad necesaria en cualquier tipo de planta a utilizar, es importante en las plantas con cepellón su óptimo desarrollo radicular. Deberán plantarse alrededor de 18.000 plantas por hectárea en tabaco Virginia, adaptando la separación entre líneas a la posible incidencia de enfermedades y a la recolección mecanizada.

Las ventajas que ofrece el trasplante sobre caballón son las siguientes: la temperatura del suelo es superior a la conseguida en llano, los fertilizantes están concentrados en el volumen del suelo donde se va a producir el desarrollo radicular a lo largo del cultivo, el suelo está mullido, lo que facilita la aireación y fácil crecimiento de la raíz; en caso de encharcamiento del suelo, se evita la asfixia radicular y, en caso de lluvias abundantes, se propicia un fácil desagüe.

La fecha idónea de trasplante del tabaco Virginia en España debe estar comprendida entre la última semana de abril y la primera quincena de mayo (información obtenida del MARM).

Despunte y deshijado

Cuando las plantas están próximas a alcanzar su máximo desarrollo en altura se inicia la formación del ramillete de flores en el extremo superior del tallo. En esta fase del cultivo se usará una gran parte de sus reservas alimenticias y vitalidad, cosa que al agricultor no le interesa, por eso se lleva a cabo el despunte (Llanos, 1981). El despunte consiste en suprimir el ramo floral terminal para que así las hojas puedan aprovechar los jugos que aquél había de precisar. Se realiza bajo, suprimiendo con el botón floral apenas formado, varias de las hojas superiores (Llanos and Zubia, 1964).

La planta, después que se ha despuntado, reacciona produciendo yemas o brotes laterales que nacen en las axilas o ángulos de inserción de las hojas en el tallo. Estos ramilletes o brotes laterales, si se les dejase crecer, formarían otras tantas inflorescencias con las que la planta sustituiría la función del ramillete de flores terminal que se le ha cortado (Llanos, 1981). Por ello, es necesario suprimirlas para que no se aprovechen ellas del alimento que debe servir a las hojas de cosecha (Llanos and Zubia, 1964).

El modo clásico de despuntar y deshijar es manual, antes de que las yemas laterales crezcan en exceso. Esta operación habría que repetirla las veces precisas para mantener las plantas libres de rebrotes, pero actualmente, se emplean productos químicos para inhibir el desarrollo de las yemas laterales una vez despuntada la planta (Llanos, 1981). En este mismo momento se aplicará un producto de contacto mojando bien el corte del tallo y las axilas de las hojas, se repetirá esta operación a los 7 y 12 días con productos sistémicos localizados (información obtenida del MARM). Se han realizado estudios en los que se demuestra que herbicidas sistémicos como la pendimetalina (STOMP) son eficientes controlando los hijuelos y no afectan en el crecimiento y rendimiento de la planta (Yousafzai *et al.*, 2006).

La supresión del ramillete y de los brotes laterales provoca en la planta otra reacción secundaria consistente en un crecimiento suplementario de sus raíces. Como consecuencia, la planta absorbe más agua, acumulándose en las hojas y adquiriendo estas más peso y tamaño (Llanos, 1981).

El riego

En el cultivo del tabaco, el sistema más común de riego es por aspersión, fundamentalmente en las de pequeña dimensión (5-10 ha). En las grandes explotaciones, en cambio, se alternan los riegos por pívot y por aspersión y, en explotaciones muy aisladas, el riego se realiza por cañones.

Con independencia del sistema de riego empleado, regar bien significa dar a la planta el agua que necesita teniendo en cuenta, entre otros, los siguientes factores: suelo, lluvia, evaporación y fase de desarrollo de la planta. Es necesario considerar todos estos factores para determinar el caudal, la dosis, la frecuencia y el momento óptimo para realizar los riegos.

La dosis de riego ha de situarse en torno a los 20 l/m². Respecto a la frecuencia, ésta será mayor, aproximadamente del periodo del 15 de julio al 15 de agosto, donde la evapotranspiración es muy alta (información obtenida del MARM).

La fertilización

La búsqueda constante de los aumentos de producción por hectárea y de la calidad, hacen necesaria la aportación de elementos minerales, que dependerá del contenido de los mismos en los suelos que dedicamos al cultivo del tabaco. En el cultivo del tabaco, el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio tienen un papel importante, siendo definitorios en la calidad final del tabaco (información obtenida del MARM).

El nitrógeno es la base para obtener una cosecha cuantitativamente elevada. Los fertilizantes nitrogenados más corrientes para el tabaco son, entre los orgánicos, el estiércol, y entre los minerales, los nitratos, las sales amoniacales, la urea y los amonitratos. La acción del fósforo sobre el tabaco se reduce a acelerar el proceso de maduración de las hojas. La mejor fuente de fósforo para el tabaco son los superfosfatos (Llanos, 1981).

La primera aportación de fertilizantes se realizará lo más cerca posible del trasplante. El resto se irán haciendo a la vez que las labores. En el número total de unidades a aportar de los diferentes elementos minerales influyen factores como el tipo

de suelo, contenido en materia orgánica, climatología, labores preparatorias, posibles enfermedades, forma de regar y producción esperada. Una fertilización media en tabaco podría ser: Nitrógeno 80-120 kg/ha; Fósforo 40-50 kg/ha en forma de P_2O_5 ; Potasio: 250-300 kg/ha en forma de K_2O ; Magnesio: 60-80 kg/ha en forma de MgO (Información obtenida del MARM).

Huella de carbono

Los acuerdos internacionales y las evaluaciones científicas requieren una acción concreta para la reducción sustancial de los gases de efecto invernadero (GEI) mundiales. Una mejor comprensión de donde se deben reducir las emisiones de GEI a lo largo de las cadenas de suministro y el ciclo de vida de productos, se pueden calcular mediante el cálculo de la huella de carbono de los productos, este término hoy se utiliza comúnmente para la evaluación del ciclo de vida (ACV) (Espinoza-Orias *et al.*, 2011).

La Huella de Carbono es un término usado para describir la cantidad de GEI causados por una actividad en particular o entidad, y por lo tanto una forma de que las organizaciones e individuos evalúen su contribución al cambio climático (Guide PAS 2050). El etiquetado del carbono pronto puede ser un requisito previo para el comercio internacional de productos agrícolas (Deurer *et al.*, 2011).

"La huella de un producto" se refiere a las emisiones de gases de efecto invernadero de un producto durante su ciclo de vida, desde las materias primas en todas las etapas de la producción (o prestación de servicios), distribución, consumo y desechos o reciclado. Se incluyen los gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) (Guide PAS 2050).

La evaluación de los biocombustibles ha sido hasta ahora el principal factor en la demanda de energía y las emisiones de gases de efecto invernadero, a pesar de la importancia general del uso de agua para la ACV de productos agrícolas. Por lo que, al igual que con el carbono se han hecho estudios donde se ha calculado la huella del agua, evaluando en detalle el consumo de agua a lo largo de una cadena de producción y teniendo en cuenta las eficiencias de riego, los niveles de escasez de agua y el tipo de materia prima. El consumo de agua por lo tanto puede llegar a ser una preocupación importante (Faist *et al.*, 2011).

A parte de las estimaciones que se puedan hacer para saber la contribución al cambio climático de cada producto, hay estudios que calculan esta valoración cambiando aspectos del empaquetado del producto (Espinoza-Orias *et al.*, 2011). También se han realizado estudios en los que se comparan métodos de reciclaje de un producto, basados en el cálculo de la huella de carbono, por un lado la reparación y por otro la remanufacturación. Los productos que ya no pueden ser enviados a los vertederos son responsabilidad de los productores y tienen que tener en cuenta todas las etapas del ciclo de vida de los productos. Se ha identificado que la reparación tiene una huella de carbono menor que la remanufactura. Sin embargo, la reparación sólo extiende el ciclo de vida actual del producto, mientras que con la remanufactura se pueden utilizar hasta tres veces, y ofrece el producto con un nuevo ciclo de vida. Por lo tanto, la remanufactura es considerada como el método más preferido de la recuperación del producto en términos de emisiones de carbono y la eliminación sostenible de los residuos (Appleby *et al.*, 2010).

Metodología PAS 2050

La huella de carbono de los productos se puede calcular adoptando diferentes metodologías analíticas. Los cálculos también pueden ser afectados por los pocos datos disponibles y la incertidumbre sobre el valor de las variables clave. La combinación de estos dos factores reduce la validez de la comparación de la huella de carbono entre los productos y países (Plassmann *et al.*, 2010).

Para el cálculo de la Huella de Carbono la metodología más utilizada es la PAS 2050 (Publicly Available Specification 2050, 2008) desarrollada por el British Standard Institute (BSI), el departamento de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural del Reino Unido y la fundación Carbon Trust.

PAS 2050 puede ofrecer a las empresas la posibilidad de evaluar internamente el ciclo de vida de las emisiones de GEI de los productos, y puede ser un punto de referencia para medir y comunicar la reducción de emisiones. Para los clientes establece una mayor comprensión de cómo sus decisiones de compra impactan sobre las emisiones de gases de efecto invernadero.

La colaboración con los proveedores es fundamental para comprender el ciclo de vida del producto y de recogida de datos. Por lo general, las empresas conocen sus propios procesos de producción a fondo, sin embargo, más allá de los límites de la empresa, el conocimiento de los procesos, materiales, energía requerida y los residuos tienden a variar considerablemente.

Hay cinco pasos básicos para el cálculo de la Huella de Carbono de cualquier bien o servicio, según PAS 2050:

- Creación de un mapa de procesos (diagrama de flujo): Construir un mapa de procesos del ciclo de vida del producto, identificando todas las materias primas, materiales de desecho y los flujos de residuos, actividades y procesos que contribuyen. Sirve como una valiosa herramienta proporcionando un punto de partida para entrevistas y una referencia gráfica para guiar a la recopilación de datos y el cálculo de la huella.

Hay dos tipos de procesos, el *Business-to-Consumer* (B2C) que tiene en cuenta todas las materias primas, pasando por la fabricación, distribución y venta al por menor, para uso de los consumidores y, finalmente, eliminación y/o reciclaje. Y el *Business-to-Business* (B2B) que para la huella de carbono en el punto en el cual se entrega el producto a otro fabricante, excluyendo etapas adicionales de fabricación, la distribución del producto final, uso por el consumidor y la eliminación y/o reciclaje.

- Comprobación de los límites y la priorización: Confirmar las fronteras para ayudar a priorizar los esfuerzos. La principal clave de los límites del sistema es incluir todos los "materiales" de las emisiones generadas como consecuencia directa o indirecta. PAS 2050 permite que las emisiones inmateriales procedentes de una sola fuente que generen menos del 1% de las emisiones totales sean excluidas. Sin embargo, la proporción total de emisiones de las fuentes inmateriales no puede superar el 5% de la huella de carbono total del producto.

- Recopilación de datos: Recopilar datos sobre las cantidades de materiales, actividades y los factores de emisión en todas las etapas del ciclo de vida. Los datos de buena calidad ayudan a construir una huella que representa el ciclo de vida de un producto "típico", durante un período de tiempo definido, reconociendo las variaciones en geografía, distancia y materiales.

Hay dos tipos de datos que son necesarios para el cálculo de la huella de carbono: los datos de actividad y factores de emisión. Los datos de actividad se refieren a todas las cantidades de materia y energía implicadas en el ciclo de vida del producto (mass/volume/kWh/km). Los factores de emisión proporcionan el vínculo que convierte a éstas cantidades en las emisiones de gases de efecto invernadero resultantes (CO₂e/unit).

En la toma de datos hay algunos factores que pueden ser difíciles de cuantificar o que no se sepa cómo hacerlo, como por ejemplo los productos que se forman a partir de origen vegetal que en realidad almacenan carbono, creando emisiones “negativas”. Las emisiones de CO₂ procedentes del ganado, el estiércol o los suelos deben ser incluidos. Cualquier emisión de GEI derivada de cualquier medio de transporte necesaria durante la producción de los productos y sus materias primas se incluyen en la evaluación de la huella de carbono, teniendo en cuenta su creación y transporte. También hay que tener en cuenta cuando el proceso del ciclo de vida del producto contribuye a generar más de un producto útil.

- Cálculo de la huella: La ecuación de la huella de carbono es el producto de la suma de todos los materiales, energía y residuos en todas las actividades en el ciclo de vida del producto, multiplicado por sus factores de emisión. Consiste simplemente en multiplicar los datos de actividad por el adecuado factor de emisión.

El PAS 2050 evalúa el impacto de las emisiones de gases de efecto invernadero derivados del ciclo de vida de productos durante un período de 100 años después de la formación del producto.

- Comprobación de la incertidumbre (opcional): Evaluación de la exactitud y precisión de una entrada o cálculo. El análisis de la incertidumbre en la huella de carbono es un grado de precisión. Las empresas pueden beneficiarse de la evaluación de la incertidumbre de su huella de carbono con el objetivo de medir y minimizar la incertidumbre en el resultado de la huella y para mejorar la confianza en las comparaciones de huellas y cualquier decisión que se haga sobre la base de la huella.

En conclusión la huella de carbono de los productos puede ser valiosa para ayudar a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. El ejercicio de la huella

proporciona una base sobre la manera de medir las reducciones del futuro y ayuda a identificar oportunidades para reducir las emisiones en todas las fases del ciclo de vida del producto. El análisis ofrece una manera de comprometerse con los proveedores, distribuidores, minoristas y los consumidores sobre la manera de reducir las emisiones (Guide PAS 2050).

OBJETIVOS

- 1.- Caracterizar morfológicamente, en distintos estadios fenológicos, las plantas de tabaco cultivadas en condiciones de campo de las variedades Virginia Gold y Havana 503-B transformadas con el gen de la tiorredoxina f y compararlo con las plantas control sin transformar.
- 2.- Comparar el contenido de almidón de las plantas transformadas respecto a las no transformadas, con el fin de valorar el uso de dichas plantas como posible cultivo energético.
- 3.- Estimar la Huella de Carbono producida por el tabaco durante su cultivo y compararla con la de otros cultivos energéticos.

Material vegetal y obtención de las plántulas de tabaco

En este ensayo se han utilizado las variedades comerciales de tabaco Havana 503-B y Virginia Gold. Estas variedades comerciales se han utilizado como control, y también sus correspondientes líneas transformadas con el gen de la tiorredoxina f. Se han denominado de la siguiente manera; 503, VIR, 503-T y VIR-T. Las que llevan la letra T, corresponden a las líneas transformadas.

Las plantas de tabaco transformadas procedían de estudios anteriores que se habían realizado en el Instituto de Agrobiotecnología (Villanueva, 2011; Sáenz de Cabezón, 2011) y se habían obtenido mediante transformación del genoma del cloroplasto (transformación plastidial).

La siembra se realizó el día 10 de marzo. Se utilizaron pequeñas bandejas donde se sembraron las semillas sobre un lecho de vermiculita. Se utilizó este sustrato por su alta capacidad de retener la humedad, factor importante en la germinación. El sustrato se humedeció con solución Hoagland al 0,6x. La concentración fue baja para evitar que las plantas se quemasen. Las bandejas se cubrieron con un film transparente para que no perdiesen humedad y a su vez permitir la entrada de la luz. Estas se mantuvieron en un fitotrón a humedad y temperatura controlada.

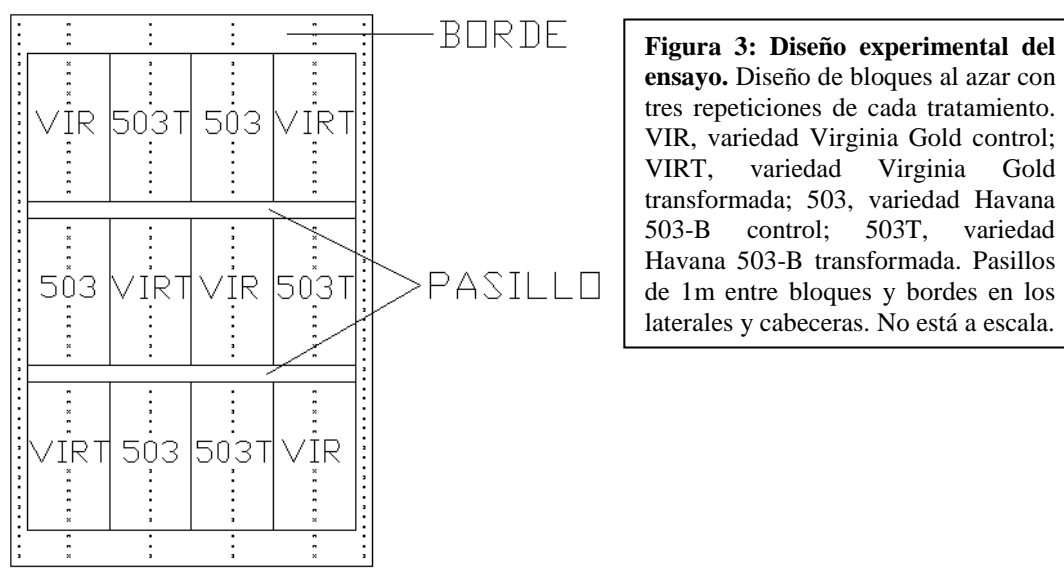
Cuando las semillas germinaron, las plántulas se individualizaron en bandejas de poliestireno expandido con alveolos de 3 x 3 cm. Esta operación se realizó el día 17 de marzo con la ayuda de unas pinzas y procurando no dañar a las plántulas. Se utilizó turba como sustrato y se siguió regando con solución Hoagland 0,6x alternándolo con agua, ya que comenzaron a aparecer síntomas de quemaduras en algunas hojas. También se les pulverizaba con Hoagland 0,6x sobre las hojas como fertilizante. Las bandejas de porexpan se trasladaron al invernadero del Instituto de Agrobiotecnología el 5 de abril, utilizándose en adelante riego por aspersión.

El 29 de abril se trasladaron a la finca experimental del ITG en Sartaguda, donde se realizó la plantación con ayuda de diversos operarios de la finca. A partir de este momento el laboreo, el abonado, el tratamiento con fitosanitarios, el riego y el

seguimiento de las plantas se quedó en manos de los técnicos de la finca, debiendo ser el idéntico al que se hace en el cultivo tradicional de tabaco.

Diseño experimental del ensayo

Para realizar este ensayo se utilizaron 180 plantas. El marco de plantación fue de 90 cm entre líneas y 60 cm entre plantas dentro de cada línea (densidad de plantación: 18.500 plantas/ha). El diseño experimental del ensayo fue de bloques al azar, con tres bloques formados cada uno de ellos por 15 plantas de cada una de las variedades, como se puede ver en la Figura 3.



En los bordes se utilizaron plantas de las variedades control, indistintamente de la variedad VIR y de la variedad 503, una fila a cada lado de la parcela y 3 plantas en los cabezales. Se respetaron pasillos de 1 m entre cada bloque para facilitar las labores y controles, sin embargo, en los bordes no se realizaron estos pasillos para impedir la contaminación del ensayo (Figura 3). Finalmente se procedió al etiquetado de los diferentes bloques y variedades.

Desarrollo y manejo del cultivo en campo

A los pocos días de la plantación cayó una tormenta en la que el abundante aporte de agua afectó al cultivo impidiendo su crecimiento adecuado. Esto se pudo observar, además de en el escaso crecimiento de las plantas, en la pérdida de alguna de

ellas. Por ello, el 12 de mayo, se decidió reponer las faltas con plantas procedentes de los semilleros que todavía se guardaban en la finca.

La labor de descabezar y deshijar se realizó de una manera escalonada y desordenada. La primera vez, el 27 de junio se eliminaron las primeras inflorescencias (que no se eliminaron en todas las plantas) manteniendo los hijuelos y sin aplicar el tratamiento químico. Esto hizo que en pocos días volviesen a aparecer flores.

Por ello, el 7 de julio, cuando aproximadamente el 50% de la flor estaba abierta, se realizó el pinzado de las inflorescencias (descabezado) y se quitaron los hijuelos. A estos últimos se les realizó un deshijado químico mediante un tratamiento con STOMP (Pendimetalina 33%), aplicado con un pulverizador a chorrillo con una concentración del 0,1%, para inhibir el rebrote y así evitar ramificaciones.

Con este tratamiento no se obtuvo la respuesta esperada ya que volvieron a rebrotar los hijuelos. Por ello, el 28 de julio se repitió la anterior operación, descabezar y deshijar, pero aplicando una mayor concentración de STOMP, al 1%.

El tabaco es un cultivo que precisa de mucho nitrógeno, por ello se aportaron 150 UF/ha en tres aplicaciones diferentes. El riego se realizó en función de las condiciones meteorológicas y del estado del cultivo. Después de la plantación hubo días de lluvia por lo que, hasta junio no fue necesario el riego. Una vez de que comenzasen los calores de verano y descendiesen los días de lluvia, se empezó con el riego y poco a poco disminuyó el espaciamiento entre ellos, regando aproximadamente todas las semanas. El riego era por inundación.

En cuanto a plagas y enfermedades, se observaron algunos focos de pulgón, los cuales fueron tratados inmediatamente. También se realizaron tratamientos contra orugas y gusanos, para moho azul y para otros tipos de hongos. Los productos fitosanitarios empleados para ello fueron los siguientes; Rimi (Clorpirifos 1%), Decis Protech (Deltametrin 1,5%), Ortiva (Azoxistrobin 25%), Karate (Lambda Cihalotrin 2,5%), Mancopec (Mancozeb 80%) y Sumifive (Esfenvalerato 5%).

La cosecha se realizó en dos fechas diferentes para establecer el momento óptimo de la misma. En la primera, se cosecharon todas las hojas de dos plantas por repetición. En la segunda, se cosecharon las hojas de la misma manera que en la primera

y a parte se cogieron tallos; de las variedades control un tallo por repetición y de las variedades transgénicas dos tallos por repetición.

Seguimiento del cultivo. Determinación del contenido en clorofila y parámetros morfológicos.

Se programó un calendario con las visitas que se realizarían a campo y con las tareas que se desempeñarían en cada uno de los días. Debido a condiciones atmosféricas que cambiaron el desarrollo normal de las plantas y labores que retrasaron el crecimiento adecuado del mismo, no se pudo llevar a cabo este calendario tal y como se había programado.

A continuación se detallan las tareas que se llevaron a cabo en cada uno de los días. Los días se contabilizan a partir del día de trasplante, es decir, días post-trasplante (PT).

La primera visita, el 12 de mayo, se hizo con la intención de realizar la medición de la clorofila, pero se vio que el tamaño de las plantas era muy pequeño. Por ello, se aplazó esta medición hasta que las plantas adquiriesen un tamaño más apropiado, que fue el 15 de junio (52 días PT). La cantidad de clorofila se midió en hojas alternas (tres medidas por hoja) de tres plantas por bloque y variedad usando el medidor SPAD-502 Plus (Minolta Konica Co. Ltd., Japan) (Kashiwagi *et al.*, 2006).

La tercera visita se realizó el 5 de julio (72 días PT), cuando la mayor parte de las plantas habían florecido. Se realizó la medición de clorofila, la altura de las plantas y se contabilizó el número de hojas.

La cuarta visita se había programado con la fecha del corte de la inflorescencia pero fue una labor que no se hizo con mucha precisión, por lo que la visita se realizó el 29 de julio (96 días PT). Al igual que en la vez anterior, se midió la altura y la clorofila, y se contó nuevamente el número de hojas.

Las otras dos visitas restantes se realizaron coincidiendo con las fechas de cosecha. La primera el 11 de agosto (109 días PT), donde se cosecharon sólo hojas y la segunda el 23 de agosto (121 días PT), donde se cosecharon tanto las hojas como los tallos.

Peso específico de hojas

Con el fin de calcular el peso específico de hojas (SLW), en la primera cosecha, se muestrearon cuatro discos de cada hoja cosechada con la ayuda de un sacabocados de diámetro conocido. Los discos obtenidos de las hojas de cada planta constituyeron una única muestra. Estas fueron introducidas en un sobre y pesadas (peso fresco), posteriormente se secaron en una estufa a 80°C durante tres días para obtener el peso seco (PS). También se anotó el diámetro del sacabocados utilizado en cada caso ($r_{\text{sacabocados}}$), el número de discos introducidos en el sobre (N) y el peso del mismo (P_{sobre}). Con estos datos, se calculo el SLW (Specific Leaf Weight), que son los miligramos de peso seco por centímetro cuadrado de hoja (mg/cm^2) (Figura 4).

$$SLW = \frac{(PS - P_{\text{sobre}})}{N * \pi * r_{\text{sacabocados}}^2}$$

Figura 4: Fórmula utilizada para el cálculo del peso específico de hojas (SLW).

Determinación del contenido de almidón en hoja

Para las mediciones de almidón se tomaron discos de todas las hojas de las plantas de tabaco cosechadas usando un sacabocados, a los 109 y 121 días post trasplante (los discos se sacaron de las inter-nervaciones de todas las hojas, tanto transformadas como no transformadas). Como se ha indicado en la descripción de la cosecha, se recogían todas las hojas de cada planta (dos plantas por cada bloque y variedad) y los discos de cada una de las plantas que se sacaban correspondían a una muestra. Por lo que, se trabajo con 6 muestras de cada variedad, que sumaba un total de 24 muestras en cada cosecha.

Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Todas ellas siguieron el mismo procedimiento de extracción y cuantificación de almidón.

Las muestras fueron pulverizadas en el *Mikro-dismembrator U* (B Braun Biotech International) en presencia de nitrógeno líquido. Se homogeneizaron unos 200 mg de material pulverizado (como no era un dato concreto, se anotó la cantidad exacta de cada muestra, para al final del proceso poder calcular la cantidad de almidón en cada una de ellas) en 500 μl de etanol al 100% con el *Ultra-Turrax* (IKA, Werke Staufen,

Germany). Se volvieron a añadir otros 500 μ l de etanol al 80% y se procedió a la extracción de azúcares solubles a 70°C durante 90 minutos y en agitación (*Termomixer* a 1100 rpm). Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante que contenía los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), y se prosiguió con el pellet que se lavó con 1 ml de etanol al 80% y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm y temperatura ambiente.

Para la solubilización del almidón, se desechó el sobrenadante y se secaron los pellets durante 20 minutos a 45°C. A continuación, se resuspendió el pellet en 400 μ l de KOH 0,2N y se incubaron las muestras durante 60 minutos a 95°C en agitación (*Termomixer* a 1100 rpm) para disolver la muestra. Se ajustó el pH de la muestra a 4,6-4,8 añadiendo 70 μ l de ácido acético 1N. Por último, se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

La determinación del contenido en almidón se realizó con el sobrenadante recogido de la solubilización del polisacárido, siguiendo las indicaciones de un kit comercial de bioanálisis enzimático (Starch de Boehringer Mannheim, suministrado por R-BIOFARM). Tras precalentar a 45°C el sobrenadante, se cogió una alícuota del mismo (25 μ l) y se le añadió 25 μ l del buffer 1, que contiene enzimas amiloglicosidasas, hidrolizando los polisacáridos en D-glucosa. Además, se prepararon blancos con 25 μ l de agua, que sirvieron para cuantificar posibles glucosas que no procedieran de la hidrólisis del almidón. La mezcla se incubó 45 minutos a 56°C y después se diluyó en una proporción de 1:5, añadiéndole 200 μ l de agua. A continuación, se preparó en una placa microtiter una mezcla constituida por las digestiones y los blancos por un lado, y por otro un mix formado por 127,5 μ l de buffer 2 (que contiene NADP y ATP) y 2,5 μ l de buffer 3 (que contiene hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Con cada muestra se utilizaron dos concentraciones diferentes. Finalmente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro de la cantidad de glucosa en cada muestra, midiendo la absorbancia a 340 nm.

Para poder calcular los micromoles de almidón que hay por gramo de peso fresco (μ mol/gFW) a parte del dato que se obtiene en el espectrofotómetro de la muestra y del blanco, se deben conocer la cantidad inicial de la muestra, el factor de dilución, el volumen de muestra que se añade en la placa microtiter y el volumen total de la reacción.

Una vez analizados los resultados, hubo algunos casos en los que se tuvo que volver a repetir el proceso de la determinación del almidón, debido a que las absorbancias entre las dos concentraciones diferentes de la misma muestra daban valores muy dispares. En la mayoría de las veces fue consecuencia de un mal pipeteo, ya que eran cantidades muy pequeñas.

Rendimiento en la obtención de bioetanol

En la Figura 5 se detalla la ecuación utilizada para el cálculo de los litros de etanol por hectárea estimados en el cultivo del tabaco. Se parte de los μmol de glucosa por g de peso fresco y se pasan a gramos de azúcar por gramo de peso fresco, multiplicándolos por el peso molecular. Para obtener el rendimiento por tonelada del cultivo (L EtOH/t), se multiplica por el rendimiento en la fermentación y el factor de conversión de los azúcares en etanol (datos facilitados por el CENER). Por último, para estimar los litros de etanol por hectárea que se podrán obtener con este cultivo, se multiplica por el rendimiento del cultivo por hectárea.

$$\frac{\mu\text{mol glucosa}}{\text{g Peso fresco}} * \frac{180 \text{ g}}{\text{mol}} * \frac{1 \text{ mol}}{10^6 \mu\text{mol}} * 0,95 * \frac{0,645 \text{ L etanol}}{\text{kg de azucar}} * \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} * \frac{1.000.000 \text{ g}}{1 \text{ T}} * \frac{50 \text{ T}}{\text{ha}} = \frac{\text{L etanol}}{\text{ha}}$$

Figura 5: Fórmula utilizada para el cálculo del potencial fermentador de las plantas de tabaco de las variedades Virginia Gold y Havana 503-B transformadas con la Trxf.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevo a cabo con el programa estadístico SPSS. Para ello se realizaron análisis de la varianza (ANOVAs) en los parámetros de clorofila, altura, número de hojas, peso específico de la hoja y almidón con un nivel de significación del 0,05. El estadístico ANOVA, únicamente nos permite contrastar la hipótesis general de que los valores promedio comparados son iguales. Al rechazar esa hipótesis, sabemos que las medias poblacionales comparadas no son iguales, pero no sabemos dónde en concreto se encuentran las diferencias entre las poblaciones. Para saber qué media difiere de otra, se debe utilizar un tipo particular de contraste para comparaciones múltiples. En este caso se ha seleccionado el test de Tukey.

Los diferentes ANOVAs realizados se detallan en el Anexo 1. Con el contenido en almidón se tuvieron que realizar más de una ANOVA. Inicialmente se realizó un ANOVA trifactorial, donde los factores fijos eran los bloques, las cosechas y las variedades. Como todas las interacciones fueron significativas, se decidió hacer otra ANOVA bifactorial, donde los factores eran los bloques y las variedades. Pero las interacciones seguían siendo significativas, por lo que por último se analizó una sola variable que era la de la variedad. En el caso de número de hojas, se realizó un análisis trifactorial y como todas las interacciones fueron no significativas se utilizó esta ANOVA para interpretar los datos. Con el parámetro de la altura y del peso específico, sucedió lo mismo que con el número de hojas por lo que, se procedió de la misma manera. La clorofila fue analizada con un ANOVA bifactorial (bloque y variedad) para la segunda fecha de toma de datos (72 días PT) y unifactorial para el resto.

Huella de carbono

La Huella de Carbono que se realizó en este estudio, corresponde a la huella producida durante el cultivo del tabaco, “Business-to-Business” (B2B). Es decir, solo se tuvieron en cuenta las materias primas requeridas durante el proceso, así todo lo que sigue a la cosecha se ignoró (parte industrial), como se puede ver en el diagrama de flujo (Figura 6). Además esta parte del estudio en este trabajo no repercute porque las hojas tras la cosecha irían directas a la planta de producción de bioetanol.

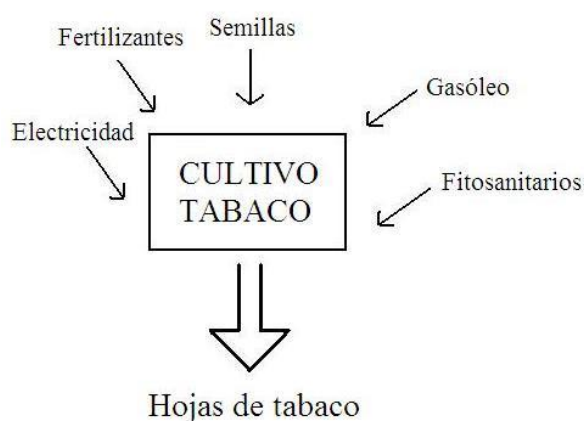


Figura 6: Esquema del diagrama de flujo de las materias primas que se emplean en el cultivo del tabaco. Partiendo como base de este mapa de procesos se realizaron las encuestas.

Para dicho estudio, la principal información que se necesita son las materias primas utilizadas durante el proceso, como son los fitosanitarios, los fertilizantes, las semillas y el consumo de gasóleo, principalmente. Toda esta información se obtuvo

gracias a la colaboración de dos agricultores que participaron en la aportación de datos y al gerente de la Cooperativa Tabacalera de Murieta que ayudo como intermediario.

Para la toma de datos se prepararon unas plantillas con una serie de tablas (Anexo 2) donde se debía rellenar lo señalado con los datos propios de los agricultores. Tales como, superficie cultivada, producción obtenida, cantidad de semillas utilizadas, fertilizantes y fitosanitarios aportados, combustible empleado para realizar las labores, etc.

Estos datos fueron procesados en función de cada parámetro, se llevaron a cabo diversos procedimientos y fueron multiplicados por factores de conversión hasta obtener la estimación del valor de los kg de CO₂ emitidos en cada caso. Los gases que se tuvieron en cuenta a la hora de calcular las emisiones fueron el CO₂, CH₄ y N₂O, en cada caso dependiendo del factor que se estaba calculando cada gas tenía un valor u otro. Toda esta información fue facilitada por el Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias –INTIA- (antiguo Instituto Técnico y de Gestión Agrícola –ITGA-).

Las emisiones se dividen en tres grupos, las emisiones directas producidas por el parámetro estudiado, las indirectas y las emitidas a causa de su transporte. Dependiendo del parámetro, tendrá emisiones directas, indirectas o ambas. La suma de todas ellas nos dará el valor total de las emisiones ocasionas hasta la obtención de las hojas de tabaco listas para producir bioetanol. Las emisiones producidas por el transporte de las materias primas, se han ignorado debido a la falta de información acerca de su origen.

RESULTADOS

Desarrollo vegetativo del cultivo (altura, nº hojas, clorofila)

La plantación de tabaco se realizó utilizando las plantas que más desarrolladas y mejor aspecto tenían. Debido a la tormenta que cayó a los pocos días de realizar la plantación se vieron afectadas algunas plantas reduciendo su crecimiento respecto a las demás. Los síntomas que esto acarreó en algunas de las plantas, amarilleamiento y reducción del tamaño, fueron arrastrándose durante todo el cultivo.

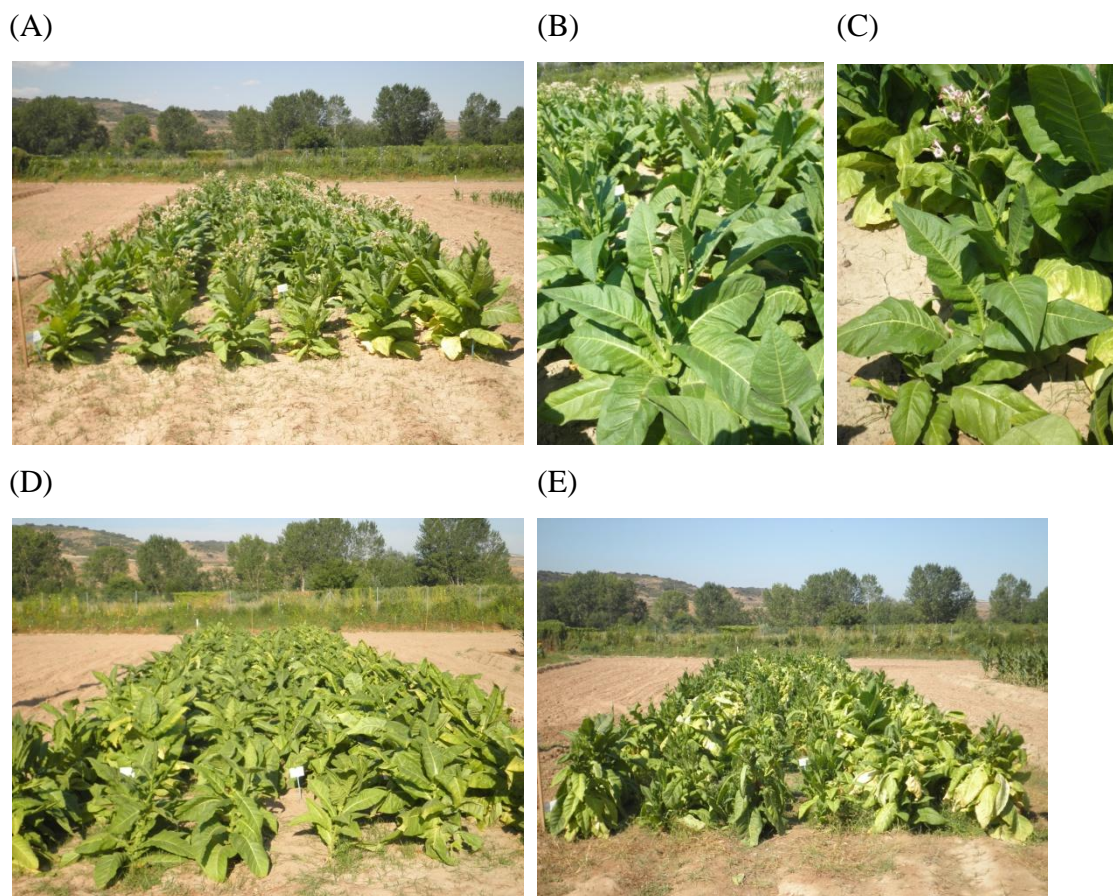


Figura 7: Imágenes del desarrollo del cultivo. (A) Pinzado escalonado de la inflorescencia, se aprecian plantas a las que se les ha realizado el descabezado y otras a las que no. (B) Corte de la inflorescencia y posterior rebrote. (C) Postura inclinada que cogieron las plantas. (D) Desarrollo vegetativo similar en las dos variedades a los 96 días PT. (E) Situación del cultivo el día de la segunda cosecha, se aprecia un color más amarillento de la variedad Virginia Gold, debido a la entrada en senescencia.

Por otro lado, a muchas de las plantas se les realizó el pinzado de la inflorescencia sin realizar el deshijado químico (Figuras 7A y B), desarrollándose en

demasiá los brotes laterales y llegando a florecer algunos de ellos. Por ello, algunas de estas plantas cogieron una postura inclinada (Figura 7C).

A lo largo del cultivo las dos variedades se desarrollaron a la vez (Figura 7D), incluso se podría decir que al inicio, tras el trasplante, la variedad Havana 503-B era la que más adelantada estaba. Sin embargo, al final del cultivo fue la variedad Virginia Gold la que presentaba más síntomas de senescencia. Con esto, se intuye que la variedad Virginia Gold es más temprana que la Havana 503-B (Figura 7E). Como más adelante se explica también está justificado con el nivel de clorofila en cada variedad.

A lo largo del cultivo se fueron analizando diferentes parámetros fenológicos como son la clorofila, la altura de las plantas y el número de hojas que tenía cada una.

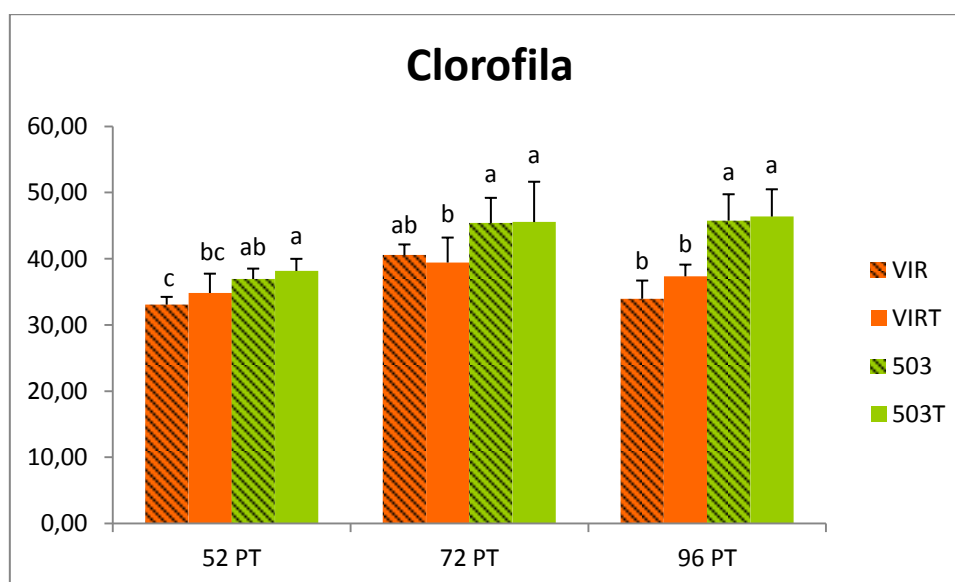


Figura 8: Nivel de clorofila de las plantas de tabaco transformadas y no transformadas de las variedades Virginia Gold y Havana 503-B, a los 52, 72 y 96 días post trasplante (PT), a razón de 3 medidas por hoja, en hojas alternas de cada planta. Los datos representan la media de nueve plantas, tanto en las transformadas como en las no transformadas de las dos variedades, acompañadas del error estándar.

En la Figura 8 se observa la evolución de la clorofila a lo largo del cultivo. En esta gráfica se han realizado tres ANOVAs independientes, uno para cada una de las fechas analizadas, por lo que no se pueden comparar los valores entre las diferentes fechas de tomas de datos.

Dentro de cada fecha, se puede observar que no hay diferencias significativas en el contenido en clorofila entre las dos líneas de la misma variedad, es decir entre las

transformadas y las control, tanto en las Virginia Gold como en las Havana 503-B. Esta ausencia de diferencias en el nivel de clorofila dentro de cada variedad se observa en todas las fechas en las que se ha realizado la toma de datos (Figura 8).

Sin embargo, las diferencias en el contenido en clorofila entre variedades (Virginia Gold *versus* Havana 503-B) son significativas en todas las fechas, aumentando las diferencias a medida que aumenta la edad de la planta (Figura 8). Esto indica que los niveles de clorofila difieren entre estas variedades. Además, estas diferencias aparte de ser varietales pueden ser debidas al estado fenológico de cada variedad, ya que la Havana 503-B es más tardía.

Esto se puede apreciar en la tendencia que tienen los valores de cada variedad por separado (Figura 8), ya que en la variedad Virginia Gold (transformadas y control), de la primera fecha a la segunda aumenta el nivel de clorofila pero en la tercera fecha desciende, hecho que nos indica el aumento de los niveles de clorofila conforme se desarrolla el cultivo y el comienzo de la senescencia con el descenso de los mismos. En Havana 503-B por el contrario, de la primera a la segunda fecha aumenta el contenido en clorofila pero en la tercera fecha lejos de descender se mantiene igual, incluso aumentando un poco esos valores. Indicando el estado fenológico de plena madurez y justificando su desarrollo más tardío.

Por otro lado, mencionar que las diferencias entre variedades no ocurren estrictamente en todos los casos, ya que en la primera toma de datos (52 días PT) no hubo diferencias significativas entre la VIRT y la 503. En la segunda toma de datos (72 días PT) tampoco hubo diferencias significativas entre las plantas de Havana 503-B (control y transformada) y la control de Virginia Gold (Figura 8).

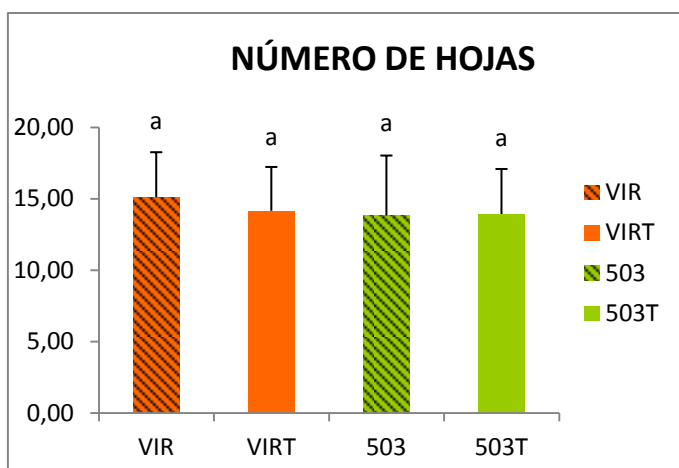


Figura 9: Número medio de hojas de las plantas de tabaco transformadas y no transformadas de la variedad Virginia Gold y Havana 503-B, a los 72 y 96 días PT. Los datos representan la media de nueve plantas, tanto en las transformadas como en las no transformadas de las dos variedades, acompañadas del error estándar.

Como se puede apreciar en la Figura 9, no se han encontrado diferencias significativas en el número de hojas de las plantas. Todas las variedades muestran un número similar de hojas. Destacar que no se han comparado el número de hojas en diferentes fechas debido al corte excesivo de inflorescencia que se produjo, ya que los datos que se obtuvieron, presentaban un menor número de hojas conforme avanzaba el desarrollo de las plantas. Es por ello, por lo que se ha representado la gráfica con un número medio de hojas correspondiente a las dos fechas de tomas de datos, considerando que el corte de la inflorescencia se hizo con un mismo criterio.

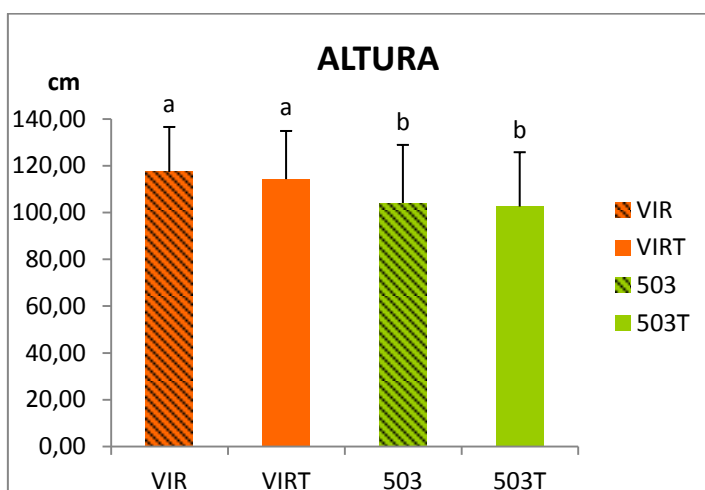


Figura 10: Altura media expresada en centímetros de las plantas de tabaco transformadas y no transformadas de la variedad Virginia Gold y Havana 503-B, a lo largo de todo el cultivo. Los datos representan la media de nueve plantas, tanto en las transformadas como en las no transformadas de las dos variedades, acompañadas del error estándar.

En cuanto a la altura, no se han encontrado diferencias significativas dentro de cada variedad, es decir, que no hay diferencias entre la variedad control y su transgénica. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas entre la variedad Virginia Gold y Havana 503-B, probablemente motivadas por diferencias varietales (Figura 10).

Al igual que ocurrió en el parámetro de número de hojas, en la altura tampoco se pueden comparar los datos obtenidos en dos fechas diferentes, ya que esta disminuye a lo largo del tiempo, a causa del corte excesivo de la inflorescencia.

Por tanto, las plantas transformadas con Trxf no desarrollan ningún rasgo fenotípico característico, lo que indica que la expresión de esta proteína es fenotípicamente neutral, al menos en las condiciones de cultivo que se ha desarrollado este trabajo y en los parámetros que se han estudiado (altura, número de hojas y contenido en clorofila). En todo caso se podría decir que en la variedad Virginia Gold la sobreexpresión de Trxf produce un ligero retraso en la senescencia de la misma, si bien habría que realizar más ensayos para poderlo confirmar.

Peso específico de las hojas de tabaco

Con el fin de ver si existían diferencias en el peso específico de hojas de tabaco entre plantas transformadas y no transformadas, se secaron discos de hojas muestreadas en la primera cosecha y se calculó dicho parámetro. Estos resultados están expuestos en la Figura 11, donde se observa que hay diferencias significativas dentro de la variedad Havana 503-B entre las plantas que expresan la Trxf y las plantas control, llegando a ser hasta un 21,75% más. En cambio, dentro de la variedad Virginia Gold las diferencias entre plantas transformadas y control no son significativas, si bien se observa un ligero aumento del peso específico en las hojas de plantas transformadas (Figura 11).

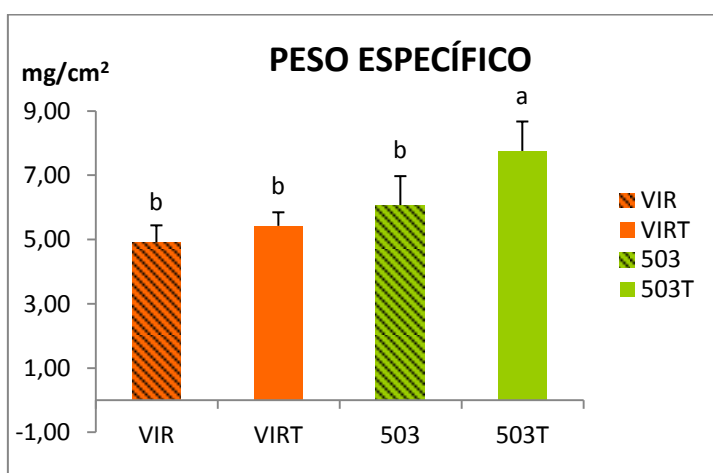


Figura 11: Peso específico de la hoja, expresado en mg de peso seco por cm². Los datos representan la media de seis plantas, tanto en las variedades transformadas como en las no transformadas, de la primera cosecha, acompañadas del error estándar.

Acumulación de almidón en las hojas de tabaco

Con el propósito de establecer el momento óptimo de cosecha de las plantas, se determinó la concentración de almidón en dos fechas diferentes, 109 días PT (11 de agosto) y 121 días PT (23 de agosto).

Como se puede observar en la Figura 12, la cantidad de almidón acumulada en las plantas de la primera cosecha (109 días PT), en general, es mucho mayor que lo acumulado en la segunda cosecha (121 días PT). Más de 4 veces más en las variedades Virginia Gold y más de 2 veces más en las Havana 503-B. Por otro lado, dentro de una misma cosecha, los niveles de almidón en hojas de Havana 503-B son mayores que los de la variedad Virginia Gold. Esto podría ser debido a que la variedad Virginia Gold es más temprana que la Havana 503-B, entrando antes en senescencia, y produciéndose una merma en la producción de almidón.

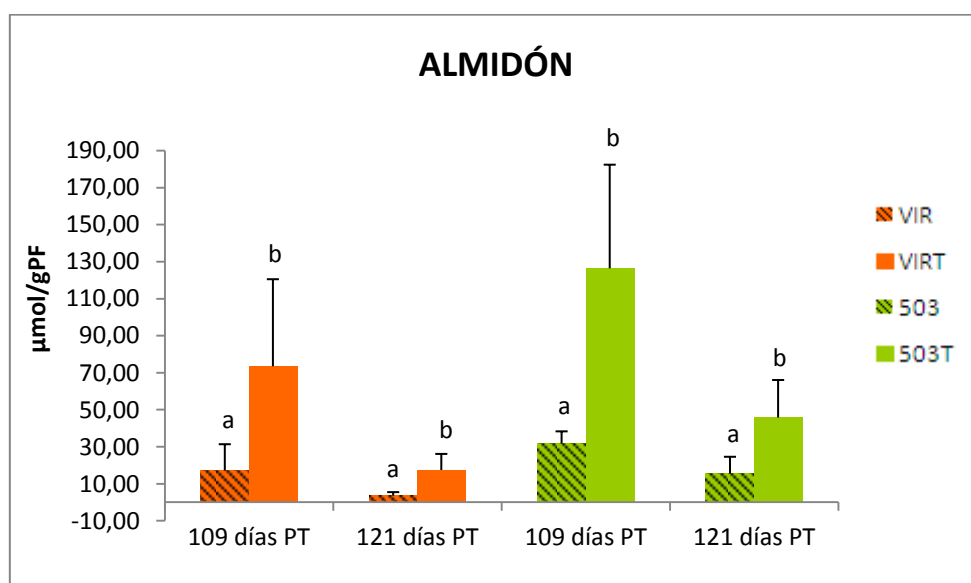


Figura 12: Comparación de los μmol de glucosa por g de peso fresco entre plantas transformadas y no transformadas de cada variedad en la primera y segunda cosecha. Los datos representan la media de 6 plantas, acompañadas del error estándar.

Las plantas transformadas con Trxf han llegado a acumular hasta un 327%, 386%, 297% y 194% más de almidón que las que no fueron transformadas (datos correspondientes a la primera cosecha de Virginia Gold, segunda cosecha de Virginia Gold, primera cosecha de Havana 503-B y segunda cosecha de Havana 503-B, respectivamente) (Figura 12).

En la primera cosecha, la variedad Virginia Gold transformada había acumulado 4,26 veces más almidón que la no transformada. En el caso de la Havana 503-B esa diferencia es de 3,97. Si se analiza la diferencia entre las dos variedades, se ve que la cantidad de almidón en las plantas control es de 1,85 veces más en la Havana 503-B que en Virginia Gold. En las plantas transformadas, Havana 503-B le supera en 1,72 (503T: 126,43 μmol glucosa/g PF; VIRT: 73,53 μmol glucosa/g PF).

En la segunda cosecha ocurre aproximadamente lo mismo, con la única diferencia que los valores acumulados descienden significativamente. En la variedad Virginia Gold la cantidad acumulada en la transformada es de 4,86 veces más que la no transformada, en la Havana 503-B en cambio, es de 2,94. Comparando las dos variedades, las plantas control presentan una diferencia de 4,34 veces más cantidad de almidón acumulada en Havana 503-B, y las transformadas 2,63 veces más.

En conclusión, se puede decir que las líneas transformadas de ambas variedades acumulan más almidón que las no transformadas, y que la variedad Havana 503-B acumula más almidón que la Virginia Gold. También decir, que en proporción la variedad Virginia Gold acumula más cantidad de almidón en la transformada que en la control, comparando con la Havana 503-B. Se podría asumir que las diferencias entre variedades son debidas a características varietales.

Por otro lado, mencionar que estos valores en general deberían haber sido mayores (Villanueva, 2011; Sáenz de Cabezón 2011), pero probablemente el mal desarrollo vegetativo del cultivo ha hecho que no se cumplan las expectativas. Esto es así, porque cuando se cortaron las inflorescencias y los hijuelos no se aplicó la cantidad de STOMP necesaria y al poco tiempo volvieron a rebrotar. Este suceso hace que en vez de acumularse el almidón en las hojas que se quiere, este vaya a parar a los nuevos rebrotes para reforzarlos, disminuyendo así la cantidad de almidón estimada en hoja.

Si se observa el peso específico de las hojas de tabaco (Figura 11) y el almidón que acumularon en la primera cosecha (Figura 12), se puede decir que existe una relación entre ellos. Es decir, que el peso específico aumenta en función del almidón que acumulan, a mayores cantidades de almidón mayor peso específico. Esta diferencia es significativa solo en el caso de la variedad Havana 503-B, es la variedad que más almidón acumula y la que mayor peso específico tiene. En la variedad Virginia Gold

dicha diferencia no es significativa, debido probablemente a que en el momento de la cosecha de las muestras, como se ha indicado anteriormente, esta variedad estaba mucho más adelantada y puede que esta senescencia hiciera reducir la cantidad de almidón.

Rendimiento en la obtención de bioetanol

La obtención de plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la tiorredoxina f para producir y acumular mayores contenidos de almidón en hoja, son una alternativa en la búsqueda de fuentes de materias primas para la producción de bioetanol. Además, el hecho de que no sea una planta comestible y que se le pueda dar un valor añadido reactivando el sector, convierte al tabaco en un cultivo con ventajas frente a los tradicionales, como los cereales. Con el fin de evaluar el potencial fermentador de las plantas de tabaco obtenidas en el presente trabajo, se han extrapolado los resultados obtenidos con la variedad de tabaco Virginia Gold y Havana 503-B y así obtener un indicador, litros de bioetanol por hectárea, que nos permita comparar este cultivo con otros cultivos energéticos.

En la Tabla 2 se refleja el rendimiento en bioetanol, es decir, el potencial fermentador de las hojas de tabaco de las distintas variedades estudiadas como materia prima para la producción de bioetanol. A la hora de realizar estos cálculos, se han tenido en cuenta los resultados de almidón obtenidos en la primera cosecha. Se estima que el rendimiento en la fermentación de los azúcares es del 95%, considerando un valor de conversión en la producción de bioetanol de 0,645 L/kg de azúcar (datos facilitados por el Centro Nacional de Energías Renovables, CENER). Se considera también un rendimiento medio de 50 t/ha de hojas de tabaco (peso fresco), para estimar la producción de bioetanol por hectárea, tanto en plantas transformadas como en las control.

Tabla 2. Potencial fermentador de las plantas de tabaco de las variedades Virginia Gold y Havana 503-B transformadas con la Trxf.

	VIR	VIRT	503	503T
Almidón ($\mu\text{mol/gPF}$)	17,22	94,54	31,83	126,43
Rendimiento cultivo (L/t hoja)	1,90	10,43	3,51	13,94
L bioetanol/ha	94,97	521,36	175,53	697,22

En las dos variedades que se han ensayado se observa que los litros de bioetanol por hectárea que se pueden obtener con variedades transformadas son mayores que con

las no transformadas. A su vez, se aprecian diferencias entre las dos variedades analizadas en las dos variantes que se muestran (tanto transformadas como control), la variedad Havana 503-B produciría más bioetanol que la Virginia Gold, 697,22 L/ha frente a 521,36 L/ha, en las variedades transformadas (Tabla 2).

Huella de Carbono

Partiendo de los datos que nos facilitaron los agricultores, mediante unos factores de conversión, se estimaron los valores de kilogramos de carbono dióxido equivalente por hectárea (kg CO₂ eq/t) que aparecen en la Tabla 3. En las emisiones directas se observa que el único factor emisor es el gasoil, a consecuencia de las labores que se realizan para la preparación del terreno. Por otro lado, son importantes las emisiones del suelo, debido a los aportes de materia orgánica, la propia microfauna, etc. Las emisiones indirectas corresponden a las emitidas a la hora de producir cada uno de los factores, en este caso, los más destacados son las producidas por los fertilizantes nitrogenados y por la electricidad requerida en el riego. Las emisiones del transporte, solo se han tenido en cuenta las producidas por el propio agricultor al realizar las visitas rutinarias a campo.

Tabla 3. Huella de Carbono del tabaco en campo, expresado en kg CO₂ Eq/t. Emisiones totales y subdivisión en emisiones directas, indirectas y de transporte.

TABACO HUELLA EN CAMPO	EMISIONES DIRECTAS Kg CO2 Eq/t	EMISIONES INDIRECTAS Kg CO2 Eq/t	EMISIONES DEL TRANSPORTE Kg CO2 Eq/t	EMISIONES TOTALES	
				Kg CO2 Eq/t	%
Gasoil	64,49	12,11	0,00	76,60	9,9
Aceite	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
Fertilización N	0,00	139,81	0,00	139,81	18,1
Fertilización N orgánica	0,00	12,13	0,00	12,13	1,6
Fertilización P2O5	0,00	13,12	0,00	13,12	1,7
Fertilización K2O	0,00	5,69	0,00	5,69	0,7
Fitosanitarios (materia activa)	0,00	4,94	0,00	4,94	0,6
Semilla	0,00	0,21	0,00	0,21	0,0
Agua riego	0,00	186,84	0,00	186,84	24,1
Emisiones del suelo	316,07	0,00	0,00	316,07	40,8
Emisiones CO2 de la Urea	10,40	0,00	0,00	10,40	1,3
Emisiones quema rastrojo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
Emisiones coche del agricultor	0,00	3,97	4,37	8,34	1,1
Total	386,47	374,84	4,37	774,13	100,0

En el total, se han producido 774,13 kg CO₂ Eq/t de emisiones totales. El 40% de éstas corresponden a las emitidas por el suelo. El siguiente emisor más importante es el riego, debido a que es un cultivo que en esta zona precisa de agua. Estas emisiones corresponden a la electricidad que se requiere para el movimiento del agua, que variará dependiendo del sistema de riego que se emplee. Observando las emisiones producidas por las materias primas, se ve que los fertilizantes nitrogenados y el carburante son los factores que más emisiones producen. Esto es así, debido a que se realizan muchas labores para la preparación del terreno, cosa que consume mucho gasóleo. Por otro lado, el tabaco es un cultivo que requiere de bastante nitrógeno para su buen crecimiento, haciendo que estas emisiones sean muy importantes.

DISCUSIÓN

Hoy en día la producción y utilización de combustibles de origen agrícola (biocombustibles), son la alternativa a los combustibles fósiles, debido a la protección del medio ambiente, por razones políticas y económicas. La producción de bioetanol aumenta año tras año en todo el mundo y en especial en la UE, donde la normativa obligará en un corto-medio plazo a que el 10% de los carburantes se produzcan a partir de fuentes renovables (Hancsok *et al.*, 2011). En los últimos años se está trabajando en la búsqueda de especies no convencionales para su aprovechamiento energético, adaptadas a diferentes áreas geográficas, ya que los cultivos que se están utilizando actualmente para producir bioetanol (caña de azúcar y maíz) presentan el inconveniente de competir con el mercado alimentario (Tammisola, 2010). Una de estas especies alternativas podría ser el tabaco, cultivo con gran capacidad de producir biomasa verde que puede acumular almidón en las hojas, lo cual le convierte en una materia prima amilácea interesante para la producción de etanol. Además, mediante técnicas de ingeniería genética pueden mejorarse éste y otros cultivos para que aumenten su contenido de almidón, pudiéndose convertir en una alternativa a los cultivos tradicionales de tabaco y a los cultivos empleados actualmente para la producción de bioetanol.

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

En el presente estudio se han utilizado plantas de variedades comerciales de Virginia Gold y Havana 503-B, a los cuales ya se les había introducido la tiorredoxina f en el plastoma (Villanueva, 2011; Sáenz de Cabezón, 2011), y fueron cultivadas en campo, siendo la Virginia Gold una variedad con mayor biomasa que Havana 503-B.

Los niveles de clorofila variaron a lo largo del ciclo biológico del cultivo, obteniendo los niveles más altos cuando el cultivo estaba en plena madurez y descendiendo a partir de este momento, ya que la planta entra en la senescencia y estos valores disminuyen (Whitfield and Rowan, 1974). Este descenso en el nivel de clorofila es más apreciado en la variedad Virginia Gold, debido a que es una variedad de senescencia precoz, que podría estar relacionada con la rápida organogénesis que la caracteriza (Sakai and Shimamoto, 1965).

No se encontraron diferencias en el número de hojas, ni entre variedades, ni entre plantas transgénicas y control de la misma variedad. En el caso de la altura, dentro de la misma variedad tampoco se encontraron diferencias pero entre variedades sí que hubo diferencias significativas. Las variaciones que se puedan dar dentro de la misma variedad se considera que se debe, además de las fluctuaciones en las condiciones ambientales externas y/o a la propia planta, a errores en el curso del desarrollo de los órganos. En *Nicotiana rustica* han encontrado que estas diferencias eran genéticas. Los hallazgos de que las variedades de tabaco difieren de unas a otras, sugieren que debe ser de origen genético (Sakai and Shimamoto, 1965).

En cuanto al peso específico de las hojas, entre las plantas control y las transformadas de Virginia Gold no hubo diferencias. En la variedad Havana 503-B, en cambio, las diferencias fueron significativas (hasta un 21,75% más en las transgénicas que en las plantas control). En trabajos anteriores, tanto con la variedad VIR (Villanueva, 2011) como con la 503 (Sáenz de Cabezón, 2011) no se dieron diferencias dentro de las variedades. Sin embargo, en otros trabajos (Martinez, 2010) llevados a cabo en plantas de tabaco de la variedad Petite Havana transformadas con la Trxf, se vio que las plantas transformadas presentaban mayor peso seco que las control (hasta un 34,35% más).

El papel estimulador en la biosíntesis de carbohidratos por parte de la tiorredoxina f (Mingo-Castel *et al.*, 2009), se ha demostrado en este trabajo, donde las plantas transgénicas que sobreexpresan Trxf producen cantidades de almidón 4 veces superiores (73 μ moles/g PF en Virginia Gold y 126 μ moles/g PF en Havana 503-B) a las obtenidas por los mismos tejidos u órganos de las plantas silvestres correspondientes, cultivadas en condiciones idénticas. Si se comparan estos valores con estudios realizados anteriormente, se observa que en este trabajo la cantidad de almidón

acumulada en las plantas transgénicas de la variedad Virginia Gold es de 4,26 veces más que en las control, mientras que en un estudio realizado con las mismas plantas cultivadas en invernadero (Villanueva 2011) se consiguieron tan solo valores de almidón 1,5 veces superiores. En la variedad Havana 503-B las plantas transformadas cultivadas en condiciones de campo acumularon 3,97 veces más almidón que las control mientras que en invernadero este valor fue tan solo de 2,35 veces más (Sáenz de Cabezón 2011). En proporción, en este trabajo se ha conseguido acumular mayor cantidad de almidón en las plantas transgénicas respecto en las control, pero en números absolutos los mayores niveles de acumulación de almidón se dieron en plantas transformadas cultivadas en invernadero: 266 $\mu\text{moles/g PF}$ en VIRT y 100 $\mu\text{moles/g PF}$ en 503T (Villanueva 2011; Sáenz de Cabezón 2011).

En la variedad Petite Havana cultivada en invernadero se cuantificaron entre 15-20 veces más almidón en plantas transformadas con el gen de la Trxf respecto a las control (Martínez 2010), aunque en este caso la cuantificación se llevó a cabo mediante un método enzimático distinto basado en el método de la AOAC 985.29: *Dietary Fiber in Foods* (Enzymatic-Gravimetric Method). Anteriormente, se había visto que estas plantas acumulaban cantidades de almidón en hojas entre 5 y 10 veces superiores a las plantas control (Mingo-Castel *et al* 2009). Así, los valores de almidón en hojas rondaban los 25 $\mu\text{moles/g PF}$ en plantas de Petite Havana sin transformar y 200-250 $\mu\text{moles/g PF}$ en plantas transformadas (Mingo-Castel *et al* 2009).

Si se tienen en cuenta por un lado las condiciones en las que se ha desarrollado el cultivo en campo y por otro los datos obtenidos anteriormente con estas variedades cultivadas en invernadero, cabría esperar que los valores de almidón acumulado en hojas de tabaco hubiesen sido mucho mayores que los obtenidos. En el caso de Virginia Gold además, los valores máximos de almidón se cuantificaron en la primera cosecha (109 días PT), donde los niveles de clorofila ya comenzaban a descender, indicando que las fechas de cosecha diseñadas no fueron las adecuadas, pudiendo encontrar mayores diferencias semanas antes. En el caso de Havana 503-B por el contrario, al ser una variedad más tardía este hecho no le repercutió. Así, se podría concluir diciendo que cada variedad debería tener una fecha de cosecha diferente, acorde con su ciclo biológico.

Para evaluar el potencial fermentador de las hojas de tabaco se calculó el rendimiento en bioetanol a partir de los valores de almidón obtenidos en este trabajo. De este modo, se estimaron los litros de bioetanol por hectárea que se podrían obtener con las hojas transformadas de tabaco de la variedad Virginia Gold y Havana 503-B, y se comparó este valor con otras materias primas que se han venido utilizando como cultivo energético en los últimos años (Figura 13; Martínez, 2010). Así se ha podido comprobar que, mientras que en cultivos de cereales como por ejemplo el trigo, se obtienen 1.180 litros de bioetanol por hectárea, con los datos obtenidos en este trabajo el tabaco comercial modificado genéticamente rondaría los 500-700 litros por hectárea dependiendo de la variedad, 521,36 L/ha para VIRT y 697,22 L/ha para 503T. Sin embargo, en estudios anteriores se estimaron hasta 1.350 litros de bioetanol/ha para la variedad VIRT, obteniéndose un 24% más de bioetanol por hectárea que con el trigo (Villanueva, 2011). Además, los rendimientos en bioetanol de las hojas de tabaco transgénicas estimados en el trabajo anteriormente citado, se sitúan cerca de los litros por hectárea de bioetanol obtenidos con otras materias primas como la patata (1.860 L bioetanol/ha) o el grano de maíz (1.890 L bioetanol/ha), lo que hace del tabaco comercial transformado con la Trxf un posible cultivo energético para la obtención de bioetanol (Villanueva, 2011). A todo esto hay que añadir que, considerando que para el cálculo del potencial fermentador de estas plantas transgénicas de tabaco no se han tenido en cuenta los tallos, su productividad bioenergética podría ser mayor.

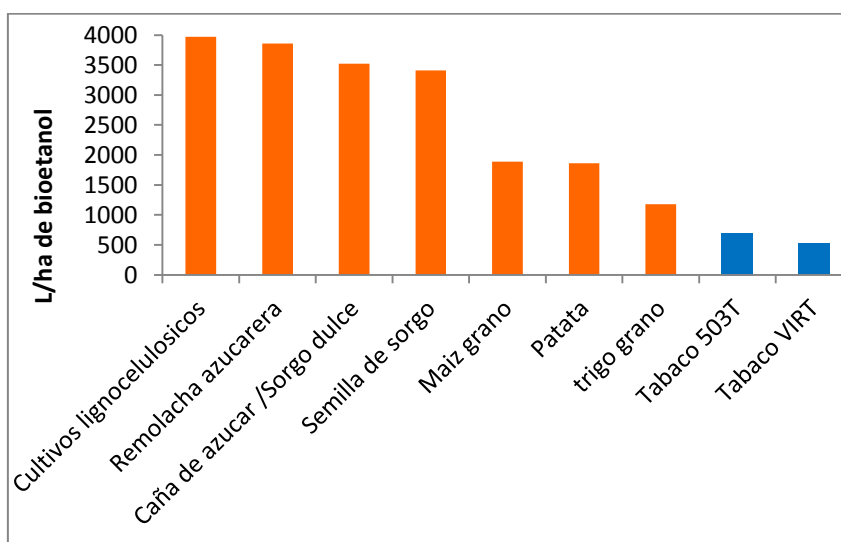


Figura 13:
Comparación del potencial fermentador de las plantas de tabaco de las variedades Virginia Gold y Havana 503-B transformadas con la Trxf y cultivadas en campo con otros cultivos energéticos en España.

En resumen, se observa que con los resultados obtenidos en este trabajo el rendimiento estimado para las variedades comerciales de tabaco transformadas plastidialmente con la Trxf (500-700 L/ha) no llega a alcanzar el rendimiento obtenido por el grano de trigo, por lo que no podría ser una buena alternativa a los cereales como cultivo energético. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados preliminares que se obtuvieron en invernadero y las condiciones en las que se ha desarrollado el cultivo en el campo, sería conveniente repetir el ensayo antes de emitir una valoración final.

Otra ventaja que ofrece el empleo de hojas de tabaco con sobreexpresión de tiorredoxina f como materia prima para la producción de bioetanol es que presentan un alto contenido en agua, lo que podría suponer una reducción del coste de agua del proceso industrial (Andrianov *et al.*, 2009). Del mismo modo, las hojas de tabaco no necesitan pre-tratamiento severos previos a la hidrólisis enzimática, al contrario que los materiales lignocelulósicos. Esto podría generar un ahorro en los costes y tiempo de producción, dado que el pre-tratamiento de las materias lignocelulósicas es la etapa que más encarece el proceso (Tang *et al.*, 2011).

El calentamiento global ha llegado a un nivel alarmante debido al cambio en el medio ambiente mundial. Según el informe de análisis de dióxido de carbono del centro de información (CDIAC), las emisiones de CO₂ han aumentado de 3 toneladas métricas en 1751 hasta 8.230 toneladas métricas en 2006 (Kumar *et al.*, 2011). Motivo por el cual se están controlando más las emisiones que se producen a la atmósfera. Según la estimación realizada en este estudio sobre el cultivo tradicional de tabaco en Navarra, su producción generaría aproximadamente 770 Kg CO₂ Eq/t. Con el objetivo de comparar la huella de carbono del tabaco con la de otros cultivos energéticos, se han obtenido datos de las emisiones producidas por el trigo, la cebada y el maíz, que son aproximadamente 380 Kg CO₂ Eq/t, 300 Kg CO₂ Eq/t y 515 Kg CO₂ Eq/t, respectivamente (datos facilitados por el INTIA, antiguo ITG Agrícola). De todos ellos, el tabaco es el cultivo que más kilos de CO₂ equivalentes por tonelada emite a la atmósfera. Estas emisiones se pueden atribuir a las altas cantidades de fertilizantes que se deben aportar, sobre todo nitrógeno, siendo éstas las que más contribuyen en la emisión total de GEI producidas durante la actividad agrícola, hasta un 77% (Kumar and Murthy, 2012), junto a las labores preparatorias del terreno (arados muy profundos) y a la electricidad empleada en el riego. Sin embargo, con estas consideraciones, el

valor de la Huella de Carbono calculado para el tabaco no debería ser tan diferente al del maíz, ya que son cultivos con necesidades similares, elevado aporte nitrogenado, riego, etc. Una posible explicación puede encontrarse en las pocas encuestas recabadas para el cálculo de las emisiones en tabaco en Navarra (solo dos agricultores han aportado la documentación requerida), no siendo por tanto una muestra muy representativa. Es por ello, que en próximas estimaciones de huellas de carbono, se recomienda que se hagan en lugares donde este cultivo esté más extendido como puede ser Extremadura.

En este trabajo se ha determinado una huella de carbono “Business-to-business” (B2B), es decir que la evaluación de la huella para en el punto en el cual se entrega el producto a otro fabricante, en este caso, cuando se cosecha la planta de tabaco. Así, el proceso industrial de la producción de bioetanol no se tiene en cuenta. Sin embargo, hay estudios (Kumar and Murthy, 2012) que demuestran que el proceso de producción de etanol resulta ser un factor importante en la energía fósil utilizada y el principal contribuyente de las emisiones de gases de efecto invernadero producidas durante su ciclo de vida. Por lo que, se estima que dependiendo del proceso de producción de etanol empleado, las emisiones de gases de efecto invernadero se encuentran en el rango de 131-555,4 kg de CO₂ equivalente por unidad funcional, partiendo como materia prima de la paja. Comparando estos valores con los producidos por la gasolina, se observa que se reduce la energía fósil necesaria para producir la unidad funcional en el análisis del ciclo de vida del etanol, en un 57,43-112,67%. El uso de la energía fósil y las emisiones de gases de efecto invernadero producidos a partir del ciclo de vida de un biocombustible para la unidad de 1 km, fueron alrededor del 53% y el 39,12% respectivamente, menos que los de gasolina. Demostrando así, que el etanol produce menos emisiones de gases de efecto invernadero y utiliza menos energía fósil que los combustibles derivados del petróleo (Kumar and Murthy, 2012).

CONCLUSIONES

- 1.- La sobreexpresión del gen de la tiorredoxina f (Trxf) desde el genoma de los cloroplastos de las variedades de tabaco Virginia Gold y Havana 503B no produce diferencias significativas en los parámetros fenológicos (altura, número de hojas y clorofila).
- 2.- La expresión de Trxf en los cloroplastos de tabaco incrementó alrededor de cuatro veces el contenido de almidón en las hojas de tabaco transformadas con respecto a las plantas control, tanto en la variedad Virginia Gold como en la Havana 503-B.
- 3.- Los mayores niveles de almidón en hoja de plantas transformadas se registro en la primera cosecha (109 días post-trasplante), alcanzando los $73,53 \pm 47,03$ μ moles de glucosa por gramo de peso fresco en la variedad Virginia Gold y $126,46 \pm 56,02$ μ moles de glucosa en la variedad Havana 503-B.
- 4.- El peso específico de las hojas está directamente relacionado con el contenido de almidón de las mismas, aumentando significativamente cuando la cantidad de almidón acumulado en las hojas de tabaco es sustancial.
- 5.- El rendimiento de bioetanol estimado para la variedad de tabaco Virginia Gold transformada con el gen de la tiorredoxina f ronda los 500 L bioetanol/ha, mientras que con la variedad Havana 503-B rondaría los 700 L bioetanol/ha. Si bien, considerando las condiciones en las que se han desarrollado las plantas en campo, sería conveniente repetir el ensayo para poder validar estos datos.
- 6.- La Huella de Carbono estimada para el cultivo de tabaco es de 774,13 kg CO₂ eq/t, produciendo más emisiones que otros cultivos energéticos como los cereales, debido principalmente a los aportes de fertilizantes nitrogenados, a las labores preparatorias y a la electricidad empleada en el riego.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrianov, V., Borisjuk, N., Pogrebnyak, N., Brinker, A., Dixon, J., Spitsin, S., Flynn, J., Matyszczyk, P., Andryszak, K., Laurelli, M., Golovkin, M. and Koprowski, H. (2010) Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of Arabidopsis DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 277-287.
- Appleby, M.R., Buckley, A.B., Lambert, C.G. and Rennie, A.E.W. (2010) A comparison of carbon footprint calculations for end of life product recovery methods using PAS 2050. *ASME 2010 10th Biennial Conference on Engineering Systems Design and Analysis* **4**: 705-713.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. and Bornke, F. (2010) Plastidial Thioredoxin z Interacts with Two Fructokinase-Like Proteins in a Thiol-Dependent Manner: Evidence for an Essential Role in Chloroplast Development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Cell* **22**: 1498-1515.
- Ball, S.G. and Morell, M.K. (2003) From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 207-233.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P. and Preiss, J. (1996) From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Cai, N., Manieri, W., Schurmann, P., Hurkman, W.J. and Buchanan, B.B. (2006) A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2988-2993.
- Barney, J.N. and DiTomaso, J.M. (2011) Global Climate Niche Estimates for Bioenergy Crops and Invasive Species of Agronomic Origin: Potential Problems and Opportunities. *Plos One* **6**: AR e17222.
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Zandueta-Criado, A., Moran., Zorzano, M.T., Viale, A.M., Alonso-Casajus, N. and Pozueta-Romero, J. (2004) Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13080-13085.
- Berndt, C., Lillig, C.H. and Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta-molecular Cell Research* **1783**: 641-650.
- Buchanan, B.B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 187-220.
- Buchanan, C.M., Alderson, S.R., Clevon, C.D., Dixon, D.W., Ivanyi, R., Lambert, J.L., Lowman, D.W., Offerman, R.J., Szejtli, J. and Szente, L. (2002) Synthesis and characterization of water-soluble hydroxybutenyl cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins). *Carbohydrate Research* **337**: 493-507.
- Carbon Trust, DEFRA (Department for Environment Food and Rural Affairs), BSI (British Standards). (2008) Guide to PAS 2050.
- Cho, M.J., Wong, L.H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P.G. and Buchanan, B.B. (1999) Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14641-14646.

- Deurer, M., Clothier, B., Huh, K.Y., Jun, G.I., Kim, I. and Kim, D. (2011) Trends and interpretation of life cycle assessment (LCA) for carbon footprinting of fruit products: Focused on kiwifruits in Gyeongnam region. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* **29**: 389-406.
- Dunnett, A.J., Adjiman, C.S. and Shah, N. (2008) A spatially explicit whole-system model of the lignocellulosic bioethanol supply chain: an assessment of decentralised processing potential. *Biotechnology for Biofuels* **1**: AR 13.
- Emmenegger, M.F., Pfister, S., Koehler, A., Giovanetti, L., Arena A.P. and Zah, R. (2011) Taking into account water use impacts in the LCA of biofuels: an Argentinean case study. *International Journal Life Cycle Assess* **16**: 869-877.
- Espinoza-Orias, N., Stichnothe, H. and Azapagic, A. (2011) The carbon footprint of bread. *International Journal of Life Cycle Assessment* **16**: 351-365.
- Fernández, J. and Curt, M.D. (2005) New energy crops for bioethanol production in the Mediterranean region. *International Sugar Journal* **107**: 622-627.
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G. and Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* **24**: 549-556.
- Hancsok, J., Baladincz, P., Kasza, T., Kovacs, S., Toth, C. and Varga, Z. (2011) Bio Gas Oil Production from Waste Lard. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: AR 384184.
- Herrera, S. (2006) Bonkers about biofuels. *Nature Biotechnology* **24**:755-760
- Amorim, H.V., Lopes, M.L., Oliveira, J.V.D., Buckeridge, M.S. and Goldman, G.H. (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 1267-1275.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. and Tiffany, D. (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.
- Issakidis-Bourguet, E., Mouaheb, N., Meyer, Y. and Miginiac-Maslow, M. (2001) Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *Plant Journal* **25**: 127-135.
- Joudrier, P., Gautier, M.F., de Lamotte, F. and Kobrehel, K. (2005) The thioredoxin h system: potential applications. *Biotechnology Advances* **23**: 81-85.
- Kashiwagi, L.K., Sube Singh and HD Upadhyaya (2006) Variation of SPAD Chlorophyll Meter Readings (SCMR) in the Mini-Core Germplasm Collection of Chickpea. *SAT eJournal* **2**.
- Kumar, K., Dasgupta, C.N., Nayak, B., Lindblad, P. and Das, D. (2011) Development of suitable photobioreactors for CO(2) sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource technology* **102**: 4945-4953.
- Kumar, D., and Murthy, G.S. (2012) Life cycle assessment of energy and GHG emissions during ethanol production from grass straws using various pretreatment processes. *Interantional Journal of Life Cycle Assessment*.
- Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. and Issakidis-Bourguet, E. (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics* **51**: 343-365.
- Llanos Company, M. (1985) El Mundo del tabaco. Ediciones Alhambra (Madrid).
- Llanos Company, M. (1981) El Tabaco, Manual técnico para el cultivo y curado. Ediciones mundi-prensa.
- Llanos Company, M. and Zubia, J.L. (1964) El Excelente cultivo de nuestro tabaco oscuro. Ediciones Vardulia (San Sebastián).

- MARM (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2007) Manual de gestión de buenas prácticas agrícolas para la producción de tabaco en España.
- Martínez, O. (2010) Valoración de plantas de tabaco con sobreexpresión de tiorredoxina como materia prima en la producción de bioetanol. Trabajo Final de Máster. UPNA.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F. and Reichheld, J.P. (2009) Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annual Review of Genetics* **43**: 335-367.
- Mingo-Castel, A.M., Farran, I. and Sanz-Barrio, R. (2009) Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas. Vol. WO 2009/156545 A1 España.
- Miyagawa, Y., Tamoi, M. and Shigeoka, S. (2001) Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nature Biotechnology* **19**: 965-969.
- Montrichard, F., Alkhalifioui, 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**: 452-474.
- Murata, T., Akazawa, T., Sugiyama, T. and Minamikawa, T. (1964) Isolation of adenosine diphosphate glucose from ripening rice grains + its enzymic synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **106**: 371-378.
- Ölçer H., Lloyd J.C., and Raines C.A. (2001) Photosynthetic Capacity Is Differentially Affected by Reductions in Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase Activity during Leaf Development in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Physiology* **125**: 982-989.
- Plassmann, K., Norton, A., Attarzadeh, N., Jensen, M.P., Brenton, P. and Edwards-Jones, G. (2010) Methodological complexities of product carbon footprinting: a sensitivity analysis of key variables in a developing country context. *Environmental Science and Policy* **13**: 393-404.
- Sáenz de Cabezón Irigaray, C. (2011) Caracterización de plantas de tabaco cv. "Havana 503B" que sobreexpresan el gen de la tiorredoxina en el genoma de los cloroplastos. Trabajo Final de Máster. UPNA.
- Sakai, K.I. and Shimamoto, Y. (1965) Developmental instability in leaves and flowers of *Nicotiana tabacum*. *Genetics* **51**: 801-813.
- Sanz-Barrio, R., Millán, A.F., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J.M. and Farran, I. (2011) Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 639-650.
- Schurmann, P. and Buchanan, B.B. (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**: 1235-1273.
- Schwietzke, S., Griffin, W.M. and Matthews, H.S. (2011) Relevance of Emissions Timing in Biofuel Greenhouse Gases and Climate Impacts. *Environmental Science & Technology* **45**: 8197-8203.
- Scott P. and Kruger N.J. (1995) Influence of Elevated Fructose-2,6-Bisphosphate Levels on Starch Mobilization in Transgenic Tobacco Leaves in the Dark. *Plant Physiology* **108**: 1569-1577.
- Scott P., Lange A.J. and Kruger N.J. (2000) Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose 2,6-bisphosphate. *Planta* **211**: 864-873.
- Slattery, C.J., Kavakli, I.H. and Okita, T.W. (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Science* **5**: 291-298.

- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J. and Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant-tissues by adp glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**: 287-292.
- Sticklen, M.B. (2010) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics* **11**: 308-308.
- Rolletschek, H., Hajirezaei, M.R., Wobus, U. and Weber, H. (2002) Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* **214**: 954-964.
- Tammisola, J. (2010) Towards much more efficient biofuel crops – can sugarcane pave the way? *GM Crop* **1**: 181-198.
- Tamoi M., Hiramatsu Y., Nedachi S., Otori K., Tanabe N., Maruta T. and Shigeoka S. (2011) Increase in the activity of fructose-1,6-bisphosphatase in cytosol affects sugar partitioning and increases the lateral shoots in tobacco plants at elevated CO₂ levels. *Photosynthesis Research* **108**: 15-23.
- Tang, Y., Zhao, D.Q., Cristhian, C. and Jiang, J.X. (2011) Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media. *Biotechnology for Biofuels* **4**: AR 22.
- Villanueva Legarda, L. (2011) Plantas de tabaco con sobreexpresión de tioredoxina f como cultivo energético alternativo. Trabajo Final de Máster. UPNA.
- Whitfield, D.M. and Rowan, K.S. (1974) Changes in the chlorophylls and carotenoids of leaves of *Nicotiana tabacum* during senescence. *Phytochemistry* **13**: 77-83.
- Wong, J.H., Kim, Y.B., Ren, P.H., Cai, N., Cho, M.J., Hedden, P., Lemaux, P.G. and Buchanan, B.B. (2002) Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 16325-16330.
- Yabuta, Y., Tamoi, M., Yamamoto, K., Tomizawa, K., Yokota, A. and Shigeoka, S. (2008) Molecular design of photosynthesis-elevated chloroplasts for mass accumulation of a foreign protein. *Plant and Cell Physiology* **49**: 375-385.
- Yadav, P.K.S., Singh, O. and Singh, R.P. (2010) Palm Fatty Acid Biodiesel: Process Optimization and Study of Reaction Kinetics. *Journal of Oleo Science* **59**: 575-580.
- Yousafzai, H.K., Marwat, K.B. and Khan, M.A. (2006) Impact of herbicides on some agronomie and chemical characteristics of flue-cured virginia (FCV) tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Songklanakarín Journal of Science and Technology* **28**: 929-935.

ANEXO 1: ANOVAS

Clorofila

ANOVA Clorofila (52 días PT)

Factores inter-sujetos

		N
var	503-B	9
	503-B T	9
	vir	9
	virt	9

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: cosecha 1

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	127,333 ^a	3	42,444	10,538	,000
Intersección	46081,778	1	46081,778	11440,993	,000
var	127,333	3	42,444	10,538	,000
Error	128,889	32	4,028		
Total	46338,000	36			
Total corregida	256,222	35			

a. R cuadrado = ,497 (R cuadrado corregida = ,450)

cosecha 1

var	N	Subconjunto		
		1	2	3
DHS de Tukey ^{a,b}				
vir	9	33,11		
virt	9	35,00	35,00	
503-B	9		37,00	37,00
503-B T	9			38,00
Sig.		,210	,170	,718

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 4,028.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000

b. Alfa = 0,05.

c. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

ANOVA Clorofila (72 días PT)

Factores inter-sujetos

		N
var	503-B	9
	503-B T	9
	vir	9
	virt	9
bloque	1	12
	2	12
	3	12

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: cosecha 2

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	414,750 ^a	11	37,705	2,020	,073
Intersección	65792,250	1	65792,250	3524,585	,000
var	287,861	3	95,954	5,140	,007
bloque	52,667	2	26,333	1,411	,263
var * bloque	74,222	6	12,370	,663	,680
Error	448,000	24	18,667		
Total	66655,000	36			
Total corregida	862,750	35			

a. R cuadrado = ,481 (R cuadrado corregida = ,243)

cosecha 2

	var	N	Subconjunto	
			1	2
Tukey B ^{a,b}	virt	9	39,44	
	vir	9	40,44	40,44
	503-B	9		45,56
	503-B T	9		45,56

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 18,667.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000

b. Alfa = 0,05.

c. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

ANOVA Clorofila (96 días PT)

Factores inter-sujetos

		N
var	503-B	9
	503-B T	9
	vir	9
	virt	9

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: cosecha 3

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1042,750 ^a	3	347,583	30,390	,000
Intersección	60270,250	1	60270,250	5269,530	,000
var	1042,750	3	347,583	30,390	,000
Error	366,000	32	11,438		
Total	61679,000	36			
Total corregida	1408,750	35			

a. R cuadrado = ,740 (R cuadrado corregida = ,716)

cosecha 3

var	N	Subconjunto		
		1	2	3
DHS de Tukey ^{a,b}				
vir	9	34,00		
virt	9	37,33		
503-B	9		46,00	
503-B T	9		46,33	
Sig.		,178	,997	

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 11,438.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000

b. Alfa = 0,05.

c. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

Altura

Factores inter-sujetos		
		N
FECHA	1	36
	2	36
VARIEDAD	503B	18
	503BT	18
	VIR	18
	VIRT	18
		18
BLOQUES	1	24
	2	24
	3	24

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ALTURA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	30058,444 ^a	23	1306,889	10,366	,000
Intersección	864174,222	1	864174,222	6854,748	,000
COSECHA	23616,889	1	23616,889	187,332	,000
VARIEDAD	2916,778	3	972,259	7,712	,000
BLOQUES	145,528	2	72,764	,577	,565
COSECHA * VARIEDAD	610,111	3	203,370	1,613	,199
COSECHA * BLOQUES	506,361	2	253,181	2,008	,145
VARIEDAD * BLOQUES	1911,139	6	318,523	2,527	,033
COSECHA * VARIEDAD * BLOQUES	351,639	6	58,606	,465	,831
Error	6051,333	48	126,069		
Total	900284,000	72			
Total corregida	36109,778	71			

a. R cuadrado = ,832 (R cuadrado corregida = ,752)

ALTURA

	VARIEDAD	N	Subconjunto	
			1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	503BT	18	102,56	
	503B	18	104,06	
	VIRT	18		114,28
	VIR	18		117,33
	Sig.		,978	,846

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 126,069.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000
- b. Alfa = 0,05.
- c. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

Nº hojas

Factores inter-sujetos

		N
FECHA	1	36
	2	36
VARIEDAD	503B	18
	503BT	18
	VIR	18
	VIRT	18
BLOQUES	1	24
	2	24
	3	24

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: N° HOJAS

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	654,653 ^a	23	28,463	8,365	,000
Intersección	14649,014	1	14649,014	4305,016	,000
COSECHA	539,014	1	539,014	158,404	,000
VARIEDAD	18,264	3	6,088	1,789	,162
BLOQUES	3,361	2	1,681	,494	,613
COSECHA * VARIEDAD	14,042	3	4,681	1,376	,262
COSECHA * BLOQUES	20,361	2	10,181	2,992	,060
VARIEDAD * BLOQUES	33,528	6	5,588	1,642	,156
COSECHA * VARIEDAD * BLOQUES	26,083	6	4,347	1,278	,285
Error	163,333	48	3,403		
Total	15467,000	72			
Total corregida	817,986	71			

a. R cuadrado = ,800 (R cuadrado corregida = ,705)

N° HOJAS

DHS de Tukey ^{a,b}	VARIEDAD	N	Subconjunto
			1
	503B	18	13,83
	503BT	18	13,94
	VIRT	18	14,17
	VIR	18	15,11
	Sig.		,175

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 3,403.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Alfa = 0,05.

Almidón

ANOVA primera cosecha Almidón (109 días PT)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: almidón

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	87940,919 ^a	3	29313,640	18,168	,000
Intersección	217113,906	1	217113,906	134,562	,000
Variedad	87940,919	3	29313,640	18,168	,000
Error	96809,335	60	1613,489		
Total	455946,350	64			
Total corregida	184750,254	63			

a. R cuadrado = ,476 (R cuadrado corregida = ,450)

almidón

Variedad	N	Subconjunto		
		1	2	3
DHS de Tukey ^{a,b,c}				
vir	12	17,221493		
503,	12	31,828987		
virt	28		73,584956	
503T	12			126,427898
Sig.		,771	1,000	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1613,489.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 14,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = 0,05.

d. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

ANOVA segunda cosecha almidón (121 días PT)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: almidón

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	11535,202 ^a	3	3845,067	26,862	,000
Intersección variedad	20394,425	1	20394,425	142,477	,000
Error	11535,202	3	3845,067	26,862	,000
Error	6298,252	44	143,142		
Total	38227,880	48			
Total corregida	17833,455	47			

a. R cuadrado = ,647 (R cuadrado corregida = ,623)

almidón

DHS de Tukey ^{a,b}	variedad	N	Subconjunto		
			1	2	3
	vir	12	3,587882		
	503,	12	15,573804	15,573804	
	virt	12		17,456076	
	503T	12			45,833082
	Sig.		,082	,980	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 143,142.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Alfa = 0,05.

c. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

Peso específico

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PESO ESPECÍFICO

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	32,373 ^a	11	2,943	6,083	,002
Intersección	876,441	1	876,441	1811,640	,000
VARIEDAD	27,603	3	9,201	19,019	,000
BLOQUES	,483	2	,241	,499	,619
VARIEDAD * BLOQUES	4,287	6	,714	1,477	,266
Error	5,805	12	,484		
Total	914,619	24			
Total corregida	38,178	23			

a. R cuadrado = ,848 (R cuadrado corregida = ,709)

PESO ESPECÍFICO

VARIEDAD	N	Subconjunto		
		1	2	3
DHS de Tukey ^{a,b}				
vir	6	4,913567		
virt	6	5,428078		
503,	6	6,071167		
503T	6		7,759367	
Sig.		,058	1,000	

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,484.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = 0,05.

c. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

ANEXO 2: ENCUESTA HUELLA DE CARBONO

1. Los Cultivos de la explotación

Superficie en arrendamiento	
-----------------------------	--

CULTIVOS DE LA EXPLOTACION	VARIEDAD	SUPERFICIE	RENDIM. CULTIVO (T/ha)

Se anotarán todos los cultivos que haya en la explotación concretando la superficie y rendimiento de cada una.

2. Compra de semillas

	SEMILLAS Y PLANTAS DE VIVERO
CULTIVOS DE LA EXPLOTACION	Compras kg

Se indicará la cantidad (kg) de semillas que se compra de cada cultivo.

3. COMPRA DE FITOSANITARIOS			
Cultivo Tratado	Producto (nombre comercial)	l-kg totales	Dosis (l-kg/ha)

Se anotarán los kg de cada fitosanitario que se le añade a cada cultivo.

4. COMPRA DE FERTILIZANTES		
Cultivo Tratado	Tipo de fertilizante	Kg comprados

Cultivo tratado	ESTIERCOLES	Super. Ha	Total t-m3

Cultivo Tratado	(Purines, Compost, Lodos)	Super. Ha	Total t-m3

Se anotarán los kg de cada fertilizante que se le añade a cada cultivo.

5. LABORES REALIZADAS A TERCEROS

LABORES	Superficie (has)

6. LABORES ALQUILADAS

LABORES	Superficie (has)

Se tendrán en cuenta las labores que se hacen a terceros y las labores que se alquilan dentro de la explotación.

7. Maquinaria en la explotación			
Propia o en propiedad compartida			
Tractor (CV)	Número	Antigüedad años	Utilización anual (h/año)

Equipos de trabajo del suelo	Número	Antigüedad años	Utilización anual ha/año

Equipos de siembra y plantación	Número	Antigüedad años	Utilización anual ha/año

Equipos de abonado y protección de cultivos	Número	Antigüedad años	Utilización anual ha/año

Equipos de recolección de cultivos	Número	Antigüedad años	Utilización anual ha/año

Se indicará la potencia de cada tractor que haya en la explotación y su uso anual en horas. Se anotarán los diferentes aperos que se utilizan y las hectáreas que cultivan. En el número de aperos o tractores habrá que tener en cuenta si son de la explotación o están compartidas con otros socios (CUMA), en ese caso se indicaría el porcentaje que le corresponde al agricultor.

8. Energía consumida en la explotación

Combustibles	Consumos por Unidad
Gasóleo en la explotación (descontar trabajos realizados a terceros)	
Gasóleo A para riego	
Gasolina (vehículos profesionales)	
TOTAL CONSUMO DE ENERGÍA	

Agua para riego y consumo animal	Consumos en m3
Agua para riego	
TOTAL CONSUMO DE AGUA	

9. Otros consumos

	Consumos por Unidad
Consumo de plástico	
Lubricantes y aceites	

En el caso de los combustibles, se indicarán los litros de gasóleo anuales que se han consumido en la utilización de los tractores, únicamente para labores de la explotación, descontar lo referido a labores para terceros.

10. Itinerarios de cultivo		CULTIVO			
LABOREO PRIMARIO					
Subsolador					
Arado Verterdera					
Chisel					
Arado discos					
Rotocultivador					
LABOREO SECUNDARIO					
Grada de discos					
Grada alternativa					
Grada Rotativa					
Accionador					
Grada Púas					
Vibrocultivador					
FERTILIZACIÓN/ABONADO					
Abon. Centrifuga					
Abon. Localizadora					
Abon. De arrastre					
Abon. Suspendida					
Cisterna Purín					
Remolque de estiercol					
SIEMBRA					
Sembradora Convencional					
Sembradora Monograno					
Sembradora Chorrillo					
TRATAMIENTO FITOSANITARIO					
Pulverizador					
Pulverizador Suspendido					
Pulverizador Arrastrado					
Atomizador					
Atomizador Suspendido					
Atomizador Arrastrado					
RECOLECCIÓN					
Cosechadora de Cereal					
Cosechadora de Maíz					
Cosechadora picadora de maíz					
SIEMBRA DIRECTA					
Sembradora SD					
Sembradora a Chorrillo SD					
Sembradora Monograno SD					

Se anotarán los cultivos que hay en la explotación y en cada caso se indicarán el número de pasadas que se realizan con cada apero. Habrá que elegir los aperos correspondientes a cada cultivo.