

**Caracterización génica y funcional de cebada mutagenizada con
respuesta mejorada al aumento del CO₂ atmosférico.**

**Facultad de Biología
Departamento de Microbiología y Genética**

Francisco Javier Córdoba Jacoste

Memoria para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Universidad de Salamanca
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca
Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias

Julio, 2015

El Dr. **LUIS ROMÁN FERNÁNDEZ LAGO**, Profesor titular de Microbiología y director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada “**Caracterización génica y funcional de cebada mutagenizada con respuesta mejorada al aumento del CO₂ atmosférico.**” ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Genética (área de Fisiología Vegetal) de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Dres. José Luis Molina Cano y Rafael Martínez-Carrasco Tabuena, por el licenciado en Biología D. **FCO. JAVIER CÓRDOBA JACOSTE**, y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Salamanca a 13 de Julio de 2015.

Fdo. Dr. Luis Román Fernández Lago

El Dr. **JOSÉ LUIS MOLINA CANO**, Dr. Ingeniero Agrónomo, Investigador del Área de Cultivos Extensivos del Centro IRTA de Lleida, en calidad de director y el Dr. **RAFAEL MARTÍNEZ-CARRASCO TABUENCA**, Profesor de Investigación del CSIC en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, en su calidad de director,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada “**Caracterización génica y funcional de cebada mutagenizada con respuesta mejorada al aumento del CO₂ atmosférico.**” ha sido realizada en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) y en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) por D. **FCO. JAVIER CÓRDOBA JACOSTE** bajo su dirección, y dicha memoria cumple las condiciones de originalidad requeridas para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Salamanca a 13 de Julio de 2015.



Fdo. Dr. José Luis Molina Cano



Fdo. Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuenca

Agradecimientos

En primer lugar a mis directores, Dr. José Luis Molina y Dr. Rafael Martínez-Carrasco, por su trabajo de formación científica durante estos años. Igualmente, a mi tutora Dra. Josefa Babiano por su labor.

Gracias a todos los miembros de mi grupo de trabajo, Dra. Rosa Morcuende, Ángel Luis Verdejo, M^a Ángeles Boyero, Rubén Vicente y Fátima Valero y muy especialmente a la Dra. Pilar Pérez. Y sin olvidarme de los antiguos compañeros la Dra. Ana M^a Mendez y el Dr. Diego Gutierrez.

Agradecimientos a los investigadores Dr. Juan Arellano, Dra. Mónica Balsera, Estefanía Uberegui y demás integrantes del departamento de Estrés Abiótico y del Instituto de Recursos Naturales de Agrobiología de Salamanca.

Quiero agradecer también la labor del Dr. Nese Sreenivasulu y Mandy Pueffeld del grupo Abiotische Stress-Genomik del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) de Alemania por su colaboración con la transcriptómica de este trabajo y también al resto de compañeros del departamento de Molekulare Genetik.

Agradecimientos al Dr. Jordi Comadrán y Nicola Uzrek, compañeros de The James Hutton Institute en Reino Unido, del grupo Cell and Molecular Sciences, por tantas buenas ideas y por su ayuda en el genotipado del material vegetal.

Mis agradecimientos al Dr. Björn Usadel y resto de compañeros del Institut für Biologie I del RWTH Aachen Universität de Alemania, por transmitirme algunas de sus destrezas bioinformáticas.

Y muchas gracias también a los investigadores Dra. Marian Moralejo y Dr. Robert Savé, Universidad de Lleida e IRTA, que participaron activamente en generar el material vegetal para poder llevar a cabo esta investigación.

Índice

Agradecimientos	i
Índice.....	iii
Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Ecuaciones.....	ix
Abreviaturas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La cebada como planta modelo y cultivo.....	2
1.1.1. Botánica y taxonomía de la cebada.....	2
1.1.2. Características del desarrollo de la cebada	4
1.1.3. El genoma de la cebada y su evolución	7
1.1.4. Impacto socioeconómico de la cebada.....	10
1.2. La mejora de cultivos.....	12
1.2.1. Los mutantes como herramienta	13
1.2.2. Mutagénesis en plantas	16
1.2.3. Mejora vegetal y demanda de alimentos con el cambio global	19
1.3. Las plantas ante una atmosfera cambiante: el CO ₂	19
1.3.1. Fotosíntesis	21
1.3.2. Respuesta de las plantas al CO ₂ elevado: los estomas	27
1.3.3. Respuesta de las plantas al CO ₂ elevado: la Rubisco.....	33
1.4. Aumento de la eficiencia fotosintética en CO ₂ elevado.....	35
1.5. Objetivos.....	37
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
2.1. Material vegetal	40
2.1.1. Obtención de mutantes.....	40
2.1.2. Condiciones de cultivo.....	42
2.2. Fluorescencia de la clorofila	44
2.3. Intercambio gaseoso.....	46
2.4. Determinación de clorofilas	49
2.5. Determinación de carbohidratos	50
2.5.1. Glucosa y fructosa	51
2.5.2. Sacarosa	53

2.5.3. Fructanos	55
2.5.4. Almidón	55
2.6. Determinación de nitrato, aminoácidos y ATP	56
2.6.1. Nitrato	56
2.6.2. Aminoácidos	56
2.6.3. ATP.....	57
2.7. Determinación de proteínas.....	58
2.7.1. Proteína total, soluble y de membrana	59
2.7.2. Electroforesis, densitometría e inmunodetección de proteínas	61
2.7.4. Ensayos enzimáticos <i>in vitro</i>	65
2.8. Análisis de expresión génica y el transcriptoma	68
2.8.1. Análisis paralelo de la expresión génica: microarray.....	68
2.8.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa.....	74
2.9. Determinación de parámetros de crecimiento	84
2.9.1. Anatomía foliar	84
2.9.2. Densidad de estomas en las hojas	85
2.9.3. Peso, superficie verde y producción de grano.....	86
2.10. Análisis estadísticos	86
3. RESULTADOS	89
3.1. Caracterización del mutante de cebada G132	90
3.1.1. Identificación de la variedad de cebada y segregación del carácter del mutante.....	90
3.1.2. Fluorescencia de la clorofila	91
3.1.3. Intercambio gaseoso.....	93
3.1.4. Densidad y conductancia de los estomas	95
3.1.5. Contenido de clorofilas	102
3.1.6. Contenido de carbohidratos.....	103
3.1.7. Contenido de nitrato y aminoácidos.....	104
3.1.8. Contenido de proteínas y actividades enzimáticas	105
3.1.9. Niveles de ARNm	109
3.1.10. Crecimiento y producción de grano	118
3.2. Respuesta al CO ₂ elevado de la cebada Graphic y su mutante G132.....	119
3.2.1. Fluorescencia de la clorofila	119
3.2.2. Intercambio gaseoso.....	121
3.2.3. Densidad y conductancia de los estomas	126
3.2.4. Contenido en clorofilas	132
3.2.5. Contenido de carbohidratos.....	133
3.2.6. Contenido en nitrato aminoácidos y ATP	134

3.2.7. Contenido de proteínas y actividades enzimáticas.....	135
3.2.8. Análisis paralelo de la expresión génica: microarray	140
3.2.9. Abundancia de ARNm.....	167
3.2.10. Anatomía foliar y crecimiento	171
4. DISCUSIÓN	175
4.1. Caracterización del mutante G132.....	176
4.1.1. Eficiencia cuántica del mutante G132	176
4.1.2. Capacidad de carboxilación y contenidos de compuestos nitrogenados del mutante G132	178
4.1.3. Movimientos estomáticos del mutante G132.....	181
4.1.4. Contenidos de carbohidratos en G132	185
4.1.5. Respiración en G132.....	186
4.1.6. Crecimiento y producción en G132	187
4.2. Efecto del CO ₂ elevado	190
4.2.1 Condiciones de cultivo.....	190
4.2.2. Efecto del CO ₂ sobre la fijación del dióxido de carbono en ambos genotipos.....	191
4.2.3. La eficiencia cuántica en CO ₂ alto.....	193
4.2.4. Conductancia de los estomas en CO ₂ alto.....	194
4.2.5. Rubisco y compuestos nitrogenados en CO ₂ alto	195
4.2.6. Carbohidratos en CO ₂ alto	199
4.2.7. Metabolismo secundario en CO ₂ alto: compuestos fenolicos	200
4.2.8. Efecto del CO ₂ en la anatomía de la hoja y el crecimiento de la planta.....	201
5. CONCLUSIONES	205
6. BIBLIOGRAFÍA	209
APÉNDICE.....	231
A.1. Resultados del microarray.....	232
A.1.1. Resultados de las diferencias entre genotipos.....	232
A.1.2. Resultados de las diferencias entre concentraciones de CO ₂ en Graphic	243
A.1.3. Resultados de las diferencias entre concentraciones de CO ₂ en G132	245

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de la cebada	2
Tabla 2.1. Anticuerpos empleados para la identificación de proteínas	65
Tabla 2.2. Genes de referencia y cebadores para la amplificación.....	82
Tabla 3.1. Distribución de frecuencias de segregación en la generación BC1F2.....	91
Tabla 3.2. Fluorescencia de la clorofila en hojas de Graphic y G132.....	93
Tabla 3.3. Intercambio gaseoso en hojas de Graphic y G132	95
Tabla 3.4. Regresiones g_s -tiempo y probabilidades en Graphic y G132	101
Tabla 3.5. Contenido de carbohidratos en hojas de Graphic y G132	103
Tabla 3.6. Contenido de proteínas en hojas de Graphic y G132	106
Tabla 3.7. Lista de genes y cebadores para qRT-PCR	110
Tabla 3.8. Nivel de expresión génica en hojas de Graphic y G132 (fase 13-14 Zadoks).....	112
Tabla 3.9. Nivel de expresión génica en hojas de Graphic y G132 (fase 15-17 Zadoks).....	115
Tabla 3.10. Peso seco y componentes de la producción de grano de Graphic y G132	119
Tabla 3.11. Fluorescencia de la clorofila en CO ₂ ambiente y elevado.....	120
Tabla 3.12. Intercambio gaseoso en CO ₂ ambiente y elevado	122
Tabla 3.13. Efectos directo, de aclimatación y neto del CO ₂ elevado en la velocidad de fotosíntesis.....	122
Tabla 3.14. Regresiones g_s -tiempo y probabilidades en CO ₂ ambiente	131
Tabla 3.15. Contenido de carbohidratos CO ₂ ambiente y elevado	134
Tabla 3.16. Contenido en nitrato, aminoácidos y ATP en CO ₂ ambiente y elevado.....	135
Tabla 3.17. Contenido de proteínas CO ₂ ambiente y elevado	136
Tabla 3.18. Western Blots en CO ₂ ambiente y elevado.....	138
Tabla 3.19. Nivel de expresión génica en CO ₂ ambiente y elevado.....	169
Tabla 3.20. Parámetros de la anatomía foliar en CO ₂ ambiente y elevado	171
Tabla 3.21. Parámetros de crecimiento en CO ₂ ambiente y elevado.....	172

Lista de Figuras

Figura 1.1. Morfología de la espiga y la planta de cebada.....	3
Figura 1.2. Escala de Zadocks.....	5
Figura 1.3. Panorámica del genoma de cebada.....	9
Figura 1.4. Fenotipos de mutantes afectados morfológicamente y en el desarrollo.....	15
Figura 1.5. Proteínas y complejos de proteínas del aparato fotosintético.....	21
Figura 1.6. Etapas del ciclo de Calvin-Benson y acoplamiento con las reacciones lumínicas de la fotosíntesis y con la difusión del CO ₂ desde la atmósfera.....	25
Figura 1.7. Mecanismos de apertura y cierre estomático.....	29
Figura 2.1. Esquema del procedimiento de obtención del mutante G132 de la cebada Graphic (GRA).....	41
Figura 2.2. Cultivo en invernadero de plantas de cebada de la variedad Graphic y el mutante G132.....	43
Figura 2.3. Cultivo en cámara de crecimiento de plantas de cebada de la variedad Graphic y el mutante G132.....	44
Figura 2.4. Cinética de la fluorescencia de la clorofila en la tercera hoja de Graphic.....	45
Figura 2.5. Medida del intercambio gaseoso en hojas de cebada cultivadas en cámara de crecimiento.....	47
Figura 2.6. Espectrofotómetro-fluorímetro-luminómetro para placas Synergy 2.....	54
Figura 2.7. Esquema de la reacción acoplada para medir ATP.....	58
Figura 2.8. Equipo de electroforesis y transferencia de geles de poliacrilamida.....	59
Figura 2.9. Gel de poliacrilamida tras la electroforesis de proteínas solubles de Graphic y G132.....	63
Figura 2.10. Cascada de reacciones para el ensayo in vitro de la actividad Rubisco.....	66
Figura 2.11. Flujo de la preparación de muestras y procesamiento del array.....	71
Figura 2.12. Diseño balanceado de las muestras en chip de formato 8x60k de Agilent.....	72
Figura 2.13. Gel de agarosa.....	78
Figura 2.14. Curva de disociación de un producto de PCR, emisión de fluorescencia por ciclo de amplificación, y perfil térmico utilizado.....	80
Figura 2.15. Electroforesis en gel de agarosa para comprobar la formación de un amplicón único en la PCR.....	82
Figura 2.16. Detalle de estomas en lupa binocular.....	85
Figura 3.1. Distribución en centimorgans de los 384 marcadores (SNPs) en los siete cromosomas del genoma de cebada.....	90
Figura 3.2. Plantas de ambos genotipos de cebada.....	91

Figura 3.3. Recuento estomático en hojas de Graphic y G132.....	96
Figura 3.4. Respuestas a corto plazo de la conductancia de los estomas a la concentración atmosférica de CO ₂	97
Figura 3.5. Cambio con el tiempo en A y Ci tras un aumento de CO ₂	99
Figura 3.6. Conductancia de los estomas (g _s) tras un aumento de CO ₂	99
Figura 3.7. Conductancia de los estomas en respuesta al DCMU y CO ₂	100
Figura 3.8. Contenido en clorofilas en hojas de Graphic y G132	102
Figura 3.9. Contenido de nitrato y aminoácidos en hojas de Graphic y G132	105
Figura 3.10. Polipéptido de 33 kDa como porcentaje de la subunidad grande de Rubisco en Graphic y G132	107
Figura 3.11. Actividad y estado de activación de Rubisco en Graphic y G132	108
Figura 3.12. Actividad y estado de activación de nitrato reductasa en Graphic y G132.....	109
Figura 3.13. Curvas de respuesta al CO ₂ de la fotosíntesis en CO ₂ ambiente y elevado en el primer experimento.	124
Figura 3.14. Curvas de respuesta de la fotosíntesis en CO ₂ ambiente y elevado en el segundo experimento.....	126
Figura 3.15. Cuantificación de estomas y su conductancia en CO ₂ ambiente y elevado	127
Figura 3.16. Respuestas a corto plazo de la conductancia a la concentración de CO ₂	128
Figura 3.17. Cambio con el tiempo en A y C _i tras un aumento de CO ₂	130
Figura 3.18. Conductancia de los estomas tras un aumento de CO ₂	130
Figura 3.19. Contenido en clorofilas en CO ₂ ambiente y elevado	132
Figura 3.20. Polipéptido de 33 kDa como porcentaje de la subunidad grande de Rubisco en CO ₂ ambiente y elevado	137
Figura 3.21. Detalle de membranas de hibridación.....	138
Figura 3.22. Actividad y estado de activación de Rubisco en CO ₂ ambiente y elevado	139
Figura 3.23. Actividad y estado de activación de nitrato reductasa en CO ₂ ambiente y elevado	140
Figura 3.24. Representación del análisis transcriptómico del microarray de los cuatro tratamientos empleados	141
Figura 3.25. Gráfico circular del porcentaje de abundancia de transcritos anotados	142
Figura. 3.26 Diferencias de expresión de genes involucrados en el metabolismo entre el mutante y Graphic cultivados en CO ₂ ambiente.....	162
Figura 3.27. Diferencias de expresión de genes involucrados en el metabolismo entre el mutante y Graphic cultivados en CO ₂ elevado.....	163

Lista de Ecuaciones

Ecuación 2.1. Fórmula Chi cuadrado para determinar la distribución de frecuencias	41
Ecuación 2.2. Respuesta neta de la fotosíntesis (A) al CO ₂ elevado	48
Ecuación 2.3. Ecuaciones para la determinación de la concentración de clorofila.....	50
Ecuación 2.4. Reacciones enzimáticas para la determinación de glucosa	52
Ecuación 2.5. Reacciones enzimáticas para la determinación de fructosa.....	52
Ecuación 2.6. Determinación de la concentración del NADPH.....	53
Ecuación 2.7. Concentración de NADPH	54
Ecuación 2.8. Reacciones para el ensayo in vitro de la actividad nitrato reductasa.....	67
Ecuación 2.9. Tasa de cambio en expresión génica entre muestras normalizadas.....	84

Abreviaturas

- A*: velocidad de asimilación fotosintética
- Aa*: aminoácidos
- ABA*: ácido abscísico
- ADN*: ácido desoxirribonucleico
- ADNasa*: desoxirribonucleasa
- ADNc*: ADN complementario
- ARN*: ácido ribonucleico
- ARNasa*: ribonucleasa
- ARNc*: ARN complementario
- ARNm*: ARN mensajero
- ATP*: adenosina trifosfato
- BSA*: seroalbúmina bovina
- C*: carbono
- CDPK*: proteína quinasa dependiente de calcio
- Chl a*: clorofila a
- Chl a:b*: razón de clorofila a entre clorofila b
- Chl a+b*: clorofila total
- Chl b*: clorofila b
- Chl*: clorofila
- C_i*: concentración intercelular de CO₂ del mesófilo foliar
- DCMU*: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
- DEPC*: dietileno pirocarbonato
- DTT*: dicloro difenil tricloroetano
- E*: velocidad de transpiración
- EC*: enzyme commission numbers, códigos del sistema de nomenclatura de enzimas
- EDTA*: ácido etilendiamino tetraacético
- FACE*: free air CO₂ enrichment, sistemas de enriquecimiento en CO₂ al aire libre
- F_v/F_m*: eficiencia fotoquímica máxima del PSII
- F_v'/F_m'*: eficiencia fotoquímica en la luz
- g_s*: conductancia estomática
- IPCC*: panel intergubernamental de cambio climático de la ONU
- IRGA*: analizador de gases en el infrarrojo
- LHC*: light harvesting complex, antenas o complejo de captación de luz del PSII
- LMA*: peso seco por unidad de superficie foliar

msd: diferencia mínima significativa
NAD⁺,NADH: nicotín-adenín dinucleótido
NADP⁺,NADPH: nicotín-adenín dinucleótido fosfato
NPQ: calor disipado por mecanismos de foto-protección
PGI: fosfoglucosa isomerasa
PMSF: fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PS: fotosistema
qL: fracción de centros del PSII en el estado abierto
Rubisco: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato
SAUR: proteína de pequeña respuesta positiva a auxina
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SuSy: sacarosa sintasa
TEA: trietanolamina
 Φ_{NPQ} : rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica
 Φ_{NO} : rendimiento cuántico del decaimiento basal no radiativo
 Φ_{qL} : rendimiento cuántico del transporte de electrones en el PSII

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La cebada como planta modelo y cultivo

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es uno de los cereales (Tabla 1.1) más importantes en el mundo. Fue una de las primeras plantas domesticadas (Badr *et al.*, 2000) y se empleó durante siglos para la alimentación humana. En la actualidad, la cebada es el cuarto cereal en cuanto a producción mundial, y se emplea para la alimentación de ganado, fabricación de malta para cerveza y whisky y consumo humano (Akar *et al.*, 2004). Además es un cultivo de fácil adaptación, crece desde los 330 metros sobre el nivel del mar cercanos al mar Muerto hasta los 4200 metros de altura en los Andes bolivianos y es cultivado en suelos y climas desfavorables (FAO, 2009). La cebada es bien conocida por su uso como planta modelo empleada en mejora de cultivos, genética, citogenética, patología, virología y estudios biotecnológicos (Heneen, 2010).

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de la cebada

CATEGORIA	NOMBRE
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Pooideae
Tribu	Triticeae
Genero	<i>Hordeum</i>
Especie	<i>Hordeum vulgare</i> L.

1.1.1. Botánica y taxonomía de la cebada

Las características morfológicas y anatómicas son normalmente las bases para distinguir las distintas variedades dentro de esta especie (Tabla 1.1) y pueden ser caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o marcadores moleculares neutros, o estar asociadas con la productividad. Como ejemplo, la longitud de la paja y su tenacidad (resistencia al encamado), componentes del rendimiento,

respuesta a diversas enfermedades, la fotosíntesis, el tiempo y la cantidad de requerimientos hídricos, fertilizantes y pesticidas aplicados y los efectos de los estreses ambientales como la sequía, deficiencias del suelo y toxicidades. Todas estas características están relacionadas en parte con la anatomía y morfología vegetal y todo afecta a la productividad (Reid, 1985).

La cebada se compone de raíces fasciculadas, de tallo tipo caña y con un número variable de entrenudos, las hojas son alternas y están conformadas por la vaina y la lámina. La espiga se encuentra en la parte superior del tallo, es una inflorescencia compuesta de espiguillas sentadas compuestas de una o tres flores hermafroditas, de las que cada una posee dos glumas y dos glumillas llamadas lema y pálea. El eje de la inflorescencia, llamado raquis, es articulado y con forma de zigzag y tiene tres espiguillas en cada articulación. Todas ellas son fértiles en los cultivares de seis carreras, mientras que en los cultivares de dos carreras las dos espiguillas laterales son normalmente estériles. Al igual que en otros cereales, el fruto es de tipo cariósipide (Molina Cano *et al.*, 1989; Wiebe and Reid, 1961), (Figura 1.1).

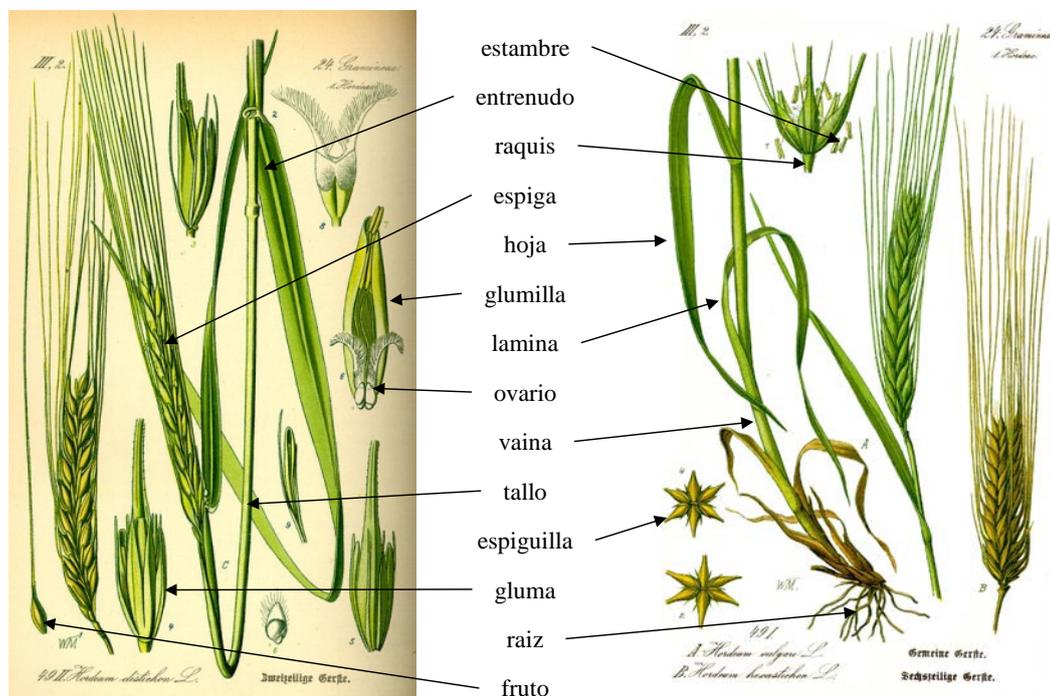


Figura 1.1. Morfología de la espiga y la planta de cebada. Adaptación de las ilustraciones de Otto Wilhelm Thomé (1885).

1.1.2. Características del desarrollo de la cebada

La cebada es una especie herbácea anual que puede ser de invierno o primavera, o también de tipos intermedios. Las etapas de crecimiento de la cebada son: germinación, desarrollo de plántulas, ahijamiento, elongación del tallo, espiga en la vaina (zurrón), emergencia de la espiga, antesis, desarrollo del grano y maduración (Figura 1.2). La duración de las diferentes etapas del desarrollo varía dependiendo del clima, la disponibilidad hídrica, la fertilidad del suelo, el grado de competencia con otras plantas, la presencia de plagas y patógenos, y el momento de la siembra, todo ello modulado por factores genéticos. El tiempo total hasta la madurez depende de la variedad, el lugar y la fecha de siembra, oscilando entre los 130-270 días (Molina Cano *et al.*, 1989).

Después de la germinación, el coleóptilo, que es una vaina que encierra a la planta embrionaria, llega a la superficie y la punta de la primera hoja emerge. Las hojas surgen continuamente en el tallo principal y tallos hijos, hasta la emergencia de la hoja bandera. Estas hojas maduran y envejecen progresivamente en toda la planta y se irán secando hasta el momento en que la planta alcanza la madurez plena, esto es, cuando el grano está maduro. La duración de la hoja bandera es de gran importancia para el llenado del grano y el rendimiento (Whitehouse, 1979).

Las plantas de cebada constan de varios tallos hijos que empiezan el desarrollo con el de la tercera hoja (Figura 1.2). El número de tallos hijos depende de la variedad, normalmente las cebadas de dos carreras desarrollan más ahijamiento que las variedades de seis carreras, así como las variedades de invierno desarrollan más que las de primavera, aunque también depende de las condiciones de cultivo. Los tallos hijos no siempre producen espigas fértiles mientras que el tallo principal sí. El desarrollo de la planta entera es coordinado, ya que el momento de diferenciación de la espiga coincide, en general, con el comienzo de la elongación del tallo y cuando los entrenudos se alargan, la espiga se prepara para la polinización y el desarrollo del grano. La polinización en la cebada, por lo general, se lleva a cabo justo antes o durante la emergencia de la espiga, ya que floración y emergencia suelen ser sincrónicas (Box, 2008).

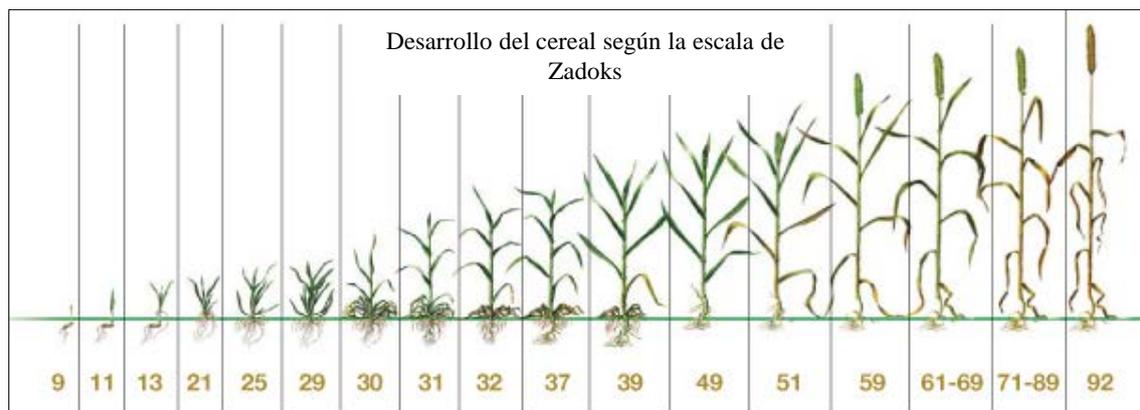


Figura 1.2. Escala de Zadocks. Se compone de una serie de dos dígitos donde el primero digito representa una etapa del desarrollo, que se subdivide en etapas de crecimiento secundario con la segunda cifra (Zadoks *et al.*, 1974).

La polinización comienza en la parte central de la espiga, prosiguiendo hacia la punta y base de la misma lo que repercute en que el llenado del grano de la parte central sea máximo hasta el momento óptimo de maduración, por lo cual los granos centrales son más pesados que los basales y apicales. También existe diferencia de tamaño entre granos dentro de las variedades de seis carreras, donde aquellos procedentes de las espiguillas laterales son por lo general más pequeños y de forma alabeada. La espiga en el momento de su emergencia siempre muestra porte erecto, pero conforme se va produciendo la acumulación de asimilados en los granos en crecimiento y aumenta su peso, va progresivamente curvándose (Robertson and Stark, 1992).

Una vez que se han producido la emergencia de la espiga y la fecundación, los granos comienzan a desarrollarse incrementando el tamaño del ovario y rellenándose progresivamente la cavidad que forman las glumillas. Este engrose, que comienza cuando el grano ha alcanzado su longitud total, se produce por el aporte de asimilados de los tejidos que aún son fotosintéticamente activos. Al primer periodo de desarrollo se le llama “grano acuoso”, siendo el ápice más ancho que la base. Esta fase es extremadamente importante, ya que determina el número de células que posteriormente se utilizaran para almacenar almidón en el endospermo (Radchuk *et al.*, 2009). Seguidamente el grano se alarga y alcanza la fase de “grano lechoso”, ya que la textura del mismo es blanda, y tiene una duración de unos diez días. Las sustancias acuosas contenidas en el endospermo

adquieren progresivamente una textura más consistente alcanzándose el inicio de la siguiente fase, que por su color blanco y consistencia semisólida se denomina "grano pastoso". Con una duración aproximada de diez días los granos almacenan almidón y terminan rápidamente su crecimiento. A medida que el fruto se acerca a la madurez y comienza a perder agua, su consistencia se vuelve completamente sólida. Esta etapa se denomina "grano duro" y es el momento en el que el fruto también pierde su color verde y ya no hay más acumulación de materia seca, es la madurez fisiológica. La madurez comercial se alcanza cuando la humedad del grano se ha reducido hasta un 12 % (Anderson *et al.*, 2013). Este momento a partir del cual el grano podría germinar fácilmente si no fuera por el llamado proceso de letargo, se reconoce visualmente porque el extremo del cuello de la espiga y las glumas han cambiado de color, virando del verde al amarillo rojizo y el grano solo pierde humedad.

Para la reproducción sexual, las cebadas de invierno necesitan de un periodo de estímulo por frío llamado vernalización, mientras que las variedades de primavera no. La floración comienza en las espiguillas centrales de la espiga completándose en la espiga entera al primer o cuarto día. Las espigas de los tallos hijos maduran a distinto tiempo dependiendo de las condiciones agroclimáticas. La maduración del ovario se produce, en general, en unas horas, e incluso, varios días antes que la de las anteras. Los filamentos de las anteras comienzan a alargarse poco antes de la anthesis, hasta que las anteras se abren en su parte superior. La viabilidad del polen se estima entre unas pocas horas hasta un día, mientras que el estigma es receptivo y fertilizable por un periodo de seis a ocho días (Riddle and Suneson, 1944). La floración puede ser abierta o cerrada, dependiendo de si las anteras quedan suspendidas fuera de las glumillas o confinadas dentro de las mismas tras realizar la fecundación. La gran mayoría de variedades de invierno tienen floración abierta, mientras que las variedades de primavera poseen floración cerrada (Nair *et al.*, 2010).

El polen de la cebada es pequeño y relativamente ligero (35-45 μm de diámetro) y altamente sensible a la desecación. La tasa de crecimiento, división celular y demás aspectos del crecimiento del tubo polínico, son muy dependientes de temperatura, aunque el tiempo de fecundación ocurre en los primeros minutos tras la adhesión del polen al estigma. Las especies de *Hordeum* son autógamias, así como las

variedades cultivadas y su ancestro silvestre son completamente autógamas, aunque no autógamas obligadas, lo que mantiene una migración genética baja (Bellucci *et al.*, 2013). En el caso de fecundación alógama la polinización vendría por el efecto del viento, siendo la distancia el factor que determina ese cruzamiento como resultado del polen migrante (Gatford *et al.*, 2006). En la cebada ocurre como en el resto de angiospermas la doble fecundación. Uno de los gametos del gametofito masculino (grano de polen) se fusiona con la oósfera para dar el cigoto (diploide), y el otro se une con los núcleos polares de la parte central del saco embrionario para dar origen al núcleo triploide a partir del cual se desarrollará el endospermo. El número total de células en el endospermo es mayor que en trigo o arroz, razón por la cual los granos de cebada contienen más material de pared celular (como β -glucanos) que otros cereales (Sabelli and Larkins, 2009). Además el endospermo es el lugar en donde se acumula el almidón y ciertas proteínas de la semilla (Radchuk *et al.*, 2009).

La dormancia, o mejor dicho periodo de letargo de la semilla, es la habilidad de las mismas para no germinar bajo condiciones favorables. Durante la domesticación de la cebada se seleccionaron las semillas con menos dormancia, razón por la cual el 90 % de las variedades cultivadas hoy en día germina a los cuatro días de imbibición, mientras que el ancestro silvestre *H. spontaneum* germina de forma irregular (Bothmer *et al.*, 1992). Además de la influencia del genotipo, la dormancia varía dependiendo de las condiciones en las que el grano maduró, fue cosechado y se almacenó. Así, las semillas que han madurado bajo condiciones de humedad elevada y temperatura fresca, como las de centro y norte Europa, perduran en letargo más tiempo que las cultivadas en climas más cálidos, como el mediterráneo (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.1.3. El genoma de la cebada y su evolución

Los siete cromosomas de la cebada se designan con números árabes del 1 al 7, de acuerdo con sus cromosomas homólogos en otros miembros de la tribu Triticeae, seguido del símbolo genómico H y por una S (short) o L (long) dependiendo de la longitud del brazo cromosómico si es el corto o largo respectivamente (Graner *et al.*, 2010). El genoma de la cebada es de 5.1 Gb y es más pequeño que el del trigo

hexaploide o trigo blando (*Triticum aestivum*, $2n=6x=42$) con un genoma de 17 Gb y es mayor que el genoma de otras gramíneas como el maíz (*Zea mays*, $2n=20$) con 2.5 Gb o el de arroz (*Oryza sativa*, $2n=24$), cuyo tamaño es solamente de 0.4 Gb (Eckardt, 2008)

Estudios recientes (IBSC, 2012) han determinado que la cantidad de genes de la cebada es aproximadamente 30.400. Son definidos como genes de alta confianza por comparación directa con familias de genes de los genomas de sorgo, *Brachipodium*, arroz y *Arabidopsis*. Sin embargo, otras 53.220 secuencias fueron consideradas como genes de baja confianza debido a la falta de homología y falta de recursos genéticos para ser comparados. El genoma de cebada se caracteriza por una gran abundancia de secuencias repetidas, aproximadamente el 84 % del genoma está compuesto por elementos móviles u otras estructuras repetidas como retrotransposones. Además, hay evidencia de la importancia del procesamiento post-transcripcional como un sistema central regulador apoyado por un extenso corte y empalme (splicing).

Tradicionalmente la cebada se ha considerado como planta modelo para la biotecnología vegetal y la investigación genética debido a que es una especie diploide, autógena y un cultivo de climas templados. Además existen grandes colecciones de germoplasma que contienen variedades élites y locales diversas geográficamente, accesiones silvestres y amplias colecciones de mutantes bien caracterizados con una gran variación en cuanto a desarrollo y morfología y que están disponibles fácilmente. En estas colecciones encontramos alelos con una gran diversidad genética bien caracterizada y meticulosamente mantenida. El aislamiento y la comprensión de estos alelos responsables de los caracteres hacen de la cebada una oportunidad para mejorar la respuesta de los cultivos al estrés o la calidad del grano. Esto, junto con el genoma secuenciado recientemente por completo (IBSC, 2012), convierte a la cebada en una gran herramienta para la investigación fundamental y la mejora de cultivos de monocotiledóneas (Fig. 1.3).

La cebada es uno de los cultivos de la agricultura primitiva, cuyos restos arqueológicos indican que fue un cultivo domesticado en el año 10.000 A.C partiendo de su genotipo silvestre conocido como *Hordeum spontaneum* (Weiss and Zohary, 2011). Esta especie silvestre aún puede encontrarse en territorios del suroeste de Asia, Tibet, este del Mediterráneo, norte de Africa y las zonas

semidesérticas de Afganistán (Jakob *et al.*, 2014). Hay tres rasgos clave que están asociados con la domesticación de la cebada: raquis no quebradizo, espiga de seis carreras, y grano desnudo (Pourkheirandish and Komatsuda, 2007). Las mutaciones que provocaron una menor vernalización e insensibilidad al fotoperiodo aceleraron la migración de este cultivo a otras regiones distantes de su lugar de origen (Bothmer *et al.*, 1992).

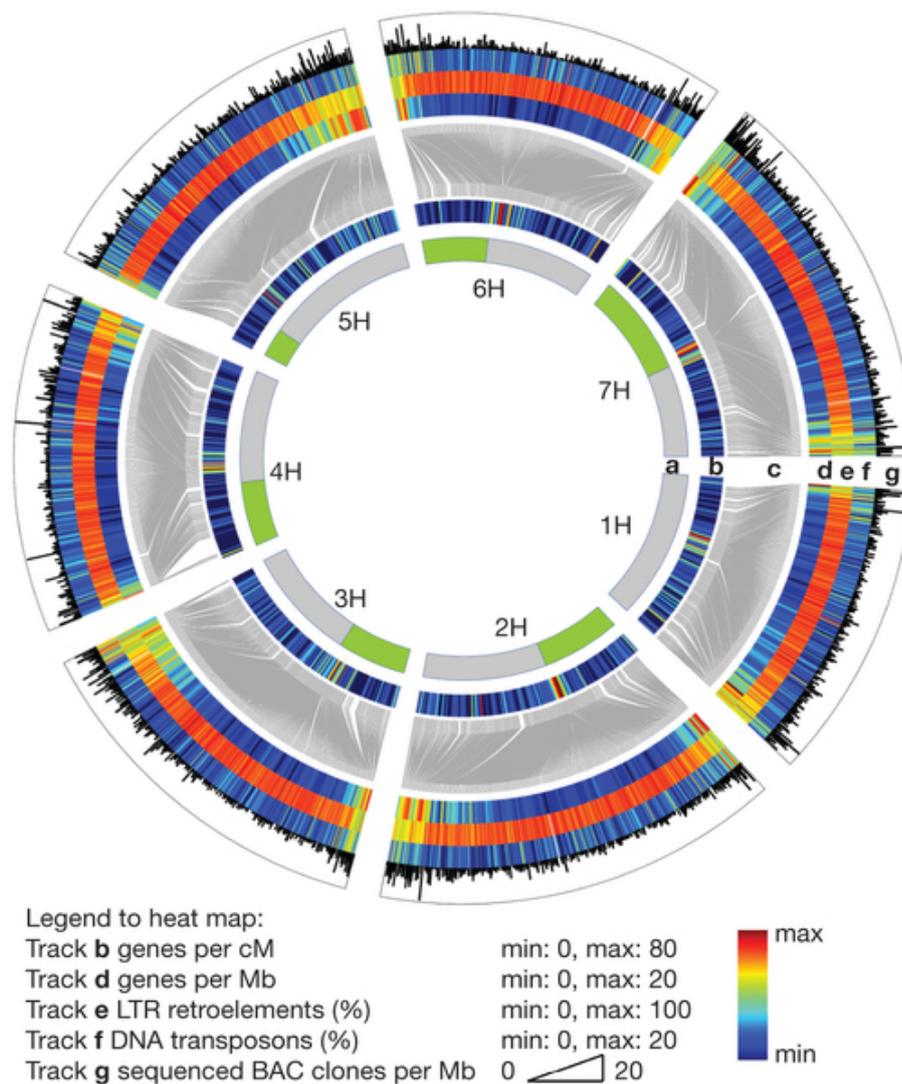


Figura 1.3. Panorámica del genoma de cebada (IBSC, 2012).

Podríamos decir que el rasgo más importante de la domesticación de la cebada es el raquis no quebradizo, característica que confiere una eficiente cosecha sin pérdida de grano. Al mantenerse el grano en la espiga durante más tiempo, la frecuencia con la que esta mutación se transmitía a las siguientes cosechas era mayor,

confiriendo el éxito a perdurar de mano de los agricultores primitivos (Pourkheirandish and Komatsuda, 2007). Y es que la dispersión de las semillas permite en la naturaleza la pervivencia de las plantas silvestres, pero la pérdida de esta capacidad ha sido esencial para el desarrollo de la agricultura. Durante la domesticación de la cebada en el Medio Oriente, uno de los hitos más insignes fue la aparición de la cebada de seis carreras con el correspondiente aumento en el número de las semillas. La cebada de seis carreras produce tres veces más semillas por espiga que la cebada de dos carreras constituyéndose un cambio dramático de importancia agronómica. La presencia de dos carreras en el genotipo ancestral de cebada *Hordeum spontaneum*, sugiere que las variedades de seis carreras son consecuencia de la mutación del genotipo silvestre durante la domesticación (Komatsuda *et al.*, 2007). Otro importante carácter agronómico es la presencia o ausencia de cáscara en granos vestidos o desnudos respectivamente, por su importancia en el uso alimentario. Las semillas desnudas aparecieron durante la domesticación y muy probablemente tras la selección de raquis no quebradizos. La cascara en granos vestidos esta soldada, mientras que en los granos desnudos no, siendo este carácter importante también por la facilidad con la que se separaría la cascara del grano en la trilla (Pourkheirandish and Komatsuda, 2007). La dormancia, la vernalización y la insensibilidad del fotoperiodo también se modificaron por la selección humana. Estos rasgos son importantes para la adaptación de la cebada a diversas regiones geográficas, la supervivencia en condiciones adversas y en definitiva para una mayor dispersión de las semillas. En resumen, la domesticación permitió la propagación de cebada por todo el mundo gracias a la modificación de todos estos caracteres (Pourkheirandish and Komatsuda, 2007).

1.1.4. Impacto socioeconómico de la cebada

La cebada es el cuarto cereal más importante en cuanto a producción mundial después del trigo, el maíz y el arroz, y está entre los diez cultivos más importantes del mundo y a nivel global se produjeron más de 143 millones de toneladas en 2013 (FAOSTAT, 2015). Los países con mayor producción fueron Rusia (15.3 millones de toneladas), Alemania (10.34 millones de toneladas), Francia (10.31 millones de toneladas), Canadá (10.23 millones de toneladas) y España (10

millones de toneladas). En 2012 el principal exportador de grano en el mundo fue Australia (5 millones de toneladas) seguido de Francia (4.6 millones de toneladas), y principalmente exportaron cebada maltera, ya que el beneficio es un 20 o 30 % mayor que con la cebada para consumo directo. Mientras que el principal importador de cebada fue Arabia Saudí con 8.3 millones de toneladas, seguido por China (2.5 millones de toneladas). Y en general los países asiáticos como Arabia Saudí importan grano para el consumo humano y la alimentación de ganado.

En aquellas regiones del mundo donde el maíz no puede ser cultivado debido al corto período de cultivo, a las bajas temperaturas primaverales o la deficiencia de precipitaciones y mayor evaporación, la cebada se cultiva predominantemente como principal cereal forrajero. Por ello la cebada es utilizada para la alimentación de ganado en ciertos países europeos, ya que es una gran fuente de carbohidratos y proteínas. El contenido en proteína puede variar entre un 10-15 % dependiendo de las condiciones ambientales. Para su uso como pienso previamente los granos de cebada deben ser reducidos a polvo fino, mientras que la paja se usa para acomodar y alimentar al ganado, especialmente en zonas rurales de países en vías de desarrollo. Anualmente, el 5% de la cebada se almacena en forma de semillas (Akar *et al.*, 2004).

El 13% de la producción mundial de cebada es procesado para la obtención de malta, siendo este su segundo mayor uso según la FAO (2009). La malta es el ingrediente principal en la producción de cerveza, y para su uso debe cumplir una serie de requisitos que dependerán de las condiciones de crecimiento, cosecha y almacenamiento de la cebada. Durante el proceso de malteado, las semillas de cebada germinan produciendo distintas enzimas, entre ellas amilasas, glucanasas, peptidasas, y otras, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar el almidón a dextrinas y azúcares fermentables, así como los β -glucanos, proteínas, etc. Existen otros granos que también producen estas dos enzimas, pero el uso de la cebada es preferente por las siguientes características: (1) la envuelta del grano de cebada protege al embrión durante la germinación, (2) dicha envuelta favorece la filtración, (3) la textura de la semilla es firme, y (4) su uso es tradicional (Robertson and Stark, 1992). Además para la óptima producción de malta las compañías que la producen se encargan de especificar la variedad de cultivo que desean (Bamforth, 2003).

Además de su uso en la empresa cervecera, la malta se emplea en la producción de whisky, snacks, salsas, preparados de chocolate, bebidas, pan y otros. Hoy en día, algunas industrias alimentarias consideran la cebada un excelente alimento ya que, comparado con el trigo, tiene un mayor contenido en fibra soluble y una menor densidad en lipoproteínas (LDL) (Ensminger and Ensminger, 1993). Teniendo en cuenta estos factores, se han registrado un gran número de variedades de cebada de grano desnudo para consumo humano y su extensión se ha incrementado en países occidentales. En países en desarrollo se utiliza en la elaboración de pan mezclado con otros tipos de harina, ya que, además de tener un alto valor nutritivo, resulta más económico que el trigo (Akar *et al.*, 2004). Igualmente, el grano de cebada se emplea como tal para consumo humano (FAO, 2009).

1.2. La mejora de cultivos

La agrobiotecnología no sólo responde al reto de mejorar la alimentación, la seguridad y la promoción del desarrollo socioeconómico, sino también promueve la conservación, la diversidad y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Hoy en día la caja de herramientas de la biotecnología pone a disposición de los agricultores nuevas posibilidades para aumentar la productividad y la diversidad de cultivos, además del desarrollo de una agricultura más sostenible. Estas herramientas están siendo rápidamente adoptadas por los mejoradores y biólogos moleculares como herramientas eficaces y apropiadas para estudios básicos y aplicados, que abordan los nuevos retos biológicos en los sistemas de producción agrícola del futuro. Y la genómica comparada nos permite superar más eficazmente y de forma más eficiente estos retos. Se ha avanzado considerablemente en los últimos años en la cartografía, el marcaje y el aislamiento de muchos genes agrícolamente importantes, todo ello utilizando marcadores moleculares, gracias en gran parte a las mejoras de las técnicas que se han desarrollado. Estas técnicas ayudan en la selección directa de muchos caracteres deseados usando simultáneamente poblaciones F2 y retrocruzamiento, líneas isogénicas, doble haploides y líneas recombinantes puras. La última colaboración internacional de la comunidad científica ha dado lugar a

cambios cuantitativos en el conocimiento de la genética y recursos biológicos para la cebada (IBSC, 2012). Entre estos recursos encontramos:

- Etiquetas de secuencias expresadas (ESTs)
- Secuencias de longitud completa de ADNc (Matsumoto *et al.*, 2011)
- Librerías artificiales de cromosoma bacteriano (BAC) (Schulte *et al.*, 2011)
- Marcadores SNP, disponible como Illumina iSelect chip (Comadran *et al.*, 2012)
- Microarrays de Affymetrix y Agilent (Liu *et al.*, 2011)
- Población biparental y mapa genético (Close *et al.*, 2009)
- Población TILLING (Caldwell *et al.*, 2004)
- Nuevos métodos más eficientes de transformación (Harwood, 2011).

1.2.1. Los mutantes como herramienta

Durante los últimos años la genética Mendeliana clásica ha entrado en una nueva era llamada genómica, cuyo objeto es el estudio de la estructura de los genes y su función. Está disponible una gran cantidad de información genética, en forma de secuencias de ADN, para especies modelo como arroz o *Arabidopsis*, aunque la función de la mayor parte de esa información es desconocida. Por lo tanto se está dirigiendo el esfuerzo científico a cubrir ese hueco. La mutagénesis con la ayuda de marcadores moleculares juega un papel importante en este campo, lo que lleva a un incremento en la demanda de material vegetal mutado donde ciertos caracteres han cambiado debido al bloqueo (knock out) de los genes responsables (Fig. 1.4). Usando herramientas moleculares y genéticas, un carácter mutado puede ser asociado con una secuencia de ADN cuya función previamente se desconocía.

Se conoce por mutación - palabra acuñada por el científico holandés Hugo de Vries en 1901- aquel cambio en la secuencia base de ADN de la planta que conduce a una alteración de una o varias características. Una mutación es un cambio repentino y heredable en el material genético, a nivel génico, cromosómico o genómico y no se debe a fenómenos de segregación ni recombinación. La mutación ha sido muy importante desde el punto de vista de la evolución hasta el punto de ser el origen de

nuevas especies. Se sabe que el origen de nuevos genes viene dado por la mutación, que acompañada por la hibridación, conduce a la creación de nueva variación genética que es esencial para la mejora, así como la evolución de cultivos. Las mutaciones pueden darse de forma espontánea o pueden producirse artificialmente. El uso de mutaciones inducidas en los programas de mejora para desarrollar nuevas variedades es conocido por el nombre de mejora mutacional (mutation breeding), incluyendo aquí el uso de mutaciones tanto de forma directa como indirecta. Las mutaciones se clasifican en micro o macro mutaciones, dependiendo de si el efecto es fácilmente identificable, en el caso de las macro-mutaciones, o micro-mutaciones en el caso de efectos sobre características que deben ser analizadas biométricamente. La mayoría de las mutaciones son recesivas, deletéreas y letales ya que las mutaciones favorables putativamente se han ido incorporando a los genomas de los cultivos vegetales a lo largo de la historia de su evolución.



Figura 1.4. Fenotipos de mutantes afectados morfológicamente y en el desarrollo, tales como el ahijamiento y la estatura de la planta (A-E), el desarrollo de la inflorescencia lateral (F-L), ramificación en la espiga (M-O), longitud de entrenudos del raquis (P- S), el desarrollo awn (T-y), el color de los órganos florales (Z-AH), la biosíntesis de clorofila (AI-AO), el desarrollo de la región ligular (AP-AV), madurez temprana (AW y AX) y necrosis (AY-BD) (Druka *et al.*, 2011).

El uso directo de las mutaciones es una aproximación atractiva para añadir nuevas características fácilmente identificables en variedades previamente bien adaptadas

(Lundqvist, 2014). Además, una vez transmitida la mutación no hay necesidad de retrocruzamiento para reconstituir el fondo genético del cultivar. La mejora mutacional es aplicable a cualquier cultivo vegetal, pero tiene especial interés en aquellas plantas cuya propagación es vegetativa, especialmente árboles frutales cuya mejora se hace complicada mediante la hibridación sexual. La situación ideal para la mejora mutacional se da cuando el gen responsable de un carácter deseado no está en el germoplasma o está fuertemente unido con genes no deseables para la mejora, por lo que la recombinación a través de su hibridación resultaría rara e imposible. Los agentes mutagénicos también pueden emplearse para generar nuevos marcadores moleculares, ya que pueden inducir fácilmente polimorfismos en la estructura de genes de diferentes proteínas. De esta forma, plantas con un fenotipo morfológico idéntico pueden dar como resultado la identificación de isoenzimas polimórficas. El tratamiento con mutágenos ha dado como resultado el desarrollo de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) en cereales. Los mutantes son herramientas críticas para poder diseccionar las rutas metabólicas y bioquímicas, y para determinar la función de los genes en las plantas, mediante la genética inversa y directa. La genética directa abarca aquellas técnicas orientadas a la identificación de un genotipo responsable de un fenotipo. Inicialmente, mediante la generación de mutaciones al azar en un organismo, a menudo con radiación o agentes químicos, o la mutagénesis de inserción y cultivo y selección de los individuos con un fenotipo aberrante. La genética inversa, por su parte, es una disciplina genética que, partiendo de una secuencia ya conocida, investiga sobre su función biológica alterando dicho ADN mediante mutación puntual, por sustitución de nucleótidos, o más drásticamente, mediante silenciamiento de genes completos.

1.2.2. Mutagénesis en plantas

La elección del material parental es importante para lograr unos buenos objetivos mediante la mejora mutacional. El propósito de la mejora mutacional debe ser perfeccionar las variedades locales adaptadas o crear nuevos alelos que no existan en las colecciones de germoplasma. El empleo de las semillas para ser mutagenizadas, confiere la ventaja de que estas pueden tolerar condiciones físicas que normalmente solo podrían tolerarse por moléculas no vivas. La semilla original

tratada con mutágenos (M0), tras la mutagénesis inducida en un locus, se transforma en un individuo heterocigoto denominado M1, y las plantas obtenidas serán la generación M1. Las semillas producidas por la M1 darán lugar a la generación M2, que normalmente mostrará segregación. Es común que las plantas M1 muestren poco vigor y esterilidad, y posiblemente existan quimeras que posean tallos mutados. Por ello, la generación M2 debe ser cultivada como plantas independientes para identificar mutaciones recesivas en forma de caracteres cuantitativos. El tamaño de la M2 es crítico a la hora de garantizar el éxito final del proceso de mejora. Si calculamos que la tasa de mortalidad de una población de 5.000 plantas es del 50 % en la M1, solo 2.500 plantas fértiles serían chequeadas en la M2. Y si la M2 cuenta con 20 plantas por progenie serían un total de 50.000 plantas. Con una frecuencia baja de mutaciones se necesitarían poblaciones más grandes ya que la gran mayoría de estas no serán útiles. En la segunda o tercera generación los mutantes seleccionados serán homocigotos, lo que supone una ventaja, si lo comparamos con la sexta o séptima generación en los programas de mejora por hibridación (Chahal and Gosal, 2002).

Las mutaciones que ocurren en la naturaleza suelen ser causadas por fenómenos naturales como los rayos cósmicos o los rayos ultravioleta. Pero la tasa de mutaciones espontáneas es baja, aproximadamente una entre un millón por cada gen de forma individual. Wilhelm Konrad von Roentgen descubrió en 1895 los rayos X, Henri Becquerel en 1896 descubrió que el uranio producía radiación, y en 1897 Pierre y Marie Curie aislaron el radio. En 1904 De Vries tuvo el presagio de sugerir que el uso de la radiación inducía mutaciones, mientras que Muller (1927), en *Drosophila* y Stadler (1928) en maíz, demostraron que la frecuencia de mutaciones podía aumentar con el uso de agentes mutagénicos como los rayos X. El tratamiento con rayos X en cebadas de dos carreras realizados por Nilsson-Ehle mostro que los mutantes producidos tenían espigas densas y tallos comprimidos. Aquellos mutantes, a los que posteriormente Gustafsson bautizó como *erectoides*, podían soportar altas dosis de fertilizantes aumentando el rendimiento de los cultivos. Auerbach and Robson (1946) observaron que los agentes químicos como el gas mostaza eran altamente mutagénicos y desde entonces ha sido descubierto un buen número de agentes que pueden aumentar artificialmente la frecuencia de mutaciones inducidas. Se han empleado diversas estrategias para desarrollar

mutantes en plantas (Acanda *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2003; Dahleen *et al.*, 2005; Hirochika *et al.*, 2004), pero las mutaciones inducidas por química o irradiación proveen de un método rápido para obtener una gran cantidad de mutantes. Las ventajas de estos mutantes es que no son caros de producir y cualquier genotipo puede emplearse sin necesidad de transformación, evitando así el problema con algunas variedades recalcitrantes. Además la densidad de mutaciones permite una saturación del genoma con una población relativamente pequeña.

Los agentes disponibles para inducir mutaciones, o mutágenos, podrían clasificarse en dos categorías: físicos, como los rayos X, rayos gamma, radiación ultravioleta o neutrones, y químicos, como antibióticos, ácido nitroso, agentes alquilantes, azidas, acridinas o hidroxilaminas. En cebada el porcentaje de mutación por irradiación y por tratamiento de semillas con agentes químicos depende del cultivar empleado, pero principalmente depende de la dosis y periodo de exposición. Veleminsky *et al.* (1987) observaron que la azida sódica induce un aumento de la frecuencia de mutaciones de forma dependiente de la dosis. La azida sódica es uno de los mutágenos más empleados en cebada, porque es eficiente y porque la inducción de mutaciones es fácilmente aplicada en semillas, tanto secas como embebidas (Nilan *et al.*, 1973). En cebada, la azida sódica es conocida por inducir sustituciones de bases por la transición de nucleótidos (AT-GC) (Olsen *et al.*, 1993), y además es un inductor muy pobre de aberraciones cromosómicas (Konzak *et al.*, 1973). Son pocos los estudios que han demostrado que la azida sódica provoque aberraciones cromosómicas en la cebada (Nilan and Pearson, 1975). Así pues en este trabajo, este agente químico se ha usado como fuente inductora de variación genética, a través de su potencial mutagénico. El uso del mutágeno seleccionado en este trabajo condujo a la obtención de una colección que permitió identificar mutaciones en genes o grupos de genes que podrían gobernar un carácter. Sin embargo, como las mutaciones de esta colección no estaban marcadas en forma alguna, se necesita tiempo y mano de obra para identificar los genes que confieren fenotipos interesantes. Se están desarrollando actualmente otras estrategias alternativas para la identificación de mutaciones no marcadas (Bouchez, 1998; Mascher *et al.*, 2014; Mascher *et al.*, 2013).

1.2.3. Mejora vegetal y demanda de alimentos con el cambio global

El desarrollo de nuevas variedades mediante la mejora, junto con innovaciones en las prácticas agronómicas, ha aumentado notablemente la producción en los años 60 y 70 del siglo pasado. Sin embargo, algunos estudios recientes indican que los rendimientos no siguen aumentando en diversas regiones del mundo (Ray *et al.*, 2013). La demanda de alimentos está subiendo también desde 1960 y puede incrementarse en 100-110 % en el período 2005-2050 (Tilman *et al.*, 2011). Las producciones de grandes cultivos como el trigo, el arroz, el maíz y la soja están creciendo del 0.9 al 1.6 % anual, lo cual es menos que el 2.4 % anual requerido para doblar la producción global en 2050 (Ray *et al.*, 2013). Las variaciones en el clima pueden explicar alrededor del 10 % del estancamiento de las producciones observado en Europa durante las dos últimas décadas. Así, los cambios en la temperatura y la precipitación han reducido los rendimientos medios del trigo y la cebada un 2.5 y un 3.8 %, respectivamente (Moore and Lobell, 2015). En un estudio con 138 accesiones de cebada, la producción de grano disminuyó un 29 % con aumentos conjuntos de temperatura (+5 °C) y concentración de CO₂ (700 μmol mol⁻¹), a pesar del 16 % de aumento de producción inducido por el CO₂ elevado (Ingvordsen *et al.*, 2015). Junto con las políticas de subsidio agrícola y conservación ambiental (Moore and Lobell, 2015), la proximidad al máximo teórico de adscripción de biomasa a la parte cosechable de los cultivos es la causa probable del declive en el crecimiento de la producción (Long *et al.*, 2006; Parry *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008). La ampliación del área cultivada no es una opción sostenible, y por tanto, en una atmósfera con CO₂ creciente, tendrá que mejorar la productividad de la superficie agraria actual.

1.3. Las plantas ante una atmosfera cambiante: el CO₂

Los flujos de carbono (C) dentro y fuera de la biosfera terrestre están más o menos en equilibrio, esto es, la absorción de C en la fotosíntesis se aproxima a las emisiones de C de los procesos respiratorios, incluidos los heterotróficos. Existen desequilibrios entre captación y liberación que se reflejan en la concentración de CO₂ en la atmósfera y que pueden ocurrir a muy largo plazo, como por ejemplo,

por efecto de las oscilaciones orbitales que provocaron glaciaciones y disminuyeron la concentración de CO₂ en la tierra (Prentice *et al.*, 2011), o a muy corto plazo, como por ejemplo, el efecto de erupciones volcánicas (Gu *et al.*, 2003). La concentración de CO₂ en la atmosfera se ha incrementado en los últimos 800.000 años, pero el aumento rápido y sostenido en los últimos dos siglos no tiene precedentes, ya que ha alcanzado un 40 % desde los tiempos pre-industriales. Un aumento que principalmente ha sido causado por las emisiones de combustibles fósiles y secundariamente por las emisiones netas del uso del suelo, y corregido por la absorción neta de C de los océanos y la absorción desde la biosfera, es decir, la fotosíntesis. El cambio climático afectará a los procesos del ciclo de carbono de una manera que exacerbará el aumento de CO₂ y se prevé que esta tendencia continúe, situando las concentraciones de CO₂ atmosférico para final de este siglo en más del doble de la concentración actual (IPCC, 2013). Este cambio composicional de la atmosfera y su efecto en la fisiología y desarrollo de las plantas ha sido objeto de muchas investigaciones en los últimos 30 años (Drake *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2004; Norby and Zak, 2011; Stitt, 1991). Cultivos y plantas hortícolas eran el parámetro de estudio de los primeros experimentos que investigaban el crecimiento vegetal bajo CO₂ elevado, a menudo con el objetivo de maximizar el crecimiento y el desarrollo de la planta en invernaderos comerciales (Wittwer and Robb, 1964). En esta línea, hay una fuerte evidencia fisiológica de que el CO₂ elevado aumenta el crecimiento de las plantas, con importantes consecuencias en el contexto del ciclo global de C.

La concentración de CO₂ atmosférico actúa como un fertilizante para el crecimiento vegetal, que a su vez conduce a un almacenamiento adicional de materia orgánica en la biomasa vegetal y detritus. Por lo que el aumento del almacenamiento de C en la biosfera terrestre crea una retroalimentación negativa sobre la tasa de acumulación de CO₂ en la atmósfera (Bonan, 2008; Cramer *et al.*, 2001). Pero la comprensión de cómo las plantas responden y podrían adaptarse a un futuro aumento de la concentración de CO₂ atmosférica es el objetivo vigente, que nos ayudará también a entender cómo están respondiendo actualmente y cómo se pueden haber adaptado al aumento que ya ha ocurrido. Para ello debe considerarse primero el proceso de la fotosíntesis y su enlace con el CO₂ atmosférico.

1.3.1. Fotosíntesis

La fotosíntesis es una orquestación de múltiples procesos biológicos físico-químicos, que convierten la energía lumínica en energía química y subsecuentemente se asimila el dióxido de carbono de la atmosfera en la planta. En el proceso de la fotosíntesis se pueden distinguir dos fases: una primera de absorción y conversión de energía luminosa en energía electroquímica y redox (ATP y NADPH), y otra segunda, de asimilación de elementos químicos esenciales para la síntesis biomolecular (ciclo de Calvin-Benson). Si bien la medición de ambos tipos de reacciones es informativa, la combinación de las dos puede proporcionar información adicional acerca de la asignación de recursos de la planta, la eficiencia de utilización y la salud general.

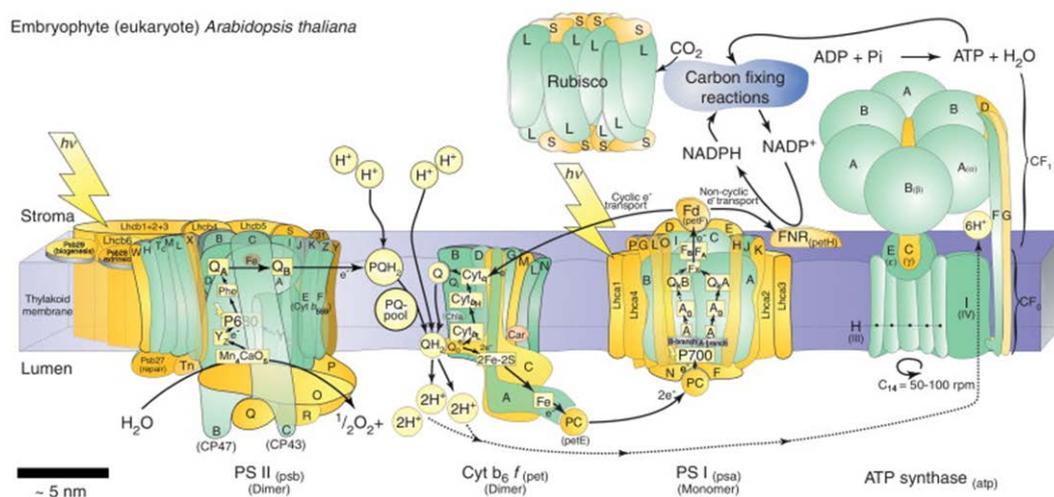


Figura 1.5. Proteínas y complejos de proteínas del aparato fotosintético (Allen *et al.*, 2011).

En las plantas C3 el proceso fotosintético se desarrolla en los cloroplastos, localizados mayoritariamente en los tejidos fotosintéticos como las hojas, que son órganos especializados en esta función. Los cloroplastos están separados del citosol por una envoltura de doble membrana. Estas membranas tilacoidales incluyen todo el aparato biomolecular necesario para llevar a cabo la primera fase de la fotosíntesis, es decir, son las membranas fotosintéticas donde se encuentran los cuatro complejos proteínicos que funcionan hasta producir NADPH y ATP (Fig. 1.5). El uso de la energía lumínica por dos de estos complejos, llamados

fotosistemas (Fotosistema II (PSII), Fotosistema I (PSI)), se produce gracias a una serie de moléculas con capacidad redox reversible que poseen engarzadas en su esqueleto. La captura de la luz la realizan los complejos de clorofilas y otros pigmentos con proteínas, los cuales operan como antenas y canalizan la energía de excitación a los centros de reacción de los fotosistemas, donde se utiliza para crear un gradiente de electrones. El PSII es una agua-plastoquinona oxidoreductasa. Su clorofila a P680 es el donante primario de electrones, los cuales transfiere a la feofitina y esta, a su vez, a las plastoquinonas enlazadas Q_A y Q_B . El $P680^+$ es reducido por el agua por mediación del complejo de manganeso, que está asociado con la proteína D1 del centro de reacción. El PSI es una plastocianina ferredoxina oxidoreductasa. La ferredoxina transfiere electrones a la ferredoxina- NADP reductasa, la cual cede dos electrones al NADP para dar NADPH, producto final de la cadena de transporte de electrones. El tercer complejo, que conecta los dos fotosistemas, es el citocromo b6f, una plastoquinol- plastocianina oxidoreductasa translocadora de protones desde el estroma del cloroplasto al lumen de los tilacoides. El cuarto complejo, la ATP sintasa, es una hidrolasa de ATP translocadora de protones que no interviene en la transferencia electrónica. Dicha transferencia establece un gradiente de concentración de protones a través de las membranas que impulsa la reacción de la ATPasa en la dirección de síntesis de ATP (Allen *et al.*, 2011).

La velocidad de transporte fotosintético de electrones depende de la radiación capturada. La absorbancia de las hojas aumenta con su contenido de clorofila (toda ella enlazada a proteínas), de modo que, con intensidades de luz bajas, la velocidad de fotosíntesis aumenta con el contenido de clorofila (Hikosaka and Terashima, 1995). Sin embargo, con iluminancia creciente la eficiencia con la que se utiliza la luz, o eficiencia cuántica, disminuye (Walters *et al.*, 2003), como se comprueba con medidas de la fluorescencia de la clorofila (Gutierrez *et al.*, 2009). Una razón para esta disminución es que el gradiente de protones a través de los tilacoides ejerce una “contrapresión” sobre el transporte de electrones, porque es más difícil introducir un nuevo protón en un espacio que ya tiene una concentración alta (Walker, 1987). La velocidad de transporte de electrones depende también del uso de sus productos, principalmente en la asimilación de CO_2 . Las restricciones en la carboxilación pueden disminuir la proporción de centros del PSII con Q_A oxidada

(centros abiertos), o la velocidad de excitación de los centros abiertos (Baker *et al.*, 2007). En condiciones de exceso de luz, el complejo de captura de luz o antena del PSII cambia a un estado en el que la energía no utilizable, potencialmente lesiva, se disipa como calor. Este proceso, conocido como extinción no fotoquímica, ocurre por un cambio de conformación en los complejos de captura de luz que los capacita para disipar la energía. Dicho cambio se inicia con el aumento del gradiente de pH a través de los tilacoides y está controlado por el ciclo de las xantofilas. La extinción no fotoquímica protege al PSII del daño fotooxidativo (Horton *et al.*, 2008). Sin embargo, las reacciones de transferencia de electrones tienen un alto potencial redox y efectos colaterales que conducen a dicho daño oxidativo. El PSII tiene una maquinaria eficiente y dinámicamente regulada para su reparación, de forma que solo se inhibe su actividad cuando la velocidad de daño supera a la de reparación (Tikkanen *et al.*, 2014).

En la segunda fase de la fotosíntesis tiene lugar la asimilación del CO₂, que origina productos de carboxilación como son las triosas fosfato, que posteriormente pasarán a ser moléculas de azúcares sencillos (glucosa, fructosa) o complejos (sacarosa y almidón). El ciclo de Calvin-Benson se puede dividir en tres etapas: fijación, reducción y regeneración (Fig. 1.6). La primera etapa, catalizada por la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), consiste en la adición de una molécula de CO₂ a la molécula aceptora ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP), con generación de dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA). En la segunda etapa estas dos moléculas son convertidas en gliceraldehído 3-fosfato (GAP) con consumo del ATP y NADPH producidos con el transporte fotosintético de electrones. De este modo, en tres vueltas del ciclo se fijan tres moléculas de CO₂ y se forman seis GAP. Una de estas moléculas se emplea para procesos biosintéticos, mientras que las otras cinco son usadas en la siguiente etapa. La tercera etapa es la más complicada y se compone de varios pasos de condensación e isomerización, generándose dos pentosas fosfato que se transformarán en RuBP con consumo de ATP, regenerándose así la molécula aceptora del CO₂ (Mathews and van Holde, 1995). Durante el ciclo, especialmente durante el día, las triosas fosfato puede ser desviadas al citosol a través de transportadores para la biosíntesis de sacarosa, mientras que una fracción de la fructosa-1, 6-bisfosfato producida en el ciclo de Calvin-Benson se dirige a la síntesis de almidón en el cloroplasto.

El ciclo reductivo de las pentosas fosfato es el único mecanismo conocido que puede producir y aumentar su propio sustrato. Es por tanto autocatalítico porque, dentro de ciertos límites, su velocidad aumenta al hacerlo la concentración de sustrato. El fenómeno de inducción, por el que se requieren varios minutos desde el final de un periodo en oscuridad para que la velocidad de fotosíntesis alcance el máximo, se debe en parte a la autocatálisis (Edwards and Walker, 1983). La inducción se explica también porque varias de las enzimas de la asimilación del carbono están inactivadas en la oscuridad y se activan en la luz. Este cambio está mediado principalmente por la reducción de algunos puentes disulfuro de las proteínas, realizada por el sistema ferredoxina-tiorredoxina. Las enzimas del ciclo de Calvin-Benson con activación reductiva son la fosforibulokinasa, la gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa, la fructosa-1, 6-bisfosfatasa y la sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa (Ruelland and Miginiac-Maslow, 1999). Otro punto de regulación del ciclo de Calvin-Benson es la Rubisco, cuya actividad se modula por carbamilación del sitio activo, por enlace fuerte de inhibidores a dicho sitio, y por la Rubisco activasa. Esta enzima facilita la liberación de dichos inhibidores, requiere ATP y funciona por tanto en la luz, y está sujeta a activación reductiva (Parry *et al.*, 2008; Portis *et al.*, 2008). Estos mecanismos de regulación contribuyen al control del flujo de carbono y aseguran que el ciclo de Calvin-Benson pueda continuar (Serrato *et al.*, 2009).

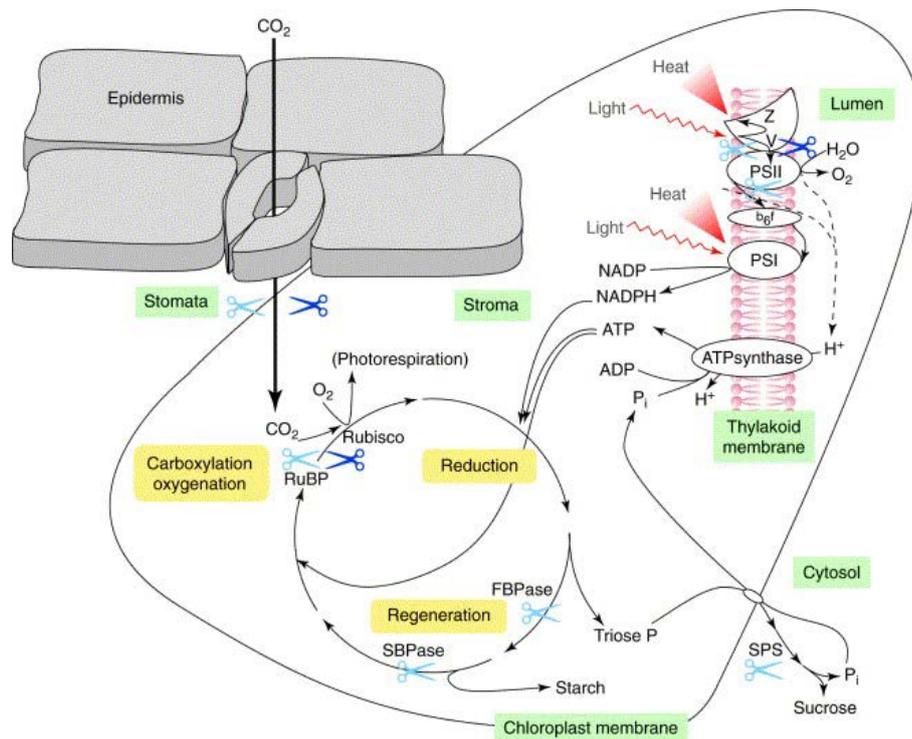


Figura 1.6. Etapas del ciclo de Calvin-Benson y acoplamiento con las reacciones lumínicas de la fotosíntesis y con la difusión del CO_2 desde la atmósfera (Allen and Ort, 2001).

Para determinar la fotosíntesis de una planta se han desarrollado diversos modelos, entre los que destaca el del Farquhar *et al.* (1980), a través del cual se puede interpretar las medidas de intercambio gaseoso de la asimilación de CO_2 de la hoja. Se emplea para predecir *in vivo* la velocidad de asimilación de carbono en el estado estable bajo diferentes condiciones ambientales como intensidad de luz, temperatura, presión parcial de CO_2 y O_2 . La principal innovación del modelo de Farquhar *et al.* (1980) partió de la apreciación de que los desacoplamientos entre las reacciones lumínicas y las de carboxilación son pequeñas. Por tanto, la velocidad de asimilación de CO_2 puede determinarse como la mínima de las velocidades potenciales de estos dos procesos tomados separadamente. Esto es, la velocidad de asimilación de CO_2 viene dada por una velocidad limitada por la Rubisco o por la regeneración de RuBP, regulada generalmente por el transporte de electrones, y a veces una velocidad limitada por el consumo de triosas fosfato (von Caemmerer, 2013). Las ecuaciones de este modelo que relacionan la velocidad de transporte de electrones con la intensidad lumínica continúan siendo empíricas, a diferencia con las ecuaciones bioquímicas propias de la carboxilación, que están

basadas en las propiedades cinéticas de la Rubisco. El modelo predice que la velocidad de asimilación de CO_2 se incrementaría con la concentración de CO_2 , siendo limitada únicamente por la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco, hasta un punto de inflexión a partir del cual quedaría limitada por la velocidad potencial de transporte de electrones y regeneración del aceptor de CO_2 , la RuBP. Un inconveniente de este modelo es que depende del conocimiento de la presión parcial de CO_2 en el cloroplasto, el lugar de carboxilación de la Rubisco. Inicialmente el modelo suponía que la presión parcial de CO_2 en el cloroplasto era la misma que la de los espacios intercelulares de la hoja, considerando que la conductancia del mesófilo era infinita. Actualmente se sabe que el mesófilo restringe la difusión del CO_2 hasta el cloroplasto en una medida que varía con la especie vegetal y las condiciones ambientales (Flexas *et al.*, 2008). El modelo original se ha modificado para incluir el CO_2 en el cloroplasto, calculado mediante diferentes procedimientos (Flexas *et al.*, 2008). Otro inconveniente del modelo es el gran número de parámetros que incluye, que dificulta el ajuste de las curvas de respuesta al CO_2 derivadas de las medidas de intercambio gaseoso. Para resolverlo se han desarrollado diversos protocolos (Ethier and Livingston, 2004; Gu *et al.*, 2010; Sharkey *et al.*, 2007).

Es importante saber que la enzima Rubisco no está saturada por sustrato (CO_2) en condiciones atmosféricas normales (21 % de O_2 , 0.039 % CO_2), y además, puede catalizar la reacción de la RuBP con una molécula de O_2 en lugar de con una de CO_2 , iniciándose con ello la fotorrespiración, en la que se consume ATP y poder reductor y se desprende parte del CO_2 anteriormente fijado (Wingler *et al.*, 2000). El CO_2 inhibe competitivamente esta reacción de oxigenación. Por estas dos razones, el enriquecimiento en CO_2 de la atmósfera previsto para el futuro, aumenta la fotosíntesis (Stitt, 1991). Según Long *et al.* (2004), en el rango de concentración de CO_2 atmosférico correspondiente a las previsiones futuras, los únicos puntos en el metabolismo donde hay evidencia convincente de que existe una respuesta a la concentración de CO_2 , son la apertura de los estomas y la enzima Rubisco. A continuación se consideran estas dos respuestas.

1.3.2. Respuesta de las plantas al CO₂ elevado: los estomas

La concentración de CO₂ en el aire alrededor de las hojas influye en su crecimiento, ya que es el principal sustrato para constituir la biomasa de la planta. Debido a que la cutícula de la planta es comparativamente poco permeable al CO₂ (Boyer *et al.*, 1997), la toma de CO₂ en las plantas está regulada por la apertura y cierre de los estomas. Son poros formados por dos células oclusivas, que en cebada están rodeadas, a su vez, por las células subsidiarias. La difusión del CO₂ desde la atmósfera hasta los cloroplastos, donde tendrá lugar la fijación del dióxido de carbono gracias a la actividad carboxilasa de la enzima Rubisco, transcurre a través de una serie de barreras. El CO₂ difunde desde el aire hasta el cloroplasto atravesando la capa límite, los estomas y los espacios aéreos del interior de la hoja, además de la fase líquida en el interior de la misma. En cada una de estas barreras disminuye la concentración de CO₂, agrupándose así estos impedimentos foliares al paso del CO₂ en dos tipos, la resistencia de la fase gaseosa y la resistencia de la fase líquida (Evans *et al.*, 2009). Para la difusión de CO₂ a través de la fase gaseosa, los estomas deben estar abiertos y son las células oclusivas las que se encargan de este fenómeno. Como consecuencia de esta apertura, las superficies húmedas del interior de la hoja se exponen a la atmósfera, lo que provocará una pérdida de agua, si la humedad del ambiente no es saturante. Debido a este efecto, en climas desfavorables desde el punto de vista hídrico, la pérdida de agua por mantener los estomas abiertos puede ser crítica para la planta (Outlaw, 2003). Por otro lado, dentro de la fase líquida, el CO₂ llega al cloroplasto gracias a aquaporinas, a pesar de ser una molécula lipofílica y apolar que aparentemente difundiría a través de las membranas (Flexas *et al.*, 2006).

1.3.2.2. Respuestas directas de los estomas al CO₂

Las plantas sólo pueden percibir un cambio en la concentración atmosférica de CO₂ a través de los tejidos que están expuestos a la intemperie. En el corto plazo, la apertura de los estomas generalmente disminuye en respuesta a altas concentraciones de CO₂ y a otros estímulos, como oscuridad, sequía, la fitohormona ABA, o elevadas concentraciones de ozono. Su apertura es inducida

por la humedad alta, la luz azul y roja, la iluminación intensa y la concentración baja de CO₂ (Outlaw, 2003; Vahisalu *et al.*, 2008). A largo plazo, la disminución de la conductancia estomática con el CO₂ elevado puede ser causada por cambios en la densidad de los estomas, el índice estomático (el porcentaje de estomas en las células epidérmicas), así como la apertura de los estomas (Lake *et al.*, 2001). La detección de CO₂ es un tema en debate, pero parece una propiedad intrínseca tanto de células oclusivas (Assmann, 1999) como de las del mesófilo (Mott *et al.*, 2008). Además, la apertura de los estomas responde a la concentración intercelular de CO₂ y no a la concentración de CO₂ en la superficie de la hoja (Mott, 1988). Sin embargo, el mecanismo por el cual el CO₂ controla los movimientos estomáticos es en gran parte desconocido. Actualmente existen varios mecanismos propuestos, a través de los cuales las células oclusivas generan una respuesta señalizada por calcio o por especies reactivas de oxígeno (Murata *et al.*, 2015). El ácido abscísico y los niveles elevados de CO₂ activan una señalización compleja en las células oclusivas que está mediada por quinasas, mensajeros secundarios, y la regulación de canales iónicos (Figura 1.7).

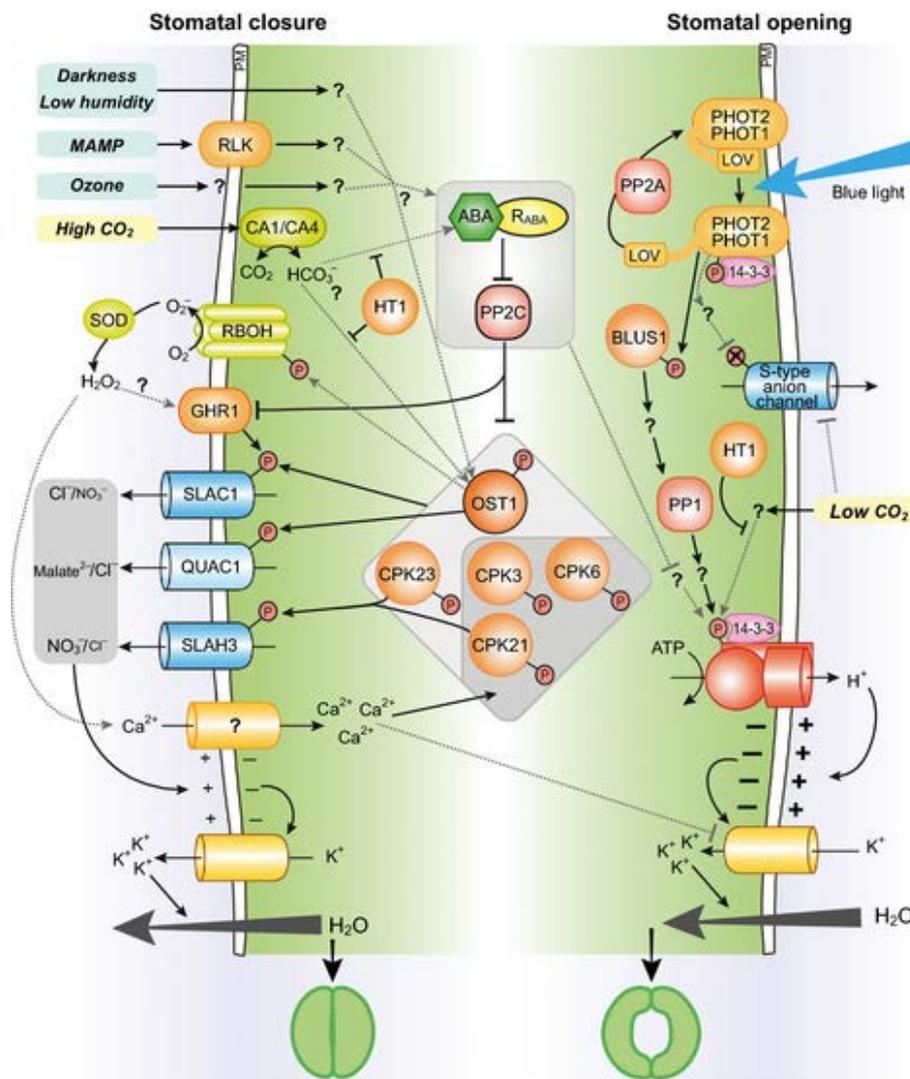


Figura 1.7. Mecanismos de apertura y cierre estomático (Kollist *et al.*, 2014).

A nivel celular, el incremento o descenso en la turgencia de las células oclusivas provoca la apertura o cierre estomático (Raschke, 1975). Este incremento de turgencia viene acompañado por un aumento de superficie y volumen de las vacuolas, lo que las implica en la apertura estomática. En cambio, durante el cierre estomático y pérdida de turgencia de las células oclusivas, no se observa que paralelamente haya una pérdida en la vacuola. Más bien, parece actuar como reservorio de membrana plasmática, ya que hay una serie de estructuras endosómicas que surgen en el lumen de la membrana vacuolar en el momento del cierre estomático (Sano *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2007). En las células oclusivas, la concentración de iones y solutos orgánicos determina la presión de turgencia,

provocando el movimiento de los estomas. Electrofisiológicamente, existe una despolarización de la membrana plasmática de las células oclusivas, mecanismo por el que disminuye la turgencia, traducándose en el cierre de los estomas (Assmann, 1999). La hiperpolarización, a su vez, aumenta la presión de turgencia y el volumen de las células oclusivas, induciendo la apertura estomática. Esta hiperpolarización está causada por la activación de H^+ -ATPasas que provocan la toma de iones de potasio (K^+) a través de canales de K^+ a favor de gradiente. La toma de potasio se ve acompañada de iones como el cloruro, nitrato y sulfato, además de la síntesis de malato. Estos metabolitos, junto con la acumulación de sacarosa, incrementan la presión de turgencia de las células oclusivas y por lo tanto provocan la apertura estomática. La toma de osmolitos en el citosol representa solamente un paso intermedio hacia la acumulación final en la vacuola, donde acabara por almacenarse el 90 % de los solutos. Esta acumulación de K^+ en las vacuolas es un requisito para la apertura estomática, además de ser un componente crítico para la homeostasis general de K^+ , esencial para el cierre estomático (Andres *et al.*, 2014). La despolarización y el cierre estomático se inicia en presencia de altas concentraciones de calcio citosólico (Ca^{2+}) y con la activación de canales lentos de salida de iones de cloruro (SLAC1) y de liberación de iones de nitrato (SLAH3), ambos regulados por la proteína quinasa tipo SnRK2, independiente de Ca^{2+} , OST1, y proteínas quinasa dependientes de Ca^{2+} (CPK21-23). También se sabe que la proteína quinasa CPK6 activa SLAC1 y que coordina la inhibición de los canales de entrada por gradiente de potasio, impidiendo la apertura de estomas. El sulfato y los ácidos orgánicos salen de la célula a través de canales iónicos tipo R (rápidos), y de este modo la pérdida de presión de turgencia se traduce en el cierre estomático (Kollist *et al.*, 2014).

Los estímulos como el CO_2 provocan cambios en el potencial de membrana de las células oclusivas, aumentando la concentración de Ca^{2+} y alterándose así la dirección de transporte de K^+ y la actividad de los canales iónicos de membrana, tipo S y R. La liberación de malato de las células del mesófilo y de las células oclusivas en respuesta a niveles elevados de CO_2 induciría el cierre estomático por la activación de los canales de aniones, dando lugar a su salida. El malato liberado de las células oclusivas proporcionaría una retroalimentación positiva mediante la estimulación de más canales tipo R (Kim *et al.*, 2010). Se han identificado varios

mutantes que operan en la señal estomática regulada por CO₂ en las células oclusivas. Schroeder and Hagiwara (1989) demostraron que los canales iónicos de tipo S son parte de un mecanismo central del cierre estomático mediado por ABA y alto CO₂ y que la proteína SLAC1 es un mediador positivo del cierre estomático por CO₂. Hashimoto *et al.* (2006) mostraron que la proteína quinasa HT1 es un regulador negativo del cierre estomático por alto CO₂ que actúa metabólicamente antes de la convergencia de los mecanismos que median la respuesta estomática por ABA y CO₂. Lee *et al.* (2008) identificaron un importador de malato de la membrana plasmática de las células oclusivas (AtABCB14) como regulador negativo del cierre estomático por CO₂. Y más recientemente, Hu *et al.* (2010) en dobles mutantes de anhidrasa carbónica (β CA1-4), con su posterior complementación con una anhidrasa de mamíferos, encontraron que el CO₂-HCO₃⁻ transfiere la señal para la regulación de los canal iónicos que median los movimientos estomáticos.

1.3.1.2. Respuestas de los estomas al CO₂ mediadas por la fotosíntesis

La conductancia de los estomas y la fotosíntesis están generalmente correlacionados de forma que la razón entre la concentración de CO₂ en los espacios intercelulares de la hoja y la concentración externa es prácticamente constante (Farquhar and Wong, 1984; Sharkey and Raschke, 1981). Por sí misma, la concentración intercelular de CO₂ no puede regular la correlación entre fotosíntesis y conductancia (Wong et al., 1979), y el mecanismo subyacente se desconoce todavía. Se ha propuesto la hipótesis de que la respuesta de la conductancia al CO₂ intercelular está controlada por el balance entre la capacidad de transporte fotosintético de electrones y de carboxilación por Rubisco (Farquhar and Wong, 1984), ya sea en las células oclusivas o en el mesófilo. Alternativamente, el estado redox de los componentes de la cadena de transporte de electrones (Busch, 2014) podría regular esta respuesta. Un aumento en la capacidad de transporte de electrones y sus productos, como ATP, NADPH o Ribulosa-1, 5-bisfosfato en relación a la capacidad Rubisco (Ainsworth and Rogers, 2007; Messinger *et al.*, 2006), o mayor reducción de la plastoquinona y los elementos anteriores de la cadena de transporte de electrones (Busch, 2014), aumentaría la conductancia. El transporte fotosintético de electrones puede aportar el ATP

requerido para el bombeo de H^+ y la absorción de cationes en la membrana plasmática de las células oclusivas (Tominaga *et al.*, 2001). Alternativamente, el estado redox de la cadena de transporte de electrones podría conectarse con los movimientos de los estomas a través de una ruta de señalización desconocida hasta ahora (Busch, 2014). Esta hipótesis no se concilia con la observación de plantas transgénicas con contenidos bajos de aldolasa (Haake *et al.*, 1998), fructosa-1,6-bisfosfatasa (Muschak *et al.*, 1999), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Price *et al.*, 1998), Rubisco o citocromo b_6f (Baroli *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 1992; Quick *et al.*, 1991; von Caemmerer *et al.*, 2004), en las cuales la asimilación de CO_2 se inhibe, pero la conductancia de los estomas es similar a la del genotipo silvestre. No obstante, en plantas mutantes antisentido para sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa (SBPasa), en las que la capacidad regenerativa del ciclo de Calvin-Benson disminuyó sin ningún efecto en la eficiencia de la carboxilación, el cierre de los estomas en respuesta al aumento de CO_2 intercelular disminuyó en comparación con el genotipo silvestre (Lawson *et al.*, 2008). Esta mutación podría producir un aumento de los niveles de ATP cloroplástico.

Los inhibidores del transporte de electrones en el PSII 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) (Messinger *et al.*, 2006; Sharkey and Raschke, 1981; Tominaga *et al.*, 2001) y cianazina (2-cloro-[1-ciano-1-metiletilamino]-6- etilamino-S-triazina) (Sharkey and Raschke, 1981) y el inhibidor de la síntesis de carotenoides norflurazon (Hu *et al.*, 2010; Roelfsema *et al.*, 2006) se han usado para valorar la dependencia de la conductancia de los estomas con respecto a la fotosíntesis. Estos compuestos disminuyeron la conductancia y aumentaron su respuesta al aumento de CO_2 en *Gossypium hirsutum* (Sharkey and Raschke, 1981) y bajaron la conductancia hasta prácticamente cero en *Xanthium strumarium* cuando el transporte fotosintético de electrones se bloqueó por completo en toda la hoja (Messinger *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que los estomas responden a los cambios de concentración de CO_2 mediante un mecanismo que depende del transporte fotosintético de electrones. Sin embargo, en ausencia de transporte de electrones los estomas mantienen la respuesta al CO_2 intercelular (Hu *et al.*, 2010; Messinger *et al.*, 2006; Roelfsema *et al.*, 2006), lo cual apunta a un segundo mecanismo que no depende de las reacciones fotoquímicas. En efecto, las células oclusivas pueden percibir directamente el CO_2 (Mott, 1988; Roelfsema *et al.*,

2006), como se hace evidente en los estudios con mutantes que carecen de algunos componentes de la red de señalización del CO₂ en las células oclusivas expuesta en el apartado anterior (Geiger *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Merilo *et al.*, 2013; Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2011). En mutantes con capacidad fotosintética reducida, la disminución de la sensibilidad de los estomas al CO₂ podría deberse a una alteración en la ruta de transducción de la señal de CO₂ en las células oclusivas.

1.3.3. Respuesta de las plantas al CO₂ elevado: la Rubisco

En plantas C₃, aunque variando según la fisiología y genética de cada planta, el incremento de la concentración intercelular de CO₂ (C_i) se traduce en un incremento complejo de la velocidad fotosintética neta (A) de 19-46 %. (Leakey *et al.*, 2012). Este incremento en respuesta al C_i no siempre se ve sostenido en el tiempo, efecto conocido como aclimatación fotosintética (Gutierrez *et al.*, 2009; Leakey *et al.*, 2009; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005). En CO₂ elevado, a pesar del cierre parcial de los estomas, la limitación que estos imponen a la fotosíntesis disminuye y es despreciable (Long *et al.*, 2004). La conductancia del mesófilo disminuye también en valores altos de CO₂, con los que la fotosíntesis no está limitada por el CO₂ (Flexas *et al.*, 2007). La aclimatación o disminución de la capacidad fotosintética con el crecimiento prolongado en CO₂ alto se debe principalmente a una reducción de la capacidad de carboxilación de la enzima Rubisco (Leakey *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2004; Raines, 2006). Esa disminución va acompañada de una reducción selectiva de la cantidad de enzima (Pérez *et al.*, 2005) y según algunos estudios, una reducción en la cantidad de Rubisco activasa (Aranjuelo *et al.*, 2011), el estado de activación o carbamilación de la enzima y, con temperatura ambiente, su constante catalítica (Pérez *et al.*, 2011a). Pero principalmente esa pérdida de capacidad viene dada por una menor cantidad de enzima sin asumir pérdida de su actividad (Ainsworth and Long, 2005; Leakey *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2004).

La exposición prolongada a niveles elevados de CO₂ causa un aumento en el contenido de carbohidratos que podría reprimir genes fotosintéticos, como los responsables de la síntesis y ensamblaje de la enzima Rubisco (Ainsworth and

Long, 2005; Leakey *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2004; Stitt, 1991; Stitt, 1999). La acumulación de carbohidratos en CO₂ elevado se debe a la capacidad limitada de sumideros, y por lo tanto a una limitación en el uso de fotosintatos (Stitt, 1991), como demuestran los estudios con especies con una gran capacidad de exportación de azúcares, que significativamente, no muestran síntomas de aclimatación (Makino and Mae, 1999). Sin embargo, la existencia de una relación causal entre acumulación de carbohidratos e inhibición de la fotosíntesis es controvertida. A pesar de la relación entre los cambios diurnos en los niveles de carbohidratos y la expresión génica para Rubisco, la correspondencia entre niveles de transcritos y acumulación de azúcares solubles en diferentes fases del desarrollo es variable (Geiger *et al.*, 1999; Nie *et al.*, 1995b). Además, estudios con plantas con acumulación de carbohidratos impedida muestran el papel fundamental del nitrógeno, a nivel bioquímico y molecular, para la gestión del carbono suplementario asimilado, de forma que su limitación conduciría a la aclimatación (Ainsworth *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2002). Con disponibilidad alta de nitrógeno, los carbohidratos aumentan en CO₂ elevado, pero no se observa aclimatación de la fotosíntesis o descenso en los transcritos de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson (Geiger *et al.*, 1999). Más aún, comparando diferentes especies, Moore *et al.* (1998) observaron que las disminuciones de proteína Rubisco y de transcritos para la misma no estuvieron correlacionadas. Estos resultados indican que puede haber otros factores conducentes a la disminución de Rubisco en las especies con aclimatación acusada al CO₂ elevado.

La disminución de proteína Rubisco en CO₂ elevado está acompañada con frecuencia por un descenso del total foliar de proteína soluble (Sicher and Bunce, 1997) y nitrógeno (Nakano *et al.*, 1997), lo que sugiere que el efecto del CO₂ elevado en la Rubisco se debe al estado nitrogenado (Farage *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1997; Riviere-Rolland *et al.*, 1996). El origen de la menor cantidad de nitrógeno por área que produce con el crecimiento en CO₂ elevado, puede ser la redistribución de nitrógeno a nivel de la planta entera, o de unos a otros compartimentos celulares (Fukayama *et al.*, 2011; Makino and Mae, 1999), o una aceleración de la senescencia (Seneweera *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009). También se ha considerado que es una consecuencia del aumento del crecimiento en CO₂ elevado, que provoca una limitación de nitrógeno (Stitt and Krapp, 1999).

Otros autores apuntan a que hay una menor absorción de nitrógeno por la planta (Del Pozo *et al.*, 2007; Taub and Wang, 2008), o una menor asimilación de nitrato (Bloom *et al.*, 2014; Bloom *et al.*, 2010), aunque estos resultados no son generales (Stitt, 1999).

Es posible que las señales derivadas del metabolismo del nitrógeno modulen la detección de azúcares, o que exista interacción entre carbohidratos y las vías de señalización de nitrógeno (Foyer *et al.*, 2011; Stitt, 1999). Alternativamente, la disminución de la fotorrespiración con el aumento del CO₂ puede conducir a una mayor relación NADP/NADPH, limitando por tanto el poder reductor para el metabolismo del nitrógeno (Driever and Kromdijk, 2013; Kaiser *et al.*, 2000). Bloom *et al.* (2012) sugieren incluso que la capacidad del metabolismo del nitrato de las plantas C3 podría haberse aclimatado históricamente a las concentraciones de CO₂ atmosféricas (es decir, inferiores a las presentes) y esa capacidad podría verse reducida en las condiciones atmosféricas actuales.

1.4. Aumento de la eficiencia fotosintética en CO₂ elevado

Se acepta generalmente que el único modo de mejorar el potencial de producción, especialmente frente al cambio climático, es la estimulación de la eficiencia en el uso de la radiación solar (Driever *et al.*, 2014). Los estudios realizados con cultivos bajo CO₂ elevado (Long *et al.*, 2006), y las simulaciones con modelos (Zhu *et al.*, 2010), indican que el aumento de la eficiencia fotosintética puede acrecentar la eficiencia en la conversión de la energía solar, y por tanto la producción de los cultivos, haciendo posible satisfacer la demanda global de alimento (Rosenthal *et al.*, 2011) en la atmósfera futura, rica en CO₂.

A medida que aumenta el CO₂, la fotosíntesis de estas plantas pasa de una limitación por Rubisco a una controlada por la regeneración de Ribulosa-1, 5-bisfosfato (RuBP) (Hudson *et al.*, 1992). Por tanto, una vía para aumentar la adaptación al enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera puede ser impulsar la capacidad de regeneración de RuBP para acompañarla con las tasas incrementadas de carboxilación. En algunas especies cultivadas en CO₂ elevado, se han

encontrado señales de reducción en la cantidad de Rubisco y aumentos en la capacidad de movilización de los productos fotosintéticos (Sage, 1994). De modo similar, hay evidencia de aumentos en la capacidad de regeneración de RuBP de los cultivos en CO₂ elevado. Así, los niveles de fructosa-1, 6-bisfosfatasa aumentaron en *Lolium perenne* cultivado con suministro abundante de nitrógeno (Rogers *et al.*, 1998), y el contenido de Rubisco disminuyó al tiempo que el de otros enzimas del ciclo de Calvin-Benson aumentaba en el tabaco (Geiger *et al.*, 1999). Los impactos sobre la fotosíntesis de los cambios en la actividad de varios enzimas del ciclo de Calvin-Benson y el transporte fotosintético de electrones se han estudiado con plantas transformadas con genes antisentido. Con reducciones de más del 50 % en los contenidos de algunos de estos enzimas, se ha concluido que varios de ellos están en exceso. Entre estos enzimas están la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Price *et al.*, 1995), la fructosa-1, 6- bisfosfatasa (Kobmann *et al.*, 1994), la fosforibuloquinasa (Paul *et al.*, 1995), la aldolasa cloroplástica (Haake *et al.*, 1998) y, con luz moderada, pero no con luz intensa, la Rubisco (Stitt *et al.*, 1991). En cambio, la fotosíntesis es sensible a pequeñas reducciones de transcetolasa (Henkes *et al.*, 2001) y sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa (SBPasa) (Raines *et al.*, 2000). Las disminuciones del contenido de citocromo b6f, involucrado en el transporte fotosintético de electrones y por tanto en la regeneración de RuBP, inhiben la fotosíntesis (Price *et al.*, 1998; Yamori *et al.*, 2011). La sobreexpresión de SBPasa aumentó la fijación de carbono (Lefebvre *et al.*, 2005) y la estimulación de la fotosíntesis en plantas crecidas en CO₂ elevado (Rosenthal *et al.*, 2011). El aumento de la fotosíntesis varió con el desarrollo de la planta, siendo mayor en hojas jóvenes que en las que estaban completamente extendidas (Lefebvre *et al.*, 2005). Junto con estos estudios experimentales, una simulación numérica para optimizar la distribución de recursos entre las enzimas del metabolismo del carbono en CO₂ elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), condujo a la conclusión de que deberían disminuir la Rubisco y los enzimas de la fotorrespiración, mientras que deberían aumentar otras enzimas del ciclo de Calvin-Benson, de la síntesis de sacarosa en el citosol y también la ADP-glucosa pirofosforilasa, de la síntesis de almidón (Zhu *et al.*, 2007). Estas investigaciones indican que hay perspectivas de aumento de la eficiencia fotosintética mediante manipulación, con mejora convencional, biotecnología o mutagénesis, de las enzimas involucradas en la fijación y el metabolismo del carbono.

1.5. Objetivos

El estudio con plantas de cebada mutagenizadas y seleccionadas en condiciones de CO₂ elevado puede proveer de una importante ventaja a la hora de identificar las limitaciones en la fotosíntesis y el crecimiento en esta atmósfera futura, como base para obtener germoplasma y semillas que aumenten la producción en una agricultura respetuosa con el ambiente. Esto contribuirá a minimizar los problemas y maximizar los beneficios de los impactos del cambio climático sobre los cultivos y ecosistemas. Partiendo de una línea de cebada mutagenizada y seleccionada en CO₂ elevado, el objetivo de esta investigación es:

Conocer los cambios transcripcionales, bioquímicos y fisiológicos implicados en la respuesta de la cebada al enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera, para intensificar dicha respuesta con nuevas variedades obtenidas mediante mejora genética.

Este objetivo general comprende los siguientes objetivos concretos:

- Caracterizar el mutante G132 de cebada examinando sus diferencias con el genotipo silvestre Graphic en la fotosíntesis, el metabolismo y la expresión génica, con sus consecuencias en el crecimiento y la producción.
- Averiguar si las respuestas de adaptación al CO₂ elevado de la fotosíntesis, el metabolismo del carbono y el nitrógeno, y la expresión génica, difieren en el mutante y el genotipo silvestre

Dado que el efecto principal del aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera es una estimulación de la fotosíntesis, determinados cambios en este proceso pueden contribuir a la adaptación al cambio climático. La ampliación del conocimiento de los efectos de la alteración genética del mutante G132 de la cebada Graphic podrá contribuir a la selección de germoplasma y la obtención de nuevas variedades mejor adaptadas a las condiciones ambientales futuras.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

2.1.1. Obtención de mutantes

Para este trabajo se ha empleado un individuo aislado de cebada (*Hordeum vulgare L.*) de la variedad Graphic y se ha caracterizado fenotípicamente según unos estándares descritos para dicha variedad. Parte (600 g) de las semillas procedentes de este individuo, se expusieron a la acción de un agente químico mutagénico, la azida sódica. Otra parte (60 g) se mantuvo como control. Las semillas se sembraron en bandejas con alveolos en un invernadero con concentración de CO₂ atmosférico (C_a) elevada (750 μmol mol⁻¹) y las condiciones normales para la primavera del noreste de España. Un total de 25.200 plantas se clasificaron mediante la inspección de la primera hoja cuando la segunda estaba completamente desplegada. Se seleccionaron plantas susceptibles y tolerantes a las condiciones de cultivo, como las de menor y mayor altura en el conjunto, eligiendo finalmente unos 160 supuestos mutantes de esta generación M2. Las semillas de estas plantas (M3) se germinaron y cultivaron en una cámara de crecimiento con 2000 μmol mol⁻¹ de CO₂, iluminancia de 1000 μmol·m⁻²·s⁻¹, fotoperiodo de 16 h día/8 h noche, temperatura de 20 °C día/15 °C noche y humedad relativa de 60 %. La valoración de estos mutantes se efectuó visualmente, eligiendo 5 individuos que se caracterizaron cuantitativamente mediante análisis de imagen en base a la presencia de necrosis y clorosis foliar, comparada con una superficie verde. Finalmente se seleccionó para estudio posterior el mutante G132, tolerante ante concentraciones superelevadas de CO₂.

El mutante G132 fue cruzado con el genotipo parental y tras el retrocruzamiento con Graphic y selección de la progenie se obtuvo semilla de la generación BC1F1. De esta se seleccionaron 9 individuos, obteniéndose así semilla de la generación BC1F2, empleada en los experimentos descritos en esta Memoria (Fig. 2.1). Se analizaron las frecuencias de la segregación del carácter en la generación BC1F2 mediante tablas de contingencia y prueba chi-cuadrado (Ec. 2.1) para conocer si el carácter mutante en estudio era recesivo.

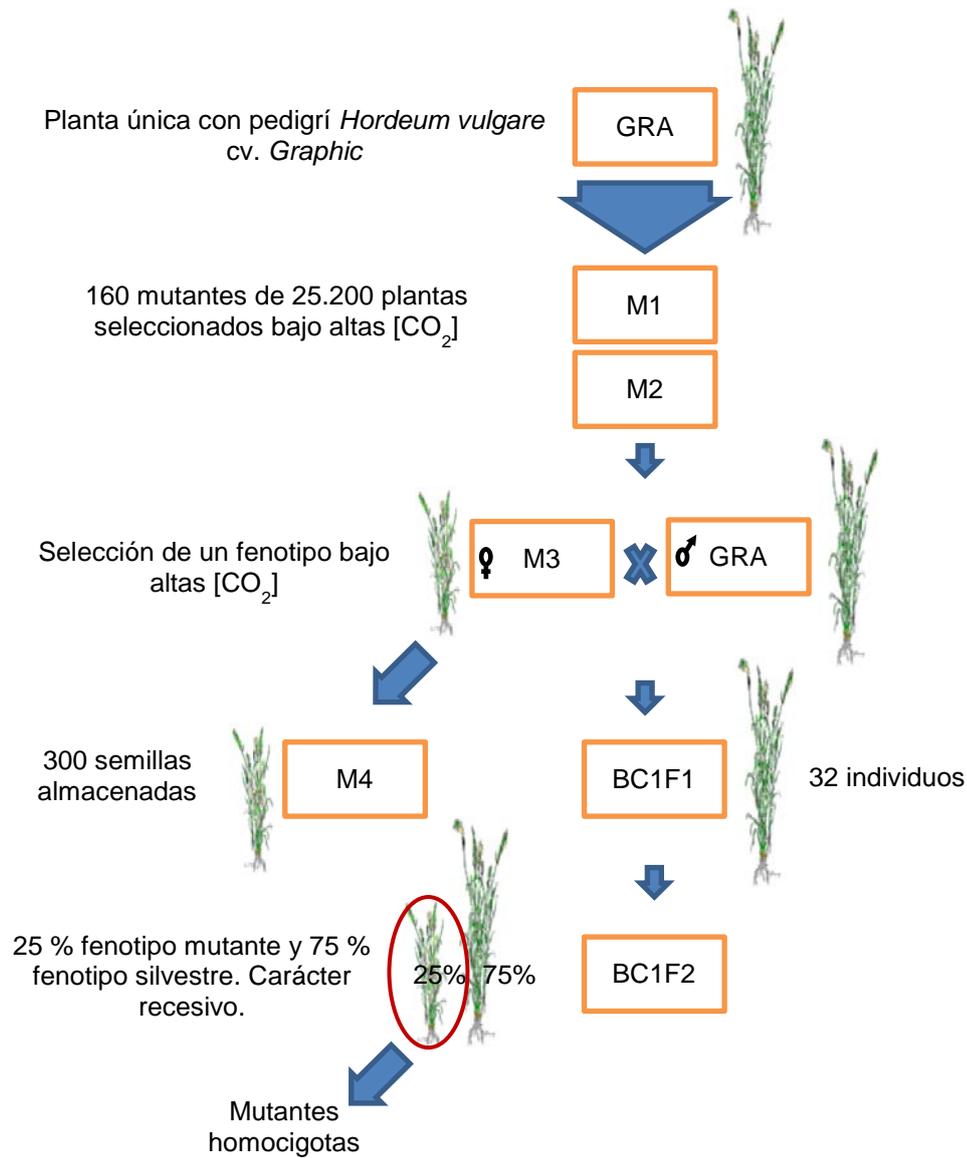


Figura 2.1. Esquema del procedimiento de obtención del mutante G132 de la cebada Graphic (GRA).

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(\text{observado}_i - \text{esperado}_i)^2}{\text{esperado}_i}$$

Ecuación 2.1. Fórmula Chi cuadrado para determinar la distribución de frecuencias.

Para comprobar que la línea mutante y silvestre compartían un fondo genético idéntico y pertenecían al mismo cultivar se genotiparon mediante un subconjunto optimizado de 384 marcadores repartidos en todo el genoma, incluidos en el

Barley OPA1 (Moragues *et al.*, 2010). Se usaron dos repeticiones por genotipo, cada una con cinco individuos escogidos al azar. Para ello se cultivaron semillas en placas de Petri con papel de filtro humedecido para facilitar la germinación. Una vez germinadas las plantas se extrajo DNA a partir de los cotiledones (DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen).

2.1.2. Condiciones de cultivo

Se realizaron tres cultivos experimentales, uno en invernadero encaminado a caracterizar funcionalmente el mutante G132, y dos en cámaras de ambiente controlado con objeto de investigar la adaptación al CO₂ elevado del mutante G132 comparado con el genotipo silvestre Graphic. Las plantas se cultivaron en bandejas de siembra con alveolos o/y en macetas de 5 l de volumen y 1.2 kg de mezcla de perlita y turba en proporción 1:4. Cada maceta fue fertilizada con 4 g de KNO₃ y 4 g de KH₂PO₄ a los 5 días de la siembra; los alveolos recibieron la cantidad equivalente a su volumen de soporte de cultivo. Durante el crecimiento se regó con agua de una a tres veces por semana hasta capacidad de campo.

El invernadero (Fig. 2.2) tuvo las condiciones de luz natural del otoño e invierno en el oeste de España, con un mínimo de 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminancia durante las horas del día, gracias a un sistema suplementario de iluminación. El fotoperiodo fue de 16 h día/8 h noche, la temperatura fue aproximadamente de 20 °C día/15 °C noche con un 60 % de humedad relativa. Las cámaras de crecimiento, con 3.58 m de largo, 4.78 m de ancho y 2.35 m de alto, tenían en su interior dos mesas (2.45 x 1.70 m) sobre las que se colocaron las macetas. La iluminación la proporcionaron lámparas fluorescentes de dos tipos, con temperaturas de emisión de 4000 K (Phillips TL5 HO 54W/840) y 6800 K (Phillips TL5 HO 54W/965). Las condiciones ambientales fueron 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminancia, un fotoperiodo de 16 h día/8 h noche, temperatura de 20 °C día/15 °C noche y 60 % de humedad relativa. En una de las cámaras se mantuvo la concentración ambiental de CO₂ (alrededor de 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y en la otra la concentración de CO₂ se aumentó hasta 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, inyectando el gas puro a través de una electroválvula regulada con un controlador proporcional, integral derivativo (PID) conectado a un sensor de CO₂.



Figura 2.2. Cultivo en invernadero de plantas de cebada de la variedad Graphic y el mutante G132.

En el invernadero se sembraron de 7 a 10 macetas de cada uno de los genotipos (Graphic y G132), dejando 4 plántulas por maceta después de la germinación. Se efectuaron dos siembras sucesivas con objeto de estudiar las plantas en dos fases de desarrollo, las de 3-4 hojas y 5-7 hojas (fases 13-14 y 15-17, respectivamente, de la escala Zadoks *et al.* (1974), estando Graphic más avanzado que G132.

En el primero de los cultivos en las cámaras de crecimiento (Fig. 2.3) se sembraron, de un lado, 40 semillas de cada genotipo en bandejas de cultivo, con 12 alvéolos de siembra por cada bandeja y una semilla por alveolo. La primera hoja desplegada se destinó al estudio transcriptómico mediante el uso de microarrays, que se describirán más adelante (ver apdo. 2.8.1). Además, para las medidas y análisis de fotosíntesis y composición de las hojas detalladas más abajo se sembraron 6 macetas con 2 plantas para cada genotipo y concentración de CO₂. En el segundo cultivo se sembraron 25 macetas, con 4 plantas cada una, para cada genotipo y concentración de CO₂.



Figura 2.3. Cultivo en cámara de crecimiento de plantas de cebada de la variedad Graphic y el mutante G132.

2.2. Fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia de la clorofila se determinó con un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Alemania). Las medidas se realizaron en las condiciones de crecimiento siguiendo el protocolo descrito por Pérez *et al.* (2011a, b). Para las medidas correspondientes al estado adaptado a oscuridad, se cubrió la porción de la hoja con una pinza metálica almohadillada durante 20 min, después de los cuales se registró F_o y se aplicó un destello de luz saturante blanca ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 0.8 s para determinar F_m (Fig. 2.4). F_o y F_m representan, respectivamente, la fluorescencia mínima y máxima en el estado adaptado a la oscuridad, y F_v/F_m [$(F_m - F_o)/F_m$] representa la eficiencia cuántica máxima. Las hojas adaptadas a la luz se iluminaron con una fuente de luz actínica roja para obtener una intensidad de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se dieron destellos saturantes de luz blanca cada 20 s durante 5 min, registrándose los valores de fluorescencia inmediatamente antes (F' , fluorescencia en el estado estable) y después (F_m' , fluorescencia máxima en la luz) de cada destello. A continuación la hoja se cubrió con un paño negro, se apagó la luz actínica, y se encendió una luz infrarroja (alrededor de 735 nm) durante 3 s para excitar

selectivamente el Fotosistema I (PSI) y así reoxidar rápidamente los centros del Fotosistema II (PSII) y determinar F_o' , la fluorescencia mínima con una extinción no fotoquímica de la fluorescencia similar a la encontrada en hojas adaptadas a la luz. El equipo PAM-2000 computa directamente F_q'/F_m' [($F_m' - F'$)/ F_m'], que es la eficiencia operativa del PSII (también denominada Φ_{PSII}) (Baker *et al.*, 2007). Se calculó la fracción de centros del PSII en el estado abierto qL [(F_q'/F_v')(F_o'/F') donde $F_v' = F_m' - F_o'$] y la eficiencia máxima del PSII en la luz, Φ_{qL} [(F_v'/F_m')(F'/F_o')]. Nótese que la eficiencia operativa del PSII es el producto de la fracción de centros en el estado abierto por la eficiencia máxima en la luz. El rendimiento cuántico del decaimiento basal no radiativo, Φ_{NO} , es $1/(NPQ+1+qL(F_m/F_o-1))$, donde el calor disipado por mecanismos de foto-protección NPQ es $(F_m/F_m')-1$, y el rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica, Φ_{NPQ} , es $1-(F_q'/F_m') - \Phi_{NO}$ (Kramer *et al.*, 2004).

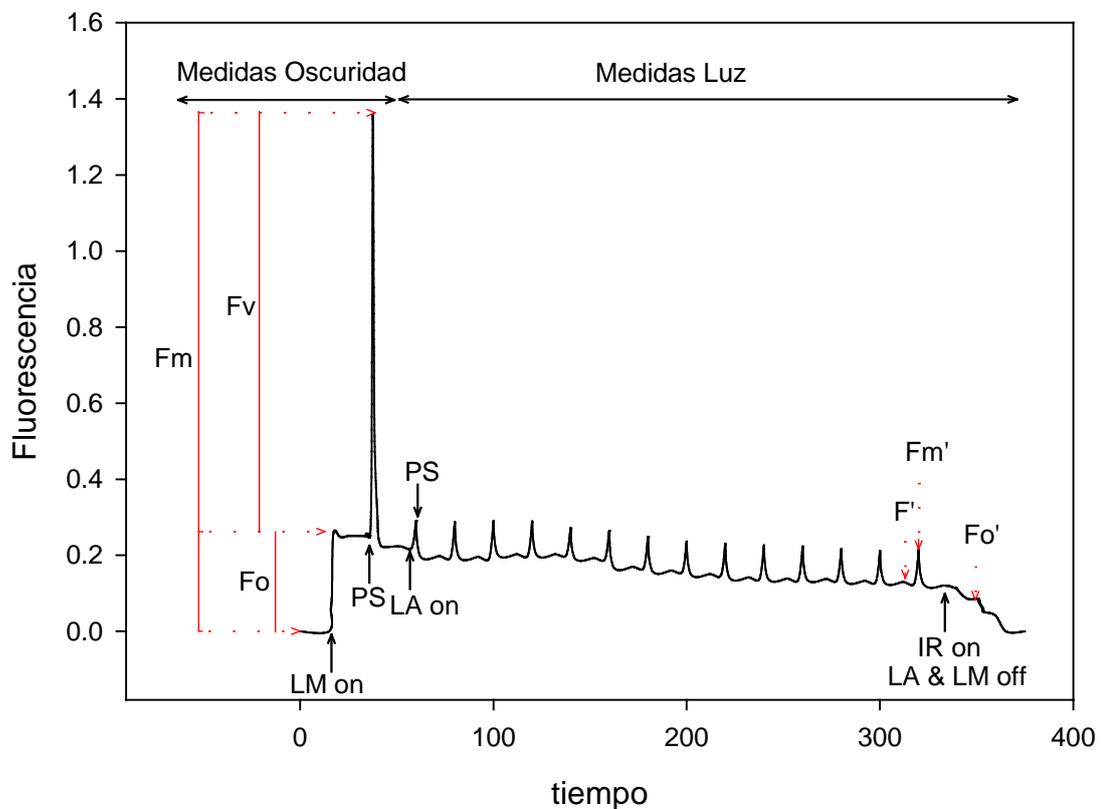


Figura 2.4. Cinética de la fluorescencia de la clorofila en la tercera hoja de *Graphic*. LM; luz de medida. PS; pulso saturante. LA; luz actínica. IR; luz infrarroja.

En los cultivos de invernadero, en las dos fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas, con un desarrollo más avanzado en Graphic, la fluorescencia se determinó en la hoja más joven completamente desplegada y las penúltima y última. En el primer experimento en cámaras de crecimiento se determinó F_q'/F_m' en la primera hoja en el momento en que más del cincuenta por ciento de los individuos tenían la segunda hoja completamente expandida. Además, cuando la hoja 3 (G132)-4 (Graphic) estaba completamente desplegada, se determinaron en dicha hoja los parámetros de extinción de la fluorescencia en la oscuridad y, en la luz, F_q'/F_m' . En el segundo experimento en cámaras de crecimiento se determinaron todos los parámetros de la fluorescencia indicados arriba. Se midieron 5 hojas como repeticiones de cada genotipo, posición de la hoja en la planta, edad de la misma y concentración de CO_2 durante el crecimiento.

2.3. Intercambio gaseoso

Para las medidas de intercambio gaseoso se utilizó un analizador de gases en el infrarrojo (Fig. 2.5; IRGA CIRAS-2, PP Systems, Amesbury, MA, USA) con operación diferencial y circuito de aire abierto, conectado a una cámara de asimilación con ventana de 1.7 cm^2 (PLC6[rice]). El flujo de aire fue de $280\text{-}300 \text{ ml min}^{-1}$, la temperatura se mantuvo a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ con el sistema Peltier de la cámara foliar, la iluminancia se fijó en $1000 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por LEDs rojos suplementados con blanco y el déficit de presión de vapor fue $0.95 \pm 0.12 \text{ kPa}$. Con este equipo se obtuvo la asimilación neta de CO_2 o velocidad de asimilación fotosintética (A), la velocidad de transpiración (E), la concentración intercelular de CO_2 del mesófilo (C_i) y la conductancia estomática (g_s), además de la temperatura de la hoja, utilizando las fórmulas estándar (Long and Hällgren, 1993).

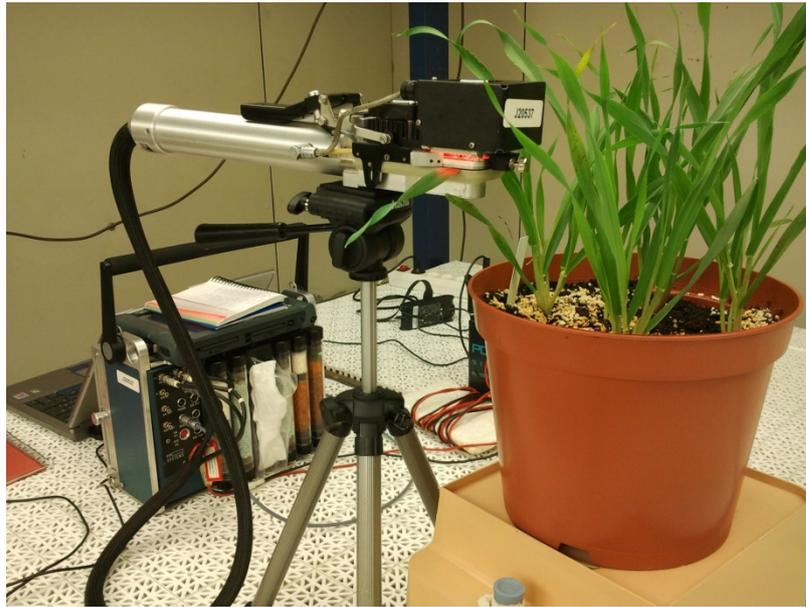


Figura 2.5. Medida del intercambio gaseoso en hojas de cebada cultivadas en cámara de crecimiento.

Las curvas de respuesta A-C_i se registraron disminuyendo la concentración de CO₂ en el aire desde la existente en el ambiente de crecimiento de las plantas hasta alrededor de 60 μmol mol⁻¹, y aumentándola después hasta 1800 μmol mol⁻¹ con un total de 11 pasos. A cada paso, tan pronto como la concentración de CO₂ dentro de la cámara de asimilación (foliar) fue estable, pero no necesariamente en estado estabilizado (alrededor de 2 min), se registraron los parámetros de intercambio gaseoso (Long and Bernacchi, 2003). A partir de las respuestas de la fotosíntesis a C_i se determinaron la velocidad máxima de carboxilación catalizada por Rubisco (V_{cmax}) y la velocidad de transporte de electrones (J) según Farquhar *et al.* (1980), ajustando el modelo con la utilidad LeafWeb (Gu *et al.*, 2010).

Las respuestas de aclimatación o a largo plazo, y directa o a corto plazo de la fotosíntesis al CO₂ elevado se cuantificaron como razones según Bunce (2001), y la respuesta neta (Ec. 2.2) como el producto de las respuestas de aclimatación y directa:

$$\frac{A(e, E)}{A(a, A)} = \frac{A(e, E)}{A(a, E)} \cdot \frac{A(a, E)}{A(a, A)}$$

Ecuación 2.2. Respuesta neta de la fotosíntesis (A) al CO₂ elevado, donde a y e se refieren a CO₂ de crecimiento ambiente y elevado, y A y E a CO₂ de medida ambiente y elevado, respectivamente.

Las respuestas a largo plazo de g_s y otros parámetros de intercambio gaseoso a la concentración de CO₂ se registraron durante 40-50 min equilibrando primero las hojas con iluminancia de 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ en 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂ durante unos 20 min, y después aumentando hasta 1800 o disminuyendo hasta 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂ en un paso. Para diferenciar las respuestas estomáticas al CO₂ de las inducidas por la luz azul (Mott, 2009), estas medidas a largo plazo se hicieron con luz roja, obtenida interponiendo un filtro óptico entre la lámpara y la ventana de la cámara foliar. Además, dichas medidas se normalizaron con respecto al número de estomas por hoja (ver apdo. 2.9.2).

Para examinar los efectos del inhibidor del transporte de electrones del PSII 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) en la g_s y la fotosíntesis, las hojas se separaron del tallo y cortaron dentro de agua con un escalpelo, colocando la base cortada en agua con 1.5 % de etanol (véase abajo). La sección central de la hoja se alojó en la cámara foliar (1.7 cm²) de intercambio gaseoso por un periodo de estabilización y medidas de 30 min en 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂ y 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de iluminancia roja. Posteriormente la base de la hoja se transfirió rápidamente a 100 μM DCMU disuelto en 1.5 % de etanol (o H₂O 1.5% etanol para los controles) y los datos de intercambio gaseoso se registraron durante alrededor de 2 h manteniendo C_i aproximadamente constante en el valor inicial mediante disminuciones de C_a , para asegurar que las respuestas al DCMU no eran resultado de aumentos de C_i . A continuación, cuando la fotosíntesis estuvo completamente inhibida, la concentración de CO₂ se bajó a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y los registros del intercambio gaseoso continuaron por 90 min, terminados los cuales el CO₂ se aumentó hasta 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y las medidas prosiguieron durante 100 min.

Las curvas de respuesta del intercambio gaseoso a la concentración de CO₂ se determinaron en la última hoja en la fase de 3-4 hojas de los cultivos de cámara

de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Las respuestas a largo plazo de g_s al CO_2 se midieron en la hoja más joven completamente expandida en la fase de desarrollo de 3-4 hojas en cultivo de cámara de crecimiento y de 5-7 hojas en cultivo de invernadero. El intercambio gaseoso en hojas tratadas con DCMU se determinó en hojas cultivadas en invernadero en la fase de 5 hojas para ambos genotipos.

Todas estas medidas de intercambio gaseoso se realizaron con 5 repeticiones de cada genotipo (6 para las respuestas al DCMU) y, en su caso, posición de la hoja en la planta, edad de la misma y concentración de CO_2 durante el crecimiento.

2.4. Determinación de clorofilas

A media mañana en las fechas de medida de la fluorescencia y las curvas de respuesta fotosíntesis- CO_2 , se tomaron muestras de hojas en las fases de desarrollo de la planta indicadas más arriba, de los dos genotipos y en todos los cultivos de cámara de crecimiento y de invernadero. Estas muestras se transfirieron rápidamente a nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para ser analizadas. Fracciones de las muestras se molieron en mortero congelado con nitrógeno líquido y con rapidez y manteniendo la baja temperatura se pesaron alrededor de 100 mg en un eppendorf. Se añadieron 15 μl de inhibidor de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM en Isopropanol, PMSF) y 1.5 ml de tampón de extracción (Tricina 50 mM pH 8, sacarosa 75 mM, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, ácido 2-aminocaprico 5 mM, benzamidina 2 mM, 2-mercapoetanol 0.14 % v/v), manteniéndose en hielo durante 5 min. Se tomaron 40 μl de la suspensión utilizando pipetas con punta plástica recortada y se diluyeron hasta 100 μl con agua, manteniéndose en frigorífico a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min (el resto del extracto se usó para la determinación de proteínas, ver apdo. 2.7.1). Posteriormente se llevaron a una concentración final de acetona de 80 % y protegiendo el extracto de la luz en todo el proceso siguiente, se centrifugó a 13000 g durante 5 min y se determinó la clorofila midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm (A_{663} y A_{645}) con un espectrofotómetro de diodos (modelo 8453,

Hewlett-Packard, Alemania). Se calcularon las concentraciones de clorofila total, clorofila a y clorofila b a partir de las ecuaciones de Arnon (1949) (Ec. 2.3):

$$\mathit{Chl\ a} = 12.7 \cdot A_{663} - 2.69 \cdot A_{645}$$

$$\mathit{Chl\ b} = 22.9 \cdot A_{645} - 4.68 \cdot A_{663}$$

$$\mathit{Chl\ total} = 20.2 \cdot A_{645} + 8.02 \cdot A_{663}$$

Ecuación 2.3. Ecuaciones para la determinación de la concentración de clorofila ($\mu\text{g ml}^{-1}$) a (Chl a), b (Chl b) y total (Chl a+ Chl b) a partir de la absorbancia (A) a las longitudes de onda indicadas (subíndices de A).

El contenido en clorofilas se determinó en la última hoja en la fase de 3-4 hojas de los cultivos de cámara de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Los resultados se expresaron en base al peso fresco foliar. Las determinaciones de clorofila se efectuaron en 4 repeticiones, cada una integrada por varias hojas de distintos individuos por cada genotipo, misma edad de la hoja y la planta y concentración de CO_2 de crecimiento.

2.5. Determinación de carbohidratos

Para la medición de carbohidratos se molió hasta su pulverización en mortero congelado con nitrógeno líquido una fracción de muestra foliar almacenada a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, pesando rápidamente a baja temperatura alrededor de 100 mg en un eppendorf. Se realizaron tres extracciones secuenciales siguiendo el método descrito por Morcuende *et al.* (2004). Se usaron 700 μl de una disolución tamponada de etanol (EtOH 80 % v/v, Hepes-KOH 10 mM pH 7.5), incubando las muestras a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min y con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 13000 g en una centrífuga refrigerada (Eppendorf) a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Los sobrenadantes de los extractos se recogieron en un matraz aforado de 5 ml y se guardaron en oscuridad y refrigerados a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Se hicieron tres extracciones consecutivas más con agua tamponada (Hepes-KOH 10 mM pH 7.5) a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min con objeto de extraer los fructanos de alto

grado de polimerización. El extracto resultante se mezcló con los extractos obtenidos anteriormente. Una vez enrasadas las muestras hasta los 5 ml con una disolución tamponada de etanol (EtOH 40 % v/v, Hepes-KOH 10 mM pH 7.5), se homogeneizaron y se dividieron en alícuotas para analizar la cantidad de glucosa y fructosa libres, sacarosa, fructanos y aminoácidos libres. Los precipitados obtenidos de las muestras se congelaron a -20°C para la determinación del contenido de almidón.

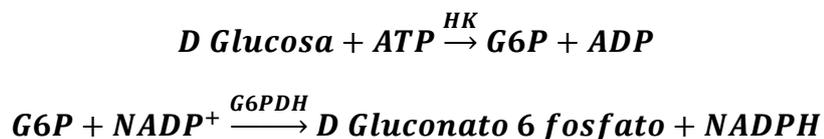
Se tomaron 600- 1000 μl del extracto de carbohidratos de cada muestra. Usando una centrifuga de vacío Savant Speed Vac® (SPD121P) se evaporó y eliminó todo resto de etanol que pudiera interferir con las enzimas de los subsiguientes análisis. Conectada la centrífuga a una bomba de vacío y a una temperatura de entre $65\text{-}70^{\circ}\text{C}$ durante 2 h, se secaron las muestras y se resuspendieron en un volumen de H_2O igual a la mitad o la cuarta parte del inicial, dependiendo de las concentraciones de carbohidratos encontradas en pruebas preliminares.

El contenido de carbohidratos se determinó en la última hoja en la fase de 3-4 hojas de los cultivos de cámara de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Los resultados se expresaron en base al peso fresco foliar. La determinación de carbohidratos se efectuó en 5 repeticiones, cada una integrada por varias hojas de distintos individuos por cada genotipo, misma edad de la hoja y la planta y concentración de CO_2 de crecimiento.

2.5.1. Glucosa y fructosa

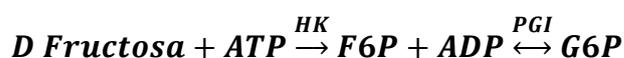
El método para la determinación de glucosa y fructosa libre en la muestra está basado en el aumento de la fluorescencia emitida a 460 nm con excitación a 340 nm del compuesto nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) al reducirse ($\text{NADPH}+\text{H}^+$) (Jones *et al.*, 1977). Usando un método enzimático, la D-glucosa fosforila a D-glucosa-6-fosfato (G6P) en presencia de la enzima hexokinasa (HK) y adenosin-5'-trifosfato (ATP), formándose simultáneamente adenosin-5'-difosfato (Ec. 2.4). Posteriormente la G6P en presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es oxidada por NADP^+ a D-gluconato-6-fosfato y se forma $\text{NADPH}+\text{H}^+$, posibilitando así la cuantificación

fluorimétrica de NADPH que es estequiométricamente igual a la cantidad de glucosa en la muestra.



Ecuación 2.4. Reacciones enzimáticas para la determinación de glucosa.

La determinación de la fructosa libre en la muestra se efectuó una vez terminada las mediciones de D-glucosa. De la misma forma que ya se ha descrito antes, la HK también fosforila la D-fructosa a fructosa-6-fosfato (F6P), que en presencia de glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI) se transforma en G6P (Ec. 2.5). De esta forma, con la adición de una nueva enzima se determina el incremento de absorbancia en la muestra correspondiente a la cantidad de fructosa.



Ecuación 2.5. Reacciones enzimáticas para la determinación de fructosa.

Las medidas fluorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro-fluorímetro-luminómetro para placas Synergy 2 (Fig. 2.6; Multi-Mode Microplate Reader, Biotek), usándose placas negras Nunc™ Microwell F96PS (Thermo Scientific) El análisis se realizó en un volumen total de 205 µl añadiendo 100 µl de tampón Boehringer (TEA 86 mM pH 7.6, ATP 10 mM, NADP 3 mM, Mg₂SO₄), 5 µl de HK/G6PDH (1U/0.5U) para la determinación de glucosa y 5 µl de PGI (2.5U) para la fructosa libre, y un volumen de muestra variable según la concentración de hexosas. Se registraron dos incrementos de emisión de fluorescencia a 460 nm (excitación con 340 nm) divididos en tres fases, una inicial donde no hay adición de enzimas. Una segunda fase con incremento de fluorescencia después de la adición de HK/G6PDH y que corresponde a la cantidad de glucosa. Y la última fase con un incremento de fluorescencia que comienza con la adición de PGI y que corresponde a la fructosa libre. La monitorización de las fases se realizó de forma continua gracias al

software incorporado de Synergy 2 (Gen5™ Reader Control and Data Analysis Software).

Utilizando una recta de calibrado con concentraciones lineales de 0.25-5 μM de D-glucosa (Boehringer Mannheim, Roche) y el método anteriormente descrito, se transformó la fluorescencia en concentración del NADPH (Ec. 2.6).

$$NADPH = \frac{(\Delta F + 2.9477)}{260.58}$$

Ecuación 2.6. Determinación de la concentración del NADPH (nmol ml^{-1}) producido en el análisis enzimático de glucosa y fructosa. $R^2=0.989$

De esta forma, considerando los volúmenes de extracción, extracto empleado y reacción, se calculó el contenido de glucosa y fructosa libre en la muestra ya que estequiométricamente un mol de NADPH equivale a uno de glucosa o fructosa en la muestra.

2.5.2. Sacarosa

Para la determinación de sacarosa se incubaron las muestras durante 30 min a temperatura ambiente con una enzima degradadora de la sacarosa (Sacarasa: maltasa de levadura, Megazyme) en tampón maleato sódico. Se obtuvo así glucosa y fructosa a partir de las moléculas de sacarosa hidrolizada. Usando placas de 96 pocillos Nunc™ Microwell F96PS (Thermo Scientific), a un volumen de muestra variable según la concentración de sacarosa se añadieron 4 μl de tampón maleato 100 mM pH 6.5 y 4 μl de sacarasa en un volumen total de 54 μl , se homogeneizó y se cubrió con papel de aluminio adhesivo (Scotch® Brand Tape) para proceder con la incubación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió al análisis de glucosa y fructosa como se indica en el apartado 2.5.1, excepto que se registraron los cambios de absorbancia a 340 nm, restando la absorbancia a 400 nm como referencia, en lugar de registrar la fluorescencia, por ser más abundante la sacarosa que las hexosas libres.



Figura 2.6. Espectrofotómetro-fluorímetro-luminómetro para placas Synergy 2.

Utilizando una recta de calibrado con concentraciones lineales de 0.015-0.150 mM de D-glucosa (Boehringer Mannheim, Roche) y el método descrito para análisis de glucosa, se determinó un coeficiente de extinción (ϵ) de 3.2254 para la transformación de absorbancia a concentración de NADPH, considerando los volúmenes empleados (Ec. 2.7).

$$NADPH = \frac{V \times \Delta A[(A_{340} - A_{400})_f - (A_{340} - A_{400})_i]}{\epsilon}$$

Ecuación 2.7. Concentración de NADPH obtenida sustituyendo los valores de absorbancia (A_λ) en la ecuación.

A las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas en el análisis se les restaron las concentraciones de glucosa y fructosa libres de la muestra, obteniéndose las concentraciones reales de glucosa y fructosa procedentes de la hidrólisis de sacarosa.

2.5.3. Fructanos

Para la determinación de fructanos se incubaron las muestras durante 30 min a temperatura ambiente con un coctel comercial de enzimas degradadoras de fructanos (mezcla de fructanasas, Megazyme). Se obtuvo así glucosa y fructosa a partir de las moléculas de los fructanos hidrolizados. A un volumen de muestra variable según la concentración de fructanos se añadieron 2 μ l de tampón acetato (acetato sódico 100 mM pH 4.5) y 2 μ l de fructanasas en un volumen total de 54 μ l, se homogeneizó y se cubrió con papel de aluminio adhesivo (Scotch® Brand Tape) para proceder con la incubación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió al análisis espectrofotométrico de glucosa y fructosa como se indica en el apartado 2.5.2. A las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas en el análisis se les restó las concentraciones de glucosa y fructosa libres y la glucosa y fructosa procedentes de la sacarosa de la muestra, obteniéndose las concentraciones reales de glucosa y fructosa procedentes de la hidrólisis de fructanos.

2.5.4. Almidón

El almidón se analizó en el precipitado obtenido de la extracción etanólica (ver apdo. 2.5.) del material vegetal con el método de Ap Rees *et al.* (1977). El precipitado se resuspendió en 1 ml de agua y se autoclavó durante 2 h 120 °C en un autoclave (P Selecta Autester, 437-G), dejándose a continuación enfriar hasta temperatura ambiente. Seguidamente se agitó y se tomó una alícuota de 120 μ l con punta de pipeta cortada que se mezcló para la digestión del almidón con 180 μ l de un coctel enzimático (NaCH₃CO₂ 76 mM pH 4.9) de amiloglucosidasa (0.5 U; 1202332, Roche) y de α -amilasa (0.7 U; 102814, Roche). La mezcla se incubó a 37 °C en un bloque térmico (P Selecta) durante 16 h. Finalmente, previa centrifugación y recuperación del sobrenadante digerido, la glucosa obtenida del almidón fue valorada espectrofotométricamente como se indica en el apartado 2.5.2. Para convertir en concentración los resultados de absorbancia, se tuvo en consideración el volumen del extracto utilizado para la hidrólisis del almidón y del volumen de la valoración de la glucosa.

2.6. Determinación de nitrato, aminoácidos y ATP

2.6.1. Nitrato

El nitrato se determinó por espectrofotometría según el método propuesto por Cawse (1967). Una alícuota del extracto etanólico descrito en el apartado 2.5 se mezcló con 400 μ l de ácido sulfámico 1.5 % (para eliminar el nitrito de la muestra) y 400 μ l de HClO₄ 10 % (para eliminar interferencias por materia orgánica) en un volumen total de 1 ml. La mezcla se homogeneizó por agitación e incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras centrifugar durante 5 min a 12000 g, la absorbancia del extracto se midió a 210 nm en un espectrofotómetro de diodos, empleándose cubetas de cuarzo (Hellma, 6040-UV, 10 mm), frente a un blanco compuesto por 200 μ l de agua, 400 μ l de ácido sulfámico 1.5% y 400 μ l HClO₄ 10 %. Paralelamente a la valoración del nitrato en las muestras se realizó una recta de calibración (0.010 mM-0.200 mM) a partir de una solución estándar de KNO₃ 1 mM. La regresión obtenida nos permitió determinar la concentración de nitrato, teniendo en consideración tanto las diluciones realizadas durante el proceso de valoración como el peso fresco de muestra.

Los contenidos de nitrato y aminoácidos (ver apdo. 2.6.2) se determinaron en la última hoja en la fase de 3-4 hojas de los dos cultivos de cámara de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Los resultados se expresaron en base al peso fresco foliar. Las determinaciones de nitrato y aminoácidos se efectuaron en 5 repeticiones, cada una integrada por varias hojas de distintos individuos por cada genotipo, misma edad de la hoja y la planta y concentración de CO₂ de crecimiento.

2.6.2. Aminoácidos

Para la determinación de los aminoácidos totales se utilizó el método de la ninhidrina (Hare, 1977), acoplado a valoración espectrofotométrica. La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) es un oxidante fuerte que por una

desaminación oxidativa de los aminoácidos conduce a la formación del aldehído correspondiente, con liberación de amoníaco y gas carbónico y formación de la ninhidrina reducida o hidrindrantina. La molécula de hidridantina, en presencia de otra de ninhidrina, condensa a través del amoníaco produciendo una estructura denominada indanona o púrpura de Ruhemann, mostrando un color azul-púrpura. Presenta su máximo de absorbancia a los 570 nm.

El reactivo de ninhidrina se preparó mezclando 50 mg de $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ en 1 ml de ácido acético glacial y 5 ml de agua, junto a la ninhidrina (0.1 % p/v en ácido acético). La valoración del contenido de aminoácidos se efectuó en el extracto etanólico de las muestras (ver apdo. 2.5). Se homogeneizó con vortex y se centrifugó con posterioridad a 12000 g a 4 °C y durante 2 min. A continuación, se mezclaron 500 μl del extracto con 500 μl de reactivo de ninhidrina. La mezcla se homogeneizó por agitación e incubó en un bloque térmico a 70 °C durante 10 min. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente durante 15 min, se procedió a la lectura de absorbancias a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro de diodos, frente a un blanco con ninhidrina y agua. En paralelo a la medida de las muestras se preparó una recta de calibración con diferentes cantidades de glutamina (Sigma, G3126) a partir de una solución estándar de glutamina 1 mM, siguiendo el mismo protocolo descrito. La medida de absorbancia obtenida se extrapola a la concentración de dicho aminoácido.

2.6.3. ATP

Para la determinación de ATP en las muestras, se emplearon 150 mg de hoja macerada y pulverizada en un mortero con nitrógeno líquido. La extracción se efectuó con un tampón perclórico (HClO_4 1 M, EGTA 5 mM) durante 30 min en hielo y con agitación frecuente. Después de centrifugar a 13000 g a 4 °C durante 5 min, se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo y el precipitado se lavó con agua para ser centrifugado de nuevo. El sobrenadante se unió al extracto perclórico y tras homogeneizarse se neutralizó (KOH 5 M, TEA 1M pH 7.0). Tras la neutralización se centrifugo a 13000 g a 4 °C durante 5 min y se descartó el precipitado, pasando el sobrenadante a un nuevo tubo. El extracto no se clarificó con carbón activo que eliminaría los adenilatos.

función del tamaño. Esta técnica confiere a cada una de las proteínas una carga negativa proporcional a su masa. Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular se transfirieron a una membrana adsorbente de polifluoruro de vinilideno (PVDF) usando corriente eléctrica y un tampón de transferencia. Sobre esta membrana se identificaron las proteínas de interés con anticuerpos específicos que se detectaron por quimioluminiscencia. De esta forma se pudo estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

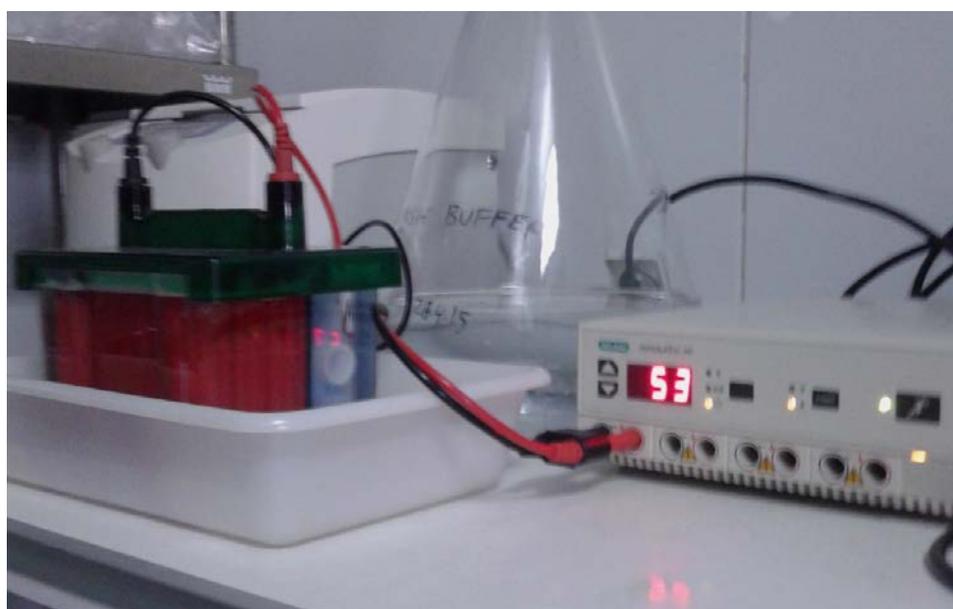


Figura 2.8. Equipo de electroforesis y transferencia de geles de poliacrilamida.

2.7.1. Proteína total, soluble y de membrana

Una alícuota del extracto en el cual se determinaron las clorofilas (ver apdo. 2.4), después de 30 min en frigorífico para facilitar la extracción se centrifugó a 12500 g a 4 °C durante 30 min y, se usó para el análisis de proteína soluble mediante el método de Bradford (1976). Para el análisis de proteína total, a 800 μ l del extracto para clorofilas tomados con punta recortada se añadieron 800 μ l de mezcla de ácido tricloroacético 20 % y 2-mercaptoetanol 0.07 % en acetona, y se mantuvieron durante 2 h a -20 °C para la precipitación de proteínas. Después se centrifugó 15 min a 15000 g a 4 °C, descartando el sobrenadante. Para mejorar la precipitación de las proteínas, el precipitado se lavó tres veces con 1 ml de

acetona con 2-mercaptoetanol al 0.07% con incubación de 30 min a -20 °C y centrifugación posterior durante 15 min a 15000 g a 4 °C cada vez, descartándose el sobrenadante. El precipitado obtenido se secó en estufa durante 30 min a 40 °C. A continuación para la disolución de las proteínas se añadieron 800 µl de mezcla de extracción (Tris 50 mM pH 8, sacarosa 100 mM, SDS 3.5 %, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 0.07 %) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y otros 20 min a 70 °C para la completa disolución de las mismas. Una vez atemperadas las muestras, se centrifugaron durante 15 min a 15000 g a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo para valorar la cantidad de proteína total utilizando el método de Lowry *et al.* (1951). La diferencia entre proteína total y proteína soluble se tomó como medida de la proteína de membrana.

El análisis de proteína con el método de Lowry está basado en dos reacciones complementarias: reacción de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación; y reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (fosfomolibdotungstato), que se reduce por medio de los grupos fenol presentes en la proteína (y en menor medida imidazol e indol) a un complejo de color azul oscuro, que se mide con un espectrofotómetro de diodos. Una alícuota del extracto de proteína (alrededor de 20 µl) se llevó con agua a 500 µl y se añadieron 100 µl de deoxicolato sódico al 0.15 %, mezclándose y permaneciendo 10 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 µl de ácido tricloroacético al 72 %, se mezcló y colocó a 4 °C durante 15 min para facilitar la precipitación de las proteínas. Seguidamente se centrifugó a 12000 g durante 25 min, se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado colocando el tubo invertido sobre papel absorbente. A continuación se añadieron al precipitado 500 µl de agua y 500 µl de una mezcla (concentraciones finales) de Na_2CO_3 2.5 % p/v, CuSO_4 0.025 % p/v, tartrato potásico 0.05 % p/v, NaOH 0.2 N, SDS 2.5 % p/v, se agitó y se mantuvo a temperatura ambiente 10 min. Después se añadieron 250 µl de solución preparada con 5 ml de reactivo fenol Folin-Ciocalteu y 20 ml de agua y se agitó hasta homogeneización completa, dejando desarrollar el color durante 30 a 45 min a temperatura ambiente. La medida en espectrofotómetro a 750 nm se

cuantificó con referencia a una curva con patrones de albúmina bovina (15 a 120 $\mu\text{g/ml}$) preparados de igual forma que las muestras.

El análisis de proteína con el método de Bradford se basa en el cambio de absorbancia del azul de Coomassie, que en condiciones ácidas vira de la forma roja al azul que se enlaza a la proteína y se cuantifica en un espectrofotómetro. Una alícuota (entre 15 y 25 μl) del extracto de proteína soluble se llevó a 200 μl con el tampón de extracción de clorofila y proteínas (ver apdo. 2.4), añadiéndose 5 ml de reactivo azul de Coomassie (Bio-Rad Protein Assay, num. cat. 500-0006, diluido 5 veces) y agitando en vortex. A continuación (después de 2 min y antes de 20 min) se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. La cuantificación se efectuó con referencia a una curva de patrones de albúmina bovina (2.5 a 30 $\mu\text{g/ml}$) preparados de igual forma que las muestras.

El contenido de proteína total, soluble y de membrana se determinó en la última hoja en la fase de 3-4 hojas de los dos cultivos de cámara de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Los resultados se expresaron en base al peso fresco foliar. Esta determinación se efectuó en 5 repeticiones, cada una integrada por varias hojas de distintos individuos por cada genotipo, misma edad de la hoja y la planta y concentración de CO_2 de crecimiento.

2.7.2. Electroforesis, densitometría e inmunodetección de proteínas

Se tomó una alícuota de extracto de proteína soluble con 200 μg de proteína o con 300 μg en el caso de proteína total. Se añadieron 5 volúmenes de acetona fría y se mantuvo toda la noche a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12000 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. La acetona se dejó evaporar y los precipitados se disolvieron en 100 μl de tampón de carga (Tris-HCl 65 mM pH 6.8, sacarosa 0.3 M, 2-mercaptoetanol 0.64 M, SDS 5 % p/v y azul de bromofenol 0.01 %) para las proteínas solubles o para las proteínas totales en 100 μl de tampón PEB (Protein Extraction Buffer (AS08 300, Agrisera), DTT 50 mM y azul de bromofenol 0.01 %) que contiene glicerol en lugar de sacarosa, LDS en lugar de SDS y DTT como agente reductor. Las muestras de proteína soluble se calentaron a $96\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min, previa homogeneización. Posteriormente se

enfriaron a temperatura ambiente y tras diluirlas 1:4 con el tampón correspondiente, se cargaron con jeringuilla Hamilton en gel SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970) al 12.5 % (Acrilamida/Bis 12.5 %, tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%, APS 0.075%, TEMED 0.001 %) con espesor de 0.75 mm. Se cargaron de 1.5 a 6 µg de proteína soluble y de 2.25 (para LHCII y Cyt b6) a 9 (para D1) µg de proteína total, dependiendo del genotipo y la abundancia de ciertas proteínas encontrada en estudios preliminares. Para mejorar la nitidez de la banda el gel se coronó con una acrilamida de apilamiento de 5 % (Acrilamida/Bis 5 %, tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 0.15 %, APS (persulfato amónico) 0.075 %, TEMED 0.001 %). La electroforesis de las muestras se llevó a cabo a temperatura ambiente a 200 V constantes durante aproximadamente 50 min y por duplicado.

Uno de los geles duplicados se fijó cubriéndose con mezcla de agua-metanol-ácido acético (20:6:3 (v/v/v)) durante 75 min, se tiñó con solución EZ Blue (Sigma) durante 2 h, y posteriormente se lavó con agua para eliminar el exceso de tinción. Finalmente, se obtuvo una imagen (Fig. 2.9) de los geles con un equipo de captura y análisis (ChemiDoc MP System, Bio-Rad). Las proteínas se cuantificaron por densitometría con programas de análisis de imagen (Image Quant, Molecular Dynamics, GE Healthcare; ImageLab y PDQuest Advanced 8.0, Bio-Rad). Para la Rubisco la cantidad de proteína se calculó en el rango de respuesta lineal de la densidad óptica a la concentración de standard BSA (66 kDa), de acuerdo con las calibraciones preliminares. Para el cálculo del peso molecular se cargó también en el gel una alícuota de 3 µl de la mezcla de patrones para calibración (Kit LMW for SDS electroforesis, N° Cat. 17-0446-01, BioRad) disuelta (576 µg) en 400 µl de la misma mezcla tamponada que las muestras.

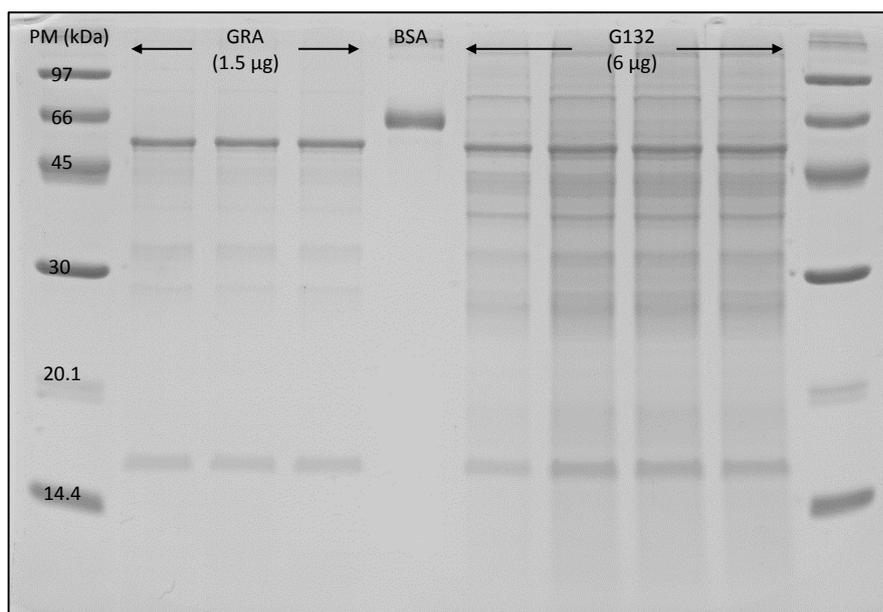


Figura 2.9. Gel de poliacrilamida tras la electroforesis de proteínas solubles de Graphic y G132. Peso molecular en kilodaltons (PM, kDa).

El duplicado de cada gel se empleó para la inmunodetección de proteínas (Towbin *et al.*, 1979). Se equilibró el gel en 30 ml de tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20 % v/v, SDS 0.1 % p/v) durante 15 min. Se preparó una membrana de PVDF del mismo tamaño que el de los geles de las muestras de proteína. La membrana se sumergió momentáneamente en metanol para activarla, posteriormente se sumergió durante 3 min en tampón de transferencia. El gel y la membrana se superpusieron y se colocaron entre papel de filtro y almohadillas de esponja. Con un cartucho se aplicó presión para mantener un estrecho contacto entre el gel y la membrana. Se introdujo el cartucho en un tanque de transferencia (Mini Trans-Blot, Bio Rad), rellenando el mismo con tampón de transferencia y un bloque helado para evitar el sobrecalentamiento al aplicar corriente eléctrica. Se aplicó corriente de 400 mA (Power Pac 300 Bio Rad) en el tanque de transferencia durante 90 min a 4 °C y así las proteínas migraron desde el gel a la membrana. El gel transferido se tiñó con Coomassie y se comprobó si quedaron residuos de proteína. Terminada la transferencia la membrana se bloqueó inmediatamente con reactivo de bloqueo Avance ECL (GE Healthcare) 2 % p/v en TBS-T (ClNa 137 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, Tween 20TM 0.1 % v/v) durante 1 h a temperatura ambiente con

agitación y se aclaró brevemente con solución de lavado (TBS-T) dos veces. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente y a la dilución recomendada (tabla 2.1) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se decantó la solución del anticuerpo y la membrana se enjuagó primeramente dos veces, luego se lavó una vez durante 15 min y 3 veces durante 5 min con TBS-T a temperatura ambiente con agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo IgG HRP conjugada, AS09 602 o anti-pollo IgY HRP conjugada AS09 603; Agrisera) diluido a 1:50000 en reactivo de bloqueo Advance ECL durante 1 h y a temperatura ambiente con agitación. Se lavó de la misma forma que ya se ha descrito y se incubó durante 5 min con reactivo de detección ECL Select (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. El citocromo b6 (Cyt b6) se determinó en la misma membrana que el complejo mayor de antena (LHCII). Para ello se eliminaron completamente los anticuerpos primario y secundario con el coctel de extracción (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7, 2 β -mercaptoetanol 100 mM y SDS 2% (p/v)). Se incubó a 50 °C durante 30 min con agitación y se lavó dos veces con 250 ml de TBS-T durante 10 min a temperatura ambiente. Después se sumergió en 25 ml de reactivo de bloqueo Advance ECL durante 10 min y a continuación se procedió a la inmunodetección de la proteína Cyt b6. Las imágenes de luminiscencia se adquirieron y analizaron con el equipo ChemiDoc ya mencionado. En el caso de la proteína D1 y de la subunidad grande de la enzima Rubisco se emplearon los patrones AS01 016S y AS01 017S, respectivamente (Agrisera), cayendo las concentraciones de la muestra dentro del rango pseudolineal de la curva estándar de los patrones. No se dispuso de patrones para las otras proteínas aunque se empleó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein WesternC, BioRad). La proteína Rubisco se analizó en todos los experimentos. El resto de proteínas se analizaron en el segundo de los experimentos de cámara.

Tabla 2.1. Anticuerpos empleados para la identificación de proteínas.

Nomb	Descripción	Código Agrisera	Tipo	PM (kDa)	Dilución
RbcL	Rubisco subunidad grande	AS01 017	Policlonal gallina	52	1:50000
Lhcb1	Proteína enlazada a clorofila a/b, complejo mayor de antena (LHCII)	AS01 004	Policlonal conejo	25	1:20000
PsbA	Proteína D1 del PSII	AS05 084	Policlonal conejo	38/28-30	1:35000
Cytb6	Citocromo b6 tilacoidal	AS03 034	Policlonal conejo	23-25	1:50000

2.7.4. Ensayos enzimáticos *in vitro*

En los ensayos enzimáticos se registró durante un tiempo determinado el curso de la reacción observando el cambio de absorbancia en la solución *in vitro*. Las actividades enzimáticas se determinaron en la última hoja en la fase de 3-4 hojas de los dos cultivos de cámara de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Los resultados se expresaron por unidad de tiempo y de peso fresco foliar. El análisis se realizó en 5 repeticiones, cada una integrada por varias hojas de distintos individuos por cada genotipo, misma edad de la hoja y la planta y concentración de CO₂ de crecimiento.

2.7.3.1. Rubisco

La actividad de la enzima Rubisco se analizó mediante el ensayo espectrofotométrico descrito por Lilley and Walker (1974) y modificado por Sharkey *et al.* (1991). El ensayo incluye una cascada de reacciones, una de las cuales se acopla a la oxidación de NADH, midiéndose la disminución de absorbancia a 340 nm durante 30-60s. La estequiometría entre oxidación de NADH y carboxilación de Ribulosa-1, 5-bisfosfato (RuBP) es 2:1, por lo que la velocidad de carboxilación será la mitad de la de oxidación de NADH (Fig. 2.10). La reacción catalizada por la creatina kinasa se acopló para evitar la generación de una razón ATP/ADP baja, desfavorable para la catálisis de la fosfoglicerato kinasa.

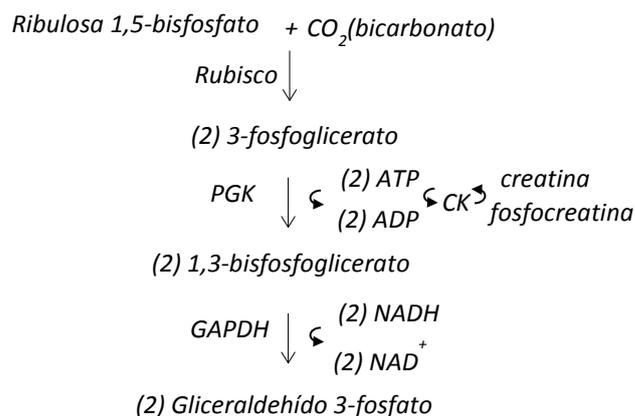


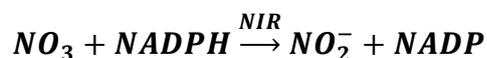
Figura 2.10. Cascada de reacciones para el ensayo in vitro de la actividad Rubisco mediante la medida de la velocidad de cambio de absorbancia por formación de NAD⁺.

Se pesaron 80 mg de hoja congelada en nitrógeno líquido y se pulverizaron en mortero frío. Se extrajo la enzima Rubisco con 4 ml de tampón (Bicina pH 7.8 100 mM, MgCl₂ 10mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, benzamidina 1 mM, ácido 2-aminocaproico 1 mM, leupeptina 10 μM, PMSF 1 mM, Triton X-100 1 % v/v, BSA 0.25 % p/v, glicerol 20 %). Se centrifugo el extracto a 15000 g durante 1 min y 20 μl de sobrenadante se añadieron a una cubeta con tampón complementario (Bicina-NaOH pH 8.2 100 mM, MgCl₂ 20 mM KCl 18 mM, ATP 1 mM, DDT 10 mM, EDTA 1 mM, fosfocreatina 5 mM, NaHCO₃ 10mM, BSA 0.2mM, fosfoglicerato kinasa 47 U ml⁻¹, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa 47 U ml⁻¹, fosfocreatina kinasa 25 U ml⁻¹, NADH 0.2 mM, RuBP 0.6 mM) para determinar la actividad Rubisco inicial. La actividad total se determinó después de incubar 20 μl de extracto con NaHCO₃ y MgCl₂ durante 10 min a temperatura ambiente antes de añadir los enzimas acoplantes y NADH; la reacción se inició añadiendo RuBP. El estado de activación se estimó como la actividad inicial como porcentaje de la actividad total.

2.7.3.2. Nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa se valoró según el método propuesto por MacKintosh (1992), con ciertas modificaciones introducidas por Scheible *et al.* (1997). Se cuantificó cinética y colorimétricamente mediante espectrofotómetro

la cantidad de ion NO_2^- , producto resultante de la reacción que cataliza la enzima (Ec. 2.8):



Ecuación 2.8. Reacciones para el ensayo in vitro de la actividad nitrato reductasa.

Se emplearon 150 mg de material vegetal previamente congelado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y pulverizado en mortero con nitrógeno líquido. Se añadió cuatro veces el peso en volumen de tampón de extracción (Hepes-KOH 100 mM pH 7.5, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10 % v/v, DTT 5 mM, BSA 1% p/v, Triton X-100 0.1% v/v, PMSF 0.5 mM, FAD 20 μM , leupeptina 25 μM , Na_2MoO_4 5 μM , PVPP 1 % p/v). Posteriormente se inició la reacción añadiendo 165 μl de extracto en cinco volúmenes de tampón A (Hepes-KOH 100 mM pH 7.5, KNO_3 5 mM, EDTA 5 mM, leupeptina 15 μM , FAD 10 μM , NADH 0.5 mM, DTT 0.25 mM y Na_2MoO_4 5 μM), para la valoración de la actividad nitrato reductasa máxima, o B (Hepes-KOH 100 mM pH 7.5, KNO_3 5 mM, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM, leupeptina 15 μM , FAD 10 μM , NADH 0.5 mM, DTT 0.25 mM y Na_2MoO_4 5 μM) para la valoración de la actividad nitrato reductasa selectiva (Huber *et al.*, 1992; Scheible *et al.*, 1997), todo ello a una temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ y se tomaron alícuotas de 300 μl a los 2, 4 y 6 min, parando la reacción con 25 μl de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ 0.6 M. Se añadieron 0.75 μl de metosulfato de fenazina 0.25 mM para la oxidación del NADH remanente que pudiera interferir en la medida de nitrito (Scholl *et al.*, 1974). Las muestras se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 min. Después se añadieron 300 μL de sulfanilamida 1 % en HCl 3N y 300 μL de N-naftiletildiamina (NNEDA) 0.02 % en agua a cada muestra para la coloración del NO_2^- y se incubó 20 min, se centrifugó durante 5 min y se midió la absorbancia a 540 nm. Como control se empleó el tampón A en presencia o ausencia de 10 nmol de nitrito a tiempo cero, siguiendo el procedimiento ya descrito a temperatura ambiente. La diferencia en absorbancia entre los controles, con o sin nitrito añadido, fue establecida como el equivalente a 10 nmoles de nitrito para calcular la actividad nitrato reductasa de las muestras, que se expresaron por unidad de peso fresco y por hora. El estado de activación del enzima se expresó como la razón de su actividad en presencia (tampón A) o

ausencia (tampón B) de Mg^{+2} 10 mM, multiplicado por 100 (Mackintosh *et al.*, 1995).

2.8. Análisis de expresión génica y el transcriptoma

La transcripción es únicamente uno de los niveles de regulación génica, la abundancia de transcritos no es necesariamente indicativo de la expresión de proteínas o su actividad. En cualquier caso, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) es una cuestión de considerable interés en la medida de la expresión génica. Dos de los métodos para medir la cantidad de un único ARNm son la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), lo que nos permite cuantificar la presencia de una transcripción específica incluso en unos pocos nanolitros de extracto celular. Por su alta sensibilidad fue una de las técnicas seleccionadas. El otro método, que permite la detección de un alto número de transcritos de una célula, es el del microarray de ADN. Mediante el uso de una plataforma que contienen miles de sondas de ADN complementario a las transcripciones de la célula, podemos analizar simultáneamente miles de ARNm diferentes.

2.8.1. Análisis paralelo de la expresión génica: microarray

El procedimiento básico del análisis de la expresión génica por microarray consiste en depositar una pequeña cantidad del ADN correspondiente a una colección de miles de genes (sondas) sobre una superficie de apenas unos centímetros cuadrados, para después interrogar esas sondas con la hibridación de ARN mensajero “diana” que ha sido marcado con fluorescencia (Duggan *et al.*, 1999). La cantidad de dianas es proporcional a la abundancia de transcritos en la muestra, y es detectada como la intensidad de señal de fluorescencia. Un cambio en la abundancia es medido como el incremento o decrecimiento de señal con respecto a la señal de la muestra de referencia, en nuestro caso Graphic. Estimar la abundancia absoluta de cada transcrito en cada muestra es aproximado, por lo que analizar los resultados implica la comparación entre tratamientos de los diferentes niveles de expresión.

2.8.1.1. Diseño del microarray

Se utilizaron microarrays diseñados por el Dr. Sreenivasulu del departamento de genética molecular del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Gatersleben, Alemania). Se usaron 50938 Expression Sequence Tags (EST) consensuadas y ensambladas (unigenes) de la base de datos HarvEST de cebada (<http://harvest.ucr.edu/>), que tiene alrededor de 450.000 ESTs (Close *et al.*, 2009). Siguiendo los parámetros que por defecto se indican en Web-based Agilent eArray software (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>), se sintetizaron múltiples sondas de oligonucleótidos con 60 nucleótidos de longitud para secuencias únicas, generando un microarray de 244k (Agilent Technologies). Se realizó un estudio previo para identificar y omitir oligos con potencial para hibridar entre unigenes de una misma familia de genes. Se seleccionaron los oligos con mejor puntuación en base a parámetros de Agilent. Se diseñó un eArray personalizado para generar posteriormente los microarrays Agilent de 56 K para cebada (formato complejo 8x60k) que se usaron en este estudio. Todos los conjuntos de unigenes se han anotado y clasificado en categorías funcionales según Thimm *et al.* (2004).

2.8.1.2. Extracción de ARN para microarray

Cuando más del cincuenta por ciento de las plántulas del primer experimento de cámara de crecimiento tenían la segunda hoja completamente expandida, se cosechó la primera hoja con 6 repeticiones, cada una con 3-5 hojas, de G132 y el genotipo silvestre Graphic en las dos concentraciones de CO₂ de crecimiento. Estas muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior tratamiento. Se homogeneizaron en un módulo criogénico automático de molienda y dispensado para su posterior almacenamiento a -80 °C. El ARN total fue aislado a partir de las muestras descritas con una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, según el método de aislamiento de ARN de una sola etapa desarrollado por Chomczynski and Sacchi (1987), con alguna modificación. Consiste en la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases, acuosa y orgánica, seguida de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol, respectivamente, a partir de la fase acuosa. Se

añadió 1 ml de TRIzol (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) en tubos que contenían aproximadamente 100 mg de muestra. Se homogenizó con vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Para separar las fases se centrifugó a 15000 g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló con vortex durante 2 min. Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min y se centrifugó a 15000 g a 4 °C durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un columna de filtrado (QIAshredder spin column; Quiagen) para eliminar cualquier resto de tejido y se centrifugó a 15000 g durante 2 min. Sobre la muestra se añadieron 350 µl de tampón RTL (RNeasy Plant Mini Kit; Quiagen) con βmercaptoetanol (1 % v/v) y se mezcló cuidadosamente. A continuación se añadieron 250 µl de etanol absoluto para diluir el ARN. Se recuperaron 700 µl de la mezcla para filtrar y lavar el ARN en columna (RNeasy Mini Spin Columns; Quiagen). Se centrifugó a 9000 g durante 15 s y se añadieron 350 µl de tampón de lavado RW1 (RNeasy Plant Mini Kit; Quiagen) para centrifugar en las mismas condiciones. Para eliminar la contaminación de ADN se vertieron 80 µl de tampón RDD-Dnase I (RNase-Free DNase Set; Quiagen) directamente sobre la membrana de silica-gel para filtración y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min. Se lavó de nuevo con 350 µl de RW1 y la columna se centrifugó a 9000 g durante 30 s, descartando el fluyente. Se lavó la columna con 500 µl de RPE (RNeasy Plant Mini Kit; Quiagen) y se centrifugó 30 s a 9000 g, se lavó con 500 µl de RPE y se centrifugó 2 min a 10000 g. Se transfirió la columna a un nuevo tubo y se centrifugó 1 min a 15000 g para secar por completo la membrana de la columna. Una vez seca, la columna se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 50 µl de agua libre de ribonucleasas (RNeasy Plant Mini Kit; Quiagen) precalentada a 50 °C, dejando disolver el ARN durante 3 min. Para recuperar el ARN diluido se centrifugó finalmente durante 1 min a 15000 g.

2.8.1.3. Preparación, hibridación y escaneo de muestras del microarray

Se midieron las concentraciones de ARN usando un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer) y se midió la calidad del mismo usando un Agilent 2100 Bioanalyzer y RNA Nano 6000 kit (Agilent). Este kit contiene chips y reactivos diseñados para el análisis de fragmentos de

ARN. Cada chip de ARN contiene un conjunto interconectado de microcanales que se utiliza para la separación de fragmentos de ácidos nucleicos basándose en su tamaño a medida que son impulsados a través de él electroforéticamente. Está diseñado únicamente para su uso con el Agilent 2100 Bioanalyzer. La integridad de la muestra se determina no por la relación de las bandas ribosomales, sino por toda la traza electroforética de la muestra de ARN. Esto incluye la presencia o ausencia de productos de degradación. El indicador del grado de degradación de la muestra de ARN es el RNA Integrity Number (RIN). El RIN asignado es independiente de la concentración de la muestra y la repetitividad de los experimentos esta garantizada por este estándar para la integridad del ARN. De esta manera se facilita la comparación de muestras mediante la interpretación de un electroferograma. Un ARN intacto tiene un RIN de entre 9 y 10, como fue el caso para todas las muestras empleadas.



Figura 2.11. Flujo de la preparación de muestras y procesamiento del array.

Tras comprobar que el ARN total extraído de las muestras cumplía con los requisitos de calidad se empleó el kit para One-Color Spike Mix, elemento que se usa como control interno para el procesamiento de arrays de Agilent (Fig. 2.11). Se prepararon las diluciones del One-Color Spike Mix, elemento que se usa como control interno para el procesamiento de arrays de Agilent. En un tubo para cada muestra se añadieron 50 ng de ARN total en un volumen total de 1.5 μ l a 2 μ l de la dilución correspondiente de Spike Mix. Se prosiguió con la síntesis de ADNc mediante la enzima AffinityScript y el cebador T7 promotor. Para etiquetar las muestras de ARN con el marcador fluorescente cianina 3-CTP (Cy3) se transcribió el ADNc con el uso de T7 RNA Polymerase Blend y el mismo fluoroforo Cy3, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNc marcado fue purificado usando RNeasy mini spin columns (Quiagen) y la cantidad de ARNc marcado se midió usando un NanoDrop (ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer), pudiéndose calcular así la actividad específica (pmol cy3/ μ g ARNc) y el rendimiento (ng/ μ l ARNc) de la reacción. Para preparar la hibridación se usaron 600 ng de ARNc (con una actividad específica de 6) marcado con Cy3 y se incubó a 60 °C durante 30 min exactamente en una mezcla de fragmentación. Se incubó en hielo 1 min y se añadieron 25 μ l de 2xGEx Hybridization Buffer HI-RPM, se mezcló cuidadosamente para no producir burbujas y se centrifugó a 15000 g 1 min. Las muestras se usaron inmediatamente y se dispensaron 40 μ l de cada una sobre el chip de formato 8x60k. La hibridación se llevó a cabo a una temperatura de 65° durante 17 h. Con el control de niveles de ozono en el ambiente, los chips fueron lavados y escaneados en alta resolución (3 μ m) usando Agilent DNA Microarray Scanner G2565CA (Agilent). Durante el análisis se empleó un diseño balanceado de las muestras para evitar cualquier interferencia en la medida debida al procesamiento de las mismas (Fig. 2.12).



Figura 2.12. Diseño balanceado de las muestras en chip de formato 8x60k de Agilent.

Las 24 imágenes TIFF resultantes se importaron y procesaron usando Agilent Feature Extraction Software versión 11.0, extrayéndose la información de cada lote de imágenes con la plantilla apropiada para el microarray diseñado (Grid Template 028827_D_F_20100610) y usando el protocolo One-Color Gene Expression (GE1_1100_Jul11) del programa. Se comprobó manualmente que los resultados de las imágenes cumplían los requisitos de calidad para poder proseguir con su análisis. Entre estos parámetros se comprobó que los centroides de los puntos de luz estaban posicionados correctamente, que no había datos atípicos y cómo fue la distribución de los mismos en la imagen y así comprobar que no hubo fallos de hibridación o lavado. Se comprobó también la distribución de la señal media del fondo en cada región del chip y todas aquellas señales de fondo de alta frecuencia fueron eliminadas mediante el Local Background Method. Se analizó si existió una tendencia significativa en la que regiones del microarray fueran más brillantes o más oscuras que otras regiones mediante la raíz cuadrada de la media (RMS) ajustada a los datos en la superficie. El $RMS \times 100$ es aproximadamente el % de desviación media. Se chequeó la distribución espacial de las señales de la mediana para cada fila y columna. Para comprobar la independencia en el uso de la versión del escáner se analizó la señal neta y su desviación estándar.

2.8.1.4. Analisis de resultados del microarray

Los experimentos que superaron el previo control de calidad, que en nuestro caso fueron todos, se procesaron *a posteriori*. Al comparar los datos de un conjunto de One Single Color Microarray, un simple escalado lineal de los datos suele ser suficiente para su posterior análisis. Y según el fabricante el valor de la señal del 75 por ciento de todas las sondas que no son control en el microarray es un valor más fiable y representativo de la señal global en comparación con la señal de la mediana. Por tanto, se utilizó el valor de la señal percentil 75 para normalizar las comparaciones inter-array. Se usaron dos softwares para el análisis de los datos, GeneSpring (v 12) de Agilent y Robin & RobiNA una aplicación de uso libre (Lohse *et al.*, 2012; Lohse *et al.*, 2010). Con el primer software, una vez fueron procesados y normalizados al cuartil 75 los 24 arrays se aplicó un filtro estadístico a los datos realizándose un análisis de la varianza de dos vías (valor

de $P < 0.01$) con corrección de (Benjamini, 1995) para los falsos positivos (FDR) para el test múltiple, y se seleccionaron los datos con un ratio de cambio mayor de dos entre el genotipo mutante G132 y el tipo silvestre, para ambas condiciones de cultivo. Con el segundo software el proceso fue similar, se procesaron y normalizaron las 24 chips y se substrajo la señal de fondo o background para corregir los datos. Para cada array se usó la corrección de (Benjamini, 1995) con corte en un valor de P de 0.05 para la significación de expresión diferencial y aquellos genes que mostraron un log-fold change menor de 2 fueron despreciados en cada array. Los datos cuya señal fue significativa se anotaron mediante el uso de software como Blast2Go, GenBank y Mercator (Benson *et al.*, 2013; Conesa *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2014) para así determinar el significado biológico de los resultados de los 24 chips y las muestras. Y para la visualización de los datos de una forma más comprensible se empleó software para la conformación de diagramas, Blast2Go, MapMan y PageMan (Conesa *et al.*, 2005; Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2006).

2.8.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa

Con el fin de detectar y cuantificar de forma sólida la expresión génica a partir de pequeñas cantidades de ARN, es necesaria la amplificación del transcrito del gen. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método común para la amplificación de ADN. Para la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), el ARN se transcribe primero a ADNc con transcriptasa inversa. La amplificación por PCR del ARNm presente en una muestra rinde una cantidad final de producto que depende del número de copias presente y del número de ciclos de PCR realizados. Se sabe que la fluorescencia emitida durante la PCR en tiempo real está determinada fundamentalmente por la abundancia del ADNc de partida, y su aumento durante la PCR es fuertemente afectado por la eficiencia de la amplificación. Dado que la secuencia específica de los cebadores y la formación de dímeros de cebadores durante la PCR pueden afectar significativamente a la eficiencia de las reacciones de PCR individuales, conviene analizar estos aspectos.

La cuantificación relativa de la RT-qPCR implica la co-amplificación de un control interno simultáneamente con el gen de interés. El control interno se utiliza para normalizar las muestras. Una vez normalizadas se puede hacer una comparación directa de la abundancia relativa de transcritos a través de múltiples muestras de ARNm. Una precaución a tener en cuenta es que el control interno debe ser elegido de manera que no se vea afectado por el tratamiento experimental. El nivel de expresión debe ser constante a través de todas las muestras para que los resultados sean precisos y significativos. Debido a que la cuantificación de los resultados se analiza comparando el intervalo lineal de la amplificación de la muestra y el control, es crucial tener en cuenta la concentración de partida de ARN y su tasa de amplificación antes de iniciar el análisis. Los resultados del análisis se expresan como las proporciones de señal del gen sobre señal de control interno. Así los valores pueden utilizarse para la comparación entre las muestras como la estimación de la expresión relativa de ARN muestral.

2.8.2.1. Diseño experimental de RT-qPCR

Se seleccionaron secuencias analizadas mediante microarray (ver apdo. 2.8.1.1) que mostraron una expresión significativamente diferente entre genotipos y entre condiciones de cultivo y que por su valor biológico podrían ser importantes para dilucidar incógnitas en el estudio. Dichas secuencias se extrajeron de la base de datos HarvEST (Close *et al.*, 2009) de cebada (<http://harvest.ucr.edu/>) y del repositorio de secuencias GenBank del NCBI (Benson *et al.*, 2013). Se diseñaron cebadores para las reacciones de PCR y el diseño tuvo en cuenta un tamaño de 20 nucleótidos, un tamaño de producto de PCR (amplicon) de 60 a 150 nucleótidos, una temperatura de fusión (T_m) de 60 ± 1 °C, un valor máximo de 4 para la autocomplementariedad de un oligonucleótido, un número máximo permitido de tres mononucleótidos seguidos iguales y un porcentaje de guanina y citosina de 50 ± 10 %, todo ello con el uso de Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). Tras diseñar los cebadores la síntesis se encargó a una compañía de servicios externos (IDT, Integrate DNA Technologies).

2.8.2.2. Extracción de ARN para RT-qPCR

El aislamiento de ARN se realizó según el método descrito por Morcuende *et al.* (1998). Se pesaron en eppendorf de seguridad estéril y libre de ribonucleasas 100 mg de material vegetal pulverizado y congelado en nitrógeno líquido. Se homogeneizaron con 450 μ l de tampón guanidina (guanidina 6 M pH 7) que contenía β -mercaptoetanol 50 mM, EDTA 20 mM y MES 20 mM y tras la lisis celular, se añadió un volumen similar de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma, P3803) en proporción 25:24:1 para la precipitación de proteínas. La mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo en hielo hasta su centrifugación a 4 °C en una centrífuga refrigerada para eppendorf (Eppendorf 5415R) a 15000 g durante 15 min. Tras la separación de fases, 400 μ l de la fase acuosa o superior, se recogieron y transfirieron a un nuevo eppendorf estéril y libre de ribonucleasa. A continuación, se precipitaron los ácidos nucleicos a temperatura ambiente durante 15 min por adición de 22.5 μ l de CH₃COOH 1 M y 315 μ l de etanol absoluto y suave inversión del tubo. Las muestras se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones descritas y el sobrenadante se descartó, mientras que el precipitado se lavó con 450 μ l de CH₃COONa 3 M pH 5.5. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min y se retiró nuevamente el sobrenadante y los ácidos nucleicos precipitados se lavaron con 450 μ l de etanol al 70% (v/v), previamente enfriado a 4 °C. Se descartó el etanol de lavado y los restos se eliminaron por evaporación. El ARN precipitado se resuspendió en 50 μ l de agua-DEPC (Dietileno Pirocarbonato 0.1% (p/v)) que contenía inhibidor de ribonucleasas en proporción 0.5% (v/v) (Promega, N2111). Para asegurar una completa disolución del ARN, las muestras se calentaron durante 5 min en un bloque térmico a 50 °C.

Para la valoración de la concentración y calidad de los ácidos ribonucleicos, la cuantificación del ARN total aislado se realizó a 260 nm (Logemann *et al.*, 1987) en un espectrofotómetro UV visible (Nanodrop ND-1000). Sabiendo que 1 densidad óptica a 260 nm (1 OD₂₆₀) es igual a 40 μ g de ARN, el equipo estimó automáticamente la concentración del ARN (ng· μ l⁻¹). La contaminación de la muestras con impurezas orgánicas (p.ej. fenol, cloroformo), inorgánicas y proteínas afecta de forma significativa la sensibilidad y especificidad del resultado. Para determinar el grado de pureza del ARN se determinó la relación de

absorbancia A_{260}/A_{280} , considerando que las relaciones cercanas a 2 son las óptimas, y la relación A_{260}/A_{230} , que no debe ser inferior a 1.8.

Para evitar la degradación del ARN se extremaron las precauciones usando en todo momento guantes y limpiando el área de trabajo e instrumentos de laboratorio con RNase away (7002, Molecular Bioproducts). El agua y las soluciones se trataron con DECP 0.1%, agitándose durante un min, incubándose a temperatura ambiente durante toda la noche en la campana de extracción y autoclavándose posteriormente a 120 °C y 1.06 Kg·cm⁻² durante 20 min (Autester 437-G, JP Selecta) para inactivar el DECP. El tampón guanidina se sometió a una filtración estéril, haciendo pasar la solución a través de una jeringa estéril acoplada a un filtro de acetato de celulosa de 30 mm con un tamaño de poro de 0.2 µ (17462752, Fischerbrand) y recogiendo la solución filtrada en un frasco de vidrio estéril.

2.8.2.3. Digestión del ARN con desoxirribonucleasa.

Las técnicas de análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real o microarrays son extremadamente sensibles a la contaminación de ADN. Esta contaminación puede afectar de forma significativa a la sensibilidad y especificidad del resultado de expresión génica. La posible contaminación de ADN se eliminó por tratamiento con enzima ADNasa. La digestión se realizó con un kit comercial (Turbo DNA-freeTM Ambion; AM1907) en un volumen final de 25 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 5 µg de ARN total, 2.5 µl de tampón 10xDNAasa Turbo y 0.5 µl DNAasa-Free Turbo junto a la cantidad de agua Nuclease-Free necesaria para completar el volumen indicado. Tras un suave homogenizado, se incubó en un bloque térmico (Eppendorf Thermomixer® Comfort) a 37 °C durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 5 µl de reactivo de inactivación de la ADNasa incubándose con esporádica agitación durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugo a 10000 g en centrífuga refrigerada a 4 °C durante 90 s y el sobrenadante fue transferido a un nuevo eppendorf.

La ausencia de ADN y la integridad del ARN digerido se comprobó por electroforesis horizontal (mini-sub®, Cell GT 170-4467, Bio-Rad) en gel de

agarosa (1.5% p/v) teñido con bromuro de etidio. Para la preparación del gel se pesaron 0.9 g de agarosa y se disolvieron en 60 ml de H₂O-DECP, se llevó a ebullición y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se cubrió con tampón de electroforesis TBE (Tris-borato 90 mM, pH 8.3 y EDTA 2 mM) y se cargaron 2 µg de cada muestra en las correspondientes calles con 5 µl de la mezcla glicérica 4.4 % v/v, orange G 1.4 % p/v, azul de bromofenol 3.5 % p/v, xilencianol 3.5 % p/v, bromuro de etidio 0.006% v/v. Se aplicó una corriente de 70 voltios con una fuente de alimentación (EC 250-90, EC Apparatus Corporation) durante aproximadamente 40 min. Una vez finalizada la electroforesis se comprobó la integridad de las muestras bajo la luz UV en transiluminador (GeneGenius Imaging System, Syngene). Se comprobó la ausencia de una banda de ADN y la relación entre las bandas ribosomales 28S y 18S como bandas discretas y cuya relación 28S/18S era cercana al 2 propio de ARN íntegro. Este equipo utiliza el software GeneSnap (Syngene) y permite obtener fotos de los geles de agarosa (Fig. 2.13).

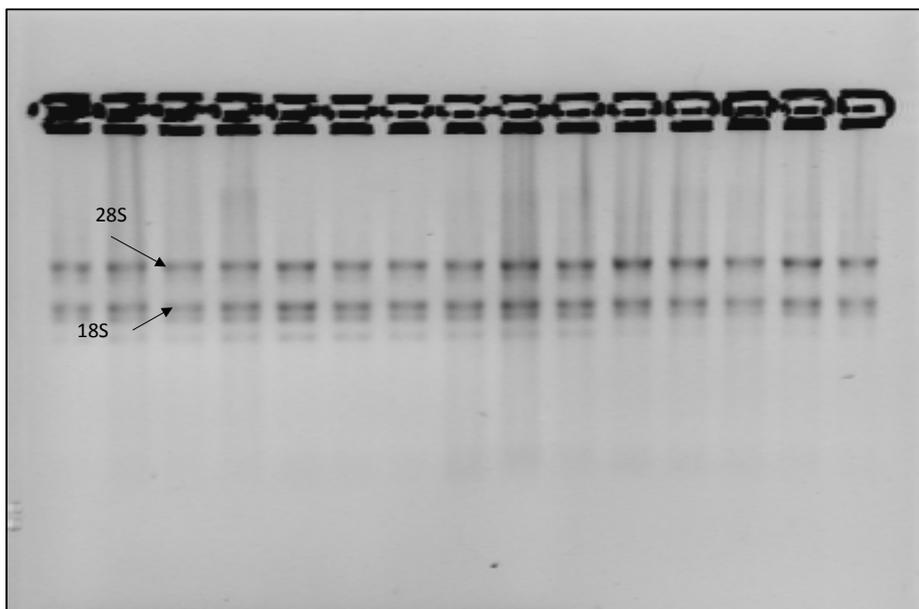


Figura 2.13. Gel de agarosa con las bandas correspondientes a ARN ribosomal (28s, 18s) y otros orgánulos como plastidios y cloroplastos.

La técnica de electroforesis se basa en el desplazamiento en este caso del ARN a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de ésta en una solución de

sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro (Maniatis, 1982).

2.8.2.4. Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADNc a partir de ARN total y libre de contaminación genómica se realizó en un volumen final de 20 μ l con SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18080-044). Siguiendo las instrucciones del fabricante se mezclaron 11 μ l de ARN de la muestra, 1 μ l de Oligo(dT)₂₀ (Invitrogen, 184418-020) y 1 μ l dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 10 mM cada nucleótido; Bionline, BIO-39028) calentándose en un bloque térmico a 65 °C durante 5 min. Se dejó enfriar durante al menos 3 min en hielo y se añadieron 4 μ l de tampón 5xFirst-Strand (Invitrogen), 1 μ l de DTT 0.1 M (Invitrogen), 1 μ l de inhibidor de ribonucleasas (Promega, N2111) y 1 μ l de la transcriptasa reversa SuperScript™ III (200 U/ μ l, Invitrogen). Los componentes de la mezcla se homogeneizaron suavemente y se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 5 min y posteriormente a 50 °C en un bloque térmico durante 1 h. La reacción se inactivó por calentamiento a 70 °C durante 15 min. El ADNc sintetizado se usó como molde para la amplificación en la PCR cuantitativa y se conservó a -20 °C hasta su uso.

2.8.2.5. qPCR

Para realizar la PCR cuantitativa a partir del ADNc obtenido del ARN total de las muestras se usó el kit comercial Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4367659). Incluye SYBR Green I como fluoróforo utilizado como medio de visualización directa de los productos de la PCR en tiempo real. Contiene también la polimerasa AmpliTaq Gold. Las muestras se cargaron en placas de 384 pocillos (4309849, Applied Biosystem) en un volumen final de 10 μ l por reacción. Se añadieron 5 μ l de SYBR Green PCR Master Mix, 4 μ l de cebadores (0.5 μ M) directo e inverso para los genes de estudio, para el gen de la actina como gen de referencia o para la comprobación de contaminación genómica (ver a continuación) y 1 μ l de ADNc diluido 40 veces. Previamente se realizaron pruebas de diluciones con el ADNc para lograr un valor de umbral de

ciclo (C_T) con el gen de referencia próximo a los 20 ± 1 ciclos. Se utilizó agua como control negativo. Después de dispensar los reactivos en la placa esta se cubrió con una película adhesiva (MicroAmp optical adhesive film 4311971, Applied Biosystems) y la placa se centrifugó unos 15 s a 2000 g en una centrífuga refrigerada (Sorvall ST16R, Thermo Scientific) para eliminar las posibles burbujas. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron con un sistema ABI PRISM® 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La PCR se realizó siguiendo el perfil térmico recomendado por el fabricante (Fig. 2.14):

1. Fase inicial a 50 °C durante 2 min.
2. Fase de activación de la polimerasa AmpliTaq Gold a 95 °C durante 10 min.
3. Tercera fase de 40 ciclos:
 - i. etapa a 95 °C durante 15 s para producir la separación de la doble hebra de ADN.
 - ii. etapa a 60 °C durante 1 min para producir la unión del cebador y la extensión de la cadena molde.
4. Fase final con incremento de 1.9 °C/min desde 60 °C a 95 °C para registrar la curva de disociación de los amplicones.

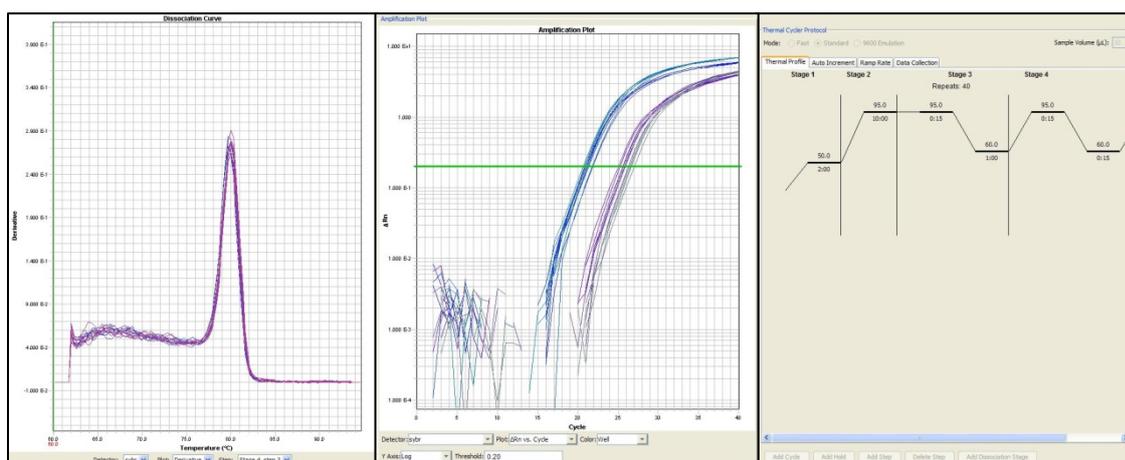


Figura 2.14. Curva de disociación de un producto de PCR, emisión de fluorescencia por ciclo de amplificación, y perfil térmico utilizado.

Se utilizó el programa SDS versión 2.4 (Applied Biosystems) con el protocolo Standard en un volumen de 10 μ l. Para evaluar la reproducibilidad de datos se realizaron 5 repeticiones con tres repeticiones analíticas por muestra. Los resultados se evaluaron por el análisis de las curvas de disociación de los productos de la PCR. Cada secuencia tiene una curva de disociación propia, ya que depende de la composición de nucleótidos. Se comprobó que la curva de disociación de cada gen estudiado era una única y definida. Se comprobó también la presencia de un único amplicon del tamaño esperado por separación electroforética (mini-sub®, Cell GT 170-4467, Bio-Rad) de los productos de la PCR en geles de agarosa de alta calidad (3.5% p/v; Figura 2.15). La agarosa utilizada para la preparación de los geles fue una agarosa MS-8 específica para la separación de pequeños fragmentos de ADN y productos de PCR (Pronadisa Conda, 8066). Para la preparación del gel se pesaron 2.45 g de agarosa y se disolvieron en 70 ml de TBE (Tris-borato 45 mM, pH 8.3 y EDTA 1 mM), se llevó a ebullición y antes de su polimerización a temperatura ambiente se tiñó con 5 μ l bromuro de etidio 0.5 μ g/ml (1510, Sigma). Se cubrió con TBE y se cargaron los productos de la PCR con 5 μ l de la mezcla glicerina 4.4% v/v, orange G 1.4% p/v, azul de bromofenol 3.5% p/v y xilencianol 3.5% p/v. Se colocó un marcador de pares de bases (HyperLadder V, Bioline) para fragmentos de ADN de entre 25 y 500 pares de bases de tamaño. Se aplicó un voltaje de 100 voltios con una fuente de alimentación (EC 250-90, EC Apparatus Corporation) durante 30 min. Se visualizaron las bandas en transiluminador (GeneGenius Imaging System, Syngene) y se comprobó si el tamaño de los amplicones generados se correspondía con los previstos, usando el marcador como referencia.

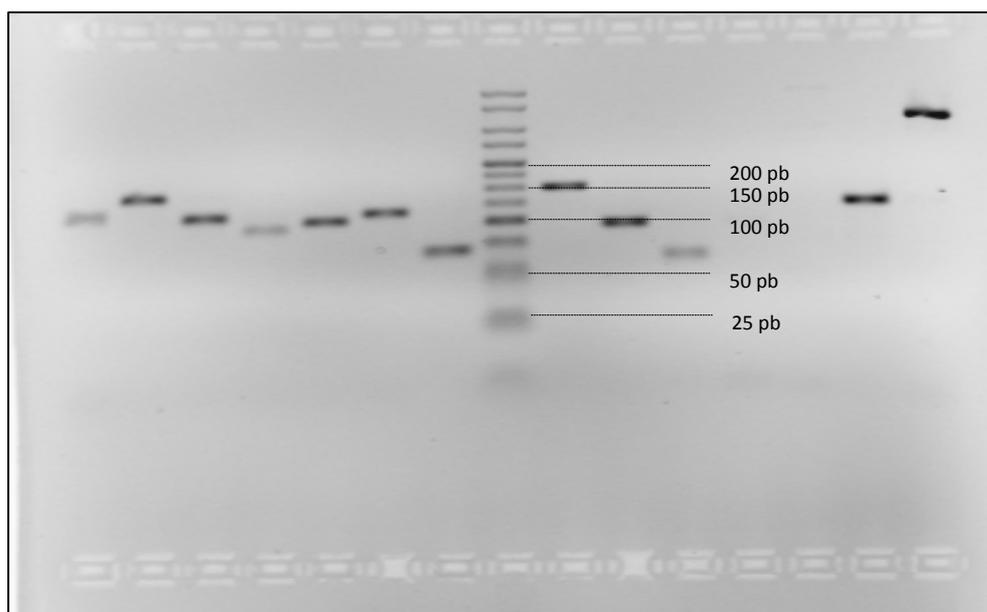


Figura 2.15. Electroforesis en gel de agarosa para comprobar la formación de un amplicón único en la PCR.

La selección de genes de referencia para la normalización de los resultados se basó en la reproducibilidad de niveles estables de expresión en diferentes genotipos, estadios de desarrollo de la planta y condiciones ambientales (Brunner *et al.*, 2004; Czechowski *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2008). Para la identificación se realizó una revisión bibliográfica y se escogió el gen de la actina para la normalización de resultados obtenidos por RT-qPCR (Ozturk *et al.*, 2002). Los cebadores para la amplificación del gen se indican con su número de acceso de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Genes de referencia y cebadores para la amplificación

nombre	numero	cebador directo	cebador inverso
actina	AY145451	GGCACACTGGTGTTCATGG	CTCCATGTCATCCCAGTT

La estabilidad del gen de la actina en cuanto al ciclo de amplificación y la reproducibilidad de su patrón de expresión nos permitió su selección como el gen de referencia más apropiado para la normalización de los resultados de expresión de los genes objeto de nuestro estudio. Para corroborar la ausencia de ADN genómico se utilizaron cebadores específicos (5'-CCCTCAAGCAAGGACTGGAG -3' y 5'-ACCGGTAAGCTTGCCATTCA -3') que se diseñaron para amplificar una secuencia del gen gliceraldehído 3-

fosfato deshidrogenasa (GADPH) que comprendía partes del exón e intrón (EF409633, *Hordeum vulgare* sp. *vulgare* cv. TR306). Se incorporó también en el análisis un control negativo con agua y un control positivo con ADN genómico.

2.8.2.5. Analisis de resultados de qPCR

En cada ciclo de PCR se monitorizó la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de SYBR Green I. Si cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, ésta es proporcional a la cantidad de ADN generado. El resultado se visualizó en un gráfico de amplificación. En él se expresó la fluorescencia registrada por el termociclador en el eje de las ordenadas en escala logarítmica y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas (Fig. 2.14).

De esta forma, la curva de amplificación reflejó una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que hay un incremento en forma exponencial de la fluorescencia y una tercera fase (*plateau*) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. Es posible establecer un valor de fluorescencia umbral (línea Threshold) representado en el gráfico como una recta horizontal que señala la zona de aumento exponencial. Este valor lo establecimos como 0.2 para todas las muestras. Y el punto de intersección de cualquier curva de amplificación con el umbral se le denomina C_T (Threshold Cycle).

La cuantificación se realizó en términos relativos por comparativa de C_T (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008). Esta cuantificación relativa no requiere curva de calibrado. Es irrelevante en qué unidades se expresa la cuantificación y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos. Los genes control corrigen la variación no específica, como las diferencias en la cantidad y calidad del ARN empleado. Los valores de C_T de las repeticiones analíticas de cada muestra se promediaron. En todos los experimentos las eficiencias de replicación de ADN fueron similares y se compararon directamente los C_T del gen de estudio y del control endógeno (ΔC_T) de cada muestra. Los resultados se expresaron como el número de veces que cambia la

expresión entre dos muestras (fold change). Basándonos en que los C_T se asumen de la escala logarítmica, los resultados se expresaron como $2^{-\Delta C_T}$. De esta forma se compararon la intensidad de señal normalizada con el control endógeno (Ec. 2.9).

$$\text{fold change} = \frac{2^{-(C_{TgenA} - C_{TcontrolA})}}{2^{-(C_{TgenB} - C_{TcontrolB})}}$$

Ecuación 2.9. Tasa de cambio en expresión génica entre muestras normalizadas.

La expresión génica se analizó mediante qRT-PCR en la última hoja en la fase de 3-4 hojas del segundo cultivo en cámara de crecimiento y en las hojas última, penúltima y antepenúltima en las fases de 3-4 hojas y 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. El análisis se realizó en 5 repeticiones, cada una integrada por varias hojas de distintos individuos por cada genotipo, misma edad de la hoja y la planta y concentración de CO_2 de crecimiento. De cada una de estas muestras se hicieron tres repeticiones analíticas.

2.9. Determinación de parámetros de crecimiento

2.9.1. Anatomía foliar

Las características anatómicas de las hojas se determinaron midiendo la superficie verde, el volumen y los pesos fresco y seco. La superficie verde se midió con un planímetro fotoeléctrico (Li-3000 A, Li-Cor, Lincoln, NE, USA). El peso se determinó con una balanza electrónica (Precisa XT 220 A, Suiza), registrándose el fresco inmediatamente después de recoger la muestra y el seco después de desecar en estufa a 60 °C 48 h. El volumen se midió colocando las hojas en un tubo de ensayo graduado de 10 ml que se enrasó con una pipeta graduada que contenía 10 ml de tolueno (para evitar la formación de burbujas de aire). El volumen foliar se estimó restando a los 10 ml del tubo el volumen consumido de la pipeta. A partir de estas medidas se determinaron los pesos fresco y seco por unidad de superficie y volumen, así como la razón superficie:

volumen. La diferencia entre los pesos fresco y seco proporcionó el contenido porcentual de agua, obteniéndose también el peso de agua por hoja y por unidad de superficie y de volumen. Estas medidas se realizaron en la última hoja en la fase de 3-4 hojas del segundo cultivo en cámara de crecimiento. Todas las determinaciones se efectuaron juntando 2 hojas y con 5 repeticiones de cada genotipo y concentración de CO₂ de crecimiento.

2.9.2. Densidad de estomas en las hojas

El número de estomas en el haz de las hojas se determinó en impresiones de barniz de uñas tomadas en campos de visión de 1.8 mm², con un microscopio estereoscópico usando 112.5 aumentos. Se contaron 5 campos de visión en el segmento central de cada hoja de un cultivo en cámara de crecimiento, y 10 campos de visión regularmente espaciados en toda la longitud de las hojas de un cultivo en invernadero. Se consideró el índice estomático como la razón entre el número de estomas y el número de células epidérmicas. Estas determinaciones se efectuaron en la última hoja en la fase de 3-4 hojas del segundo cultivo en cámara de crecimiento y en la última hoja en la fase de 5-7 hojas de los cultivos de invernadero. Se emplearon 5 repeticiones por genotipo de cada cultivo y CO₂ de crecimiento.

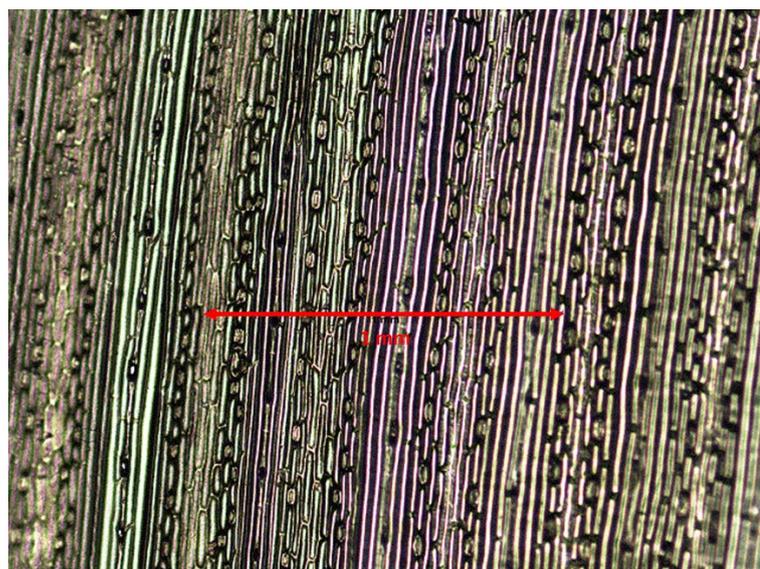


Figura 2.16. Detalle de estomas en lupa binocular.

2.9.3. Peso, superficie verde y producción de grano

Para determinar el crecimiento en la fase vegetativa, en los experimentos en invernadero (véase abajo) se cosechó la parte aérea de las plantas y se determinó su peso seco con el procedimiento detallado en 2.9.1. En el segundo cultivo en cámara de crecimiento se separó la hoja más joven completamente extendida del tallo principal, el resto de este tallo y el resto de la planta. La superficie verde y los pesos fresco y seco de estas partes de la planta se obtuvieron como se indica en 2.9.1. Se consideró la superficie proyectada de las hojas y la superficie externa de los tallos; esta última se calculó a partir de la superficie proyectada considerando el tallo como un cilindro (superficie proyectada $\times \pi$). El peso obtenido de los resultados en contenido de carbohidratos, proteínas, nitrato y aminoácidos se analizaron en relación al peso seco obtenido y determinar de esta forma la parte del peso que correspondía a otros compuestos celulares.

En la madurez en los experimentos de invernadero se contó el número de espigas por planta y el de granos por espiga y se registró el peso seco del tallo con las hojas, de las glumas y raquis y de grano. El peso por grano se obtuvo en una submuestra de 400 granos. El índice de cosecha se calculó dividiendo el peso de grano por el peso del resto de la planta. Mediante análisis de imagen (IPK, Gatersleben) se determinó la superficie del grano, su longitud y anchura, además del peso por mil granos en semillas maduras de ambos genotipos.

Para las medidas de crecimiento en los cultivos de invernadero, para cada genotipo se cosecharon en las fases de 5-7 hojas de madurez 5 repeticiones, cada una integrada por 4 plantas. En el segundo cultivo de cámara de crecimiento, en la fase de 3-4 hojas, se tomaron 5 repeticiones, cada una integrada por 6 plantas, de cada genotipo y concentración de CO₂ de crecimiento.

2.10. Analisis estadísticos

Los efectos e interacciones del genotipo, edad de la hoja y CO₂ atmosférico, según el caso, en cada fase de crecimiento y ambiente de cultivo se determinaron mediante análisis de la varianza (Genstat 6.2) para un experimento de dos

factores (2 genotipos x 3 edades de la hoja; 2 genotipos x 2 concentraciones atmosféricas de CO₂) sin bloques y con las repeticiones indicadas anteriormente. Para valorar las diferencias entre medias se obtuvo el error estándar de la diferencia y la mínima diferencia significativa (P<0.05).

La velocidad de cierre o apertura de los estomas en respuestas a largo plazo a cambios en la concentración de CO₂ y al suministro de DCMU se obtuvo ajustando a la cinética de la conductancia sobre el tiempo las funciones con mejor ajuste. Estas regresiones se analizaron con grupos (análisis de paralelismo, Genstat 6.2) y así se determinó si debería ajustarse para los dos genotipos una regresión común, o regresiones con todos o algunos parámetros separados. Para el ajuste de las regresiones se incluyeron separadamente las 5 o 6 hojas repetidas que se midieron de cada genotipo. La velocidad de cierre o apertura de los estomas se determinó derivando respecto al tiempo las funciones obtenidas.

Los datos del microarray se procesaron usando el programa GeneSpring (v 12). Se aplicó un filtro estadístico a los datos, realizándose un análisis de la varianza de dos vías (P <0.01) con corrección de Benjamini (1995) para los falsos positivos (FDR) para el test múltiple, y se seleccionaron los datos con un ratio de cambio mayor de 2 entre el mutante G132 y Graphic.

Para los cálculos estadísticos de los resultados de la qRT-PCR, se usaron los datos correspondientes a $2^{-\Delta C_T}$ para cada muestra. En el caso de que el valor fuera entre 0 y 1, éste se expresó como la inversa negativa posibilitando que los resultados y el cálculo de sus medias fueran comparables. Finalmente, se calcularon las razones [el Log2 de las razones] de cambio de G132 respecto a Graphic, de CO₂ elevado respecto a CO₂ ambiente, y de posición de la hoja en la planta respecto a la hoja a de Graphic.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización del mutante de cebada G132

3.1.1. Identificación de la variedad de cebada y segregación del carácter del mutante

El genotipado de la línea G132 y la variedad Graphic se efectuó mediante un subconjunto optimizado de 384 marcadores repartidos en todo el genoma (Fig. 3.1), que son polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) incluidos en el Barley OPA1 (Moragues *et al.*, 2010). Este análisis confirmó que la cebada mutante G132 en estudio compartía el mismo fondo genético que la variedad Graphic. Por lo tanto el fenotipo mutante fue atribuido claramente a la mutagénesis.

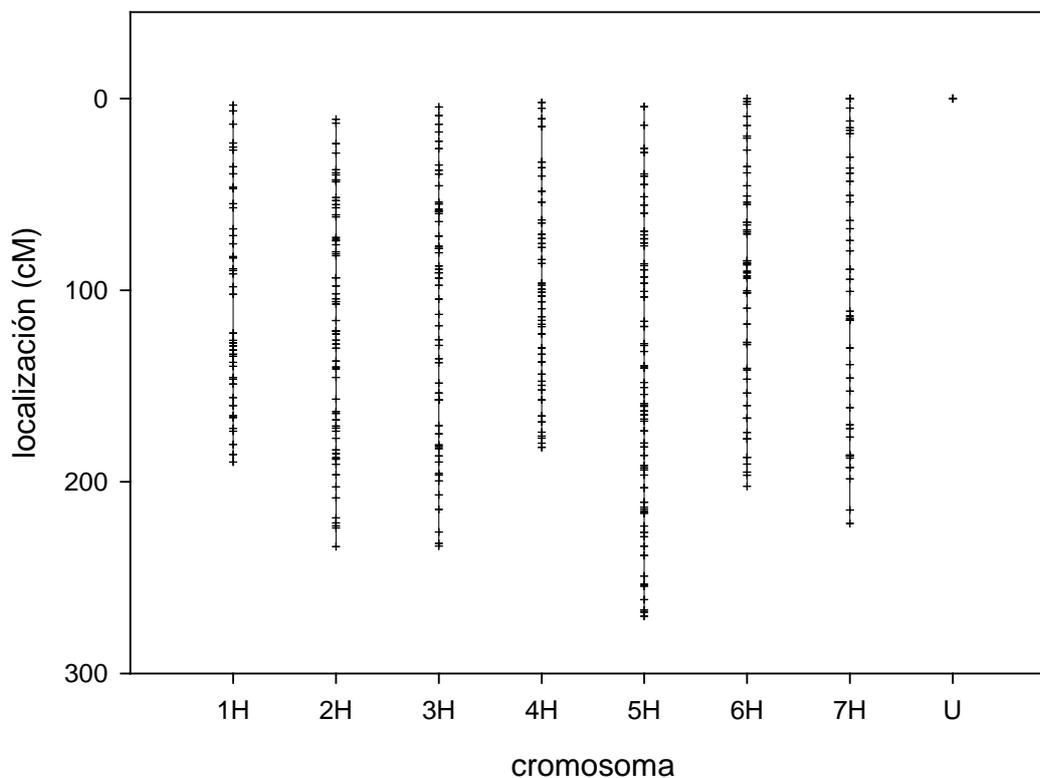


Figura 3.1. Distribución en centimorgans de los 384 marcadores (SNPs) en los siete cromosomas del genoma de cebada.

El análisis de las frecuencias de la segregación del mutante en la generación BC1F2 del retrocruzamiento Graphic x G132, mediante tablas de contingencia y pruebas Chi-cuadrado y Fisher (Tabla 3.1), demostró que el carácter mutante en estudio era recesivo.

Tabla 3.1. Distribución de frecuencias de segregación en la generación BC1F2 del genotipo silvestre y el mutante G132 de la variedad de cebada Graphic.

BC1F2	G132	Graphic	Chi2 Pearson P	Prueba exacta de Fisher P
Observado	32	76	0.116	0.157
Esperado	25	75		

Una característica distintiva del mutante G132 fue que las hojas emergentes presentaron clorosis acusada, de la que se recuperaron en parte progresivamente, de forma que la penúltima hoja desde el ápice fue típicamente más verde que la última (Fig. 3.2A). Otra característica de las plántulas de G132 fue que crecieron más lentamente que el tipo silvestre de Graphic (Fig. 3.2B).

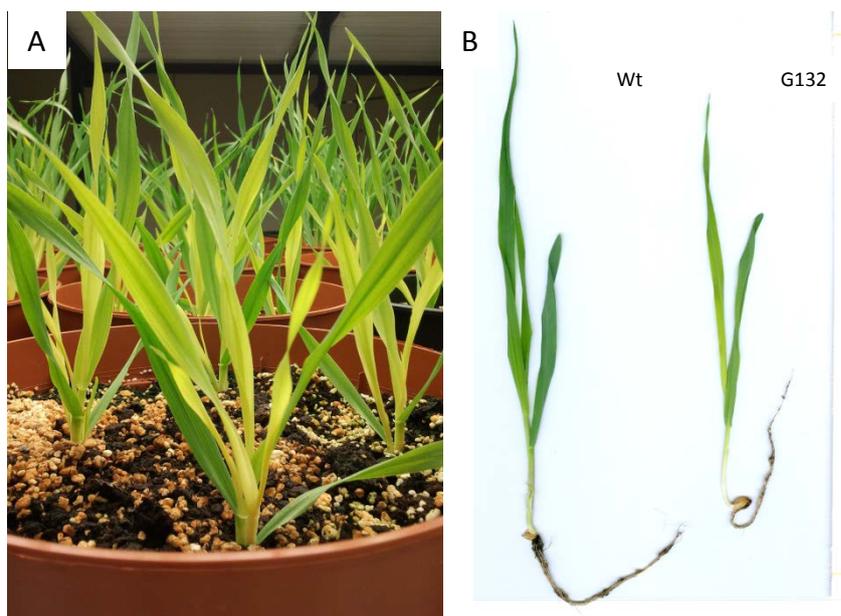


Figura 3.2. Plantas de ambos genotipos de cebada. (A) Plantas del mutante G132 mostrando la clorosis de las hojas más jóvenes y su corrección en hojas de más edad. (B) Comparación de plantas de Graphic (izquierda) y el mutante G132 (derecha) de la misma edad 14 días después de la siembra.

3.1.2. Fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad (F_0), cuando todos los centros del PSII están completamente abiertos, mostró en el primer estadio de

crecimiento de las plantas (fase de 3-4 hojas; 13-14 de Zadoks) valores semejantes para las tres hojas (a, última; b, penúltima; c, antepenúltima) de Graphic y la hoja c de G132, mientras que en el mutante, los valores fueron notablemente mayores que éstos para la hoja b y aún más para la hoja a (Tabla 3.2). En el segundo estadio (fase de 5-7 hojas; 15-17 de Zadoks) no hubo diferencias entre las tres hojas de Graphic, en cambio en las hojas b y c de G132 F_o fue similar y menor que en la hoja a. En su conjunto, F_o fue mayor en G132 que en Graphic. La eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) representa la eficiencia máxima con la que la luz absorbida por el PSII se convierte en energía química. Los valores para plantas sanas en diferentes especies rondan el 0.83 (Björkman and Demmig, 1987). En el primer estadio, las tres hojas de Graphic tuvieron un valor de 0.80 ± 0.01 y las b y c del mutante G132 valores no significativamente inferiores. La hoja más joven de G132 mostró valores significativamente menores que el resto. En el segundo estadio, Graphic tampoco mostró diferencias entre hojas, con valores de 0.80 ± 0.02 , pero sí mostró que en las hojas a y b F_v/F_m fue mayor que en las tres hojas de G132, al mismo tiempo que las hojas c de ambos genotipos no mostraron diferencias significativas. En G132 F_v/F_m en la hoja c fue mayor que en la hoja a, pero no mostró diferencia con la hoja b. Siguiendo el modelo de Jago para el PSII, en el primer estadio la fracción de centros abiertos del PSII (q_L ; con la Q_a oxidada) no mostró diferencias con la posición de la hoja, mientras que en el segundo estadio disminuyó al aumentar la edad de la hoja en los dos genotipos. Graphic y el mutante G132 poseían similar fracción de centros abiertos del PSII. La eficiencia cuántica máxima en la luz (Φq_L) fue significativamente diferente entre genotipos y entre hojas, siendo menor en G132 y aumentando, en ambos genotipos, con la edad de la hoja. La eficiencia cuántica operativa del PSII (F_q'/F_m'), como indicador del rendimiento cuántico global de la fotosíntesis, fue mayor en Graphic que en G132. A su vez, F_q'/F_m' en la hoja más joven de G132 fue menor que en las hojas b y c en el primer estadio, mientras que en el segundo las tres hojas no mostraron diferencias, como consecuencia de un aumento respecto al primer estadio en la eficiencia de la hoja a y una disminución en las hojas b y c. En Graphic, tanto en el primer estadio como en el segundo las hojas no mostraron diferencias en F_q'/F_m' . Ocurrió de la misma forma para la tasa de transporte electrónico (ETR), para la que los valores de Graphic fueron mayores

que en el genotipo G132. En el primer estadio, ETR fue menor en la hoja a que en b y c de G132, y en Graphic no hubo diferencias entre hojas, mientras que en el segundo estadio las hojas no mostraron diferencias dentro de cada genotipo. Φ_{NPQ} , el rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica, representa la eficiencia con la que los procesos no radiativos disipan la excitación en forma de calor y fue significativamente distinto entre ambos genotipos en los dos estadios, mostrando mayores valores las hojas de G132. El rendimiento cuántico de decaimiento basal no-radiativo (Φ_{NO}), o de otras pérdidas basales no radiativas en el PSII, fue similar en Graphic y G132 en ambos estadios.

Tabla 3.2. Fluorescencia de la clorofila en hojas de Graphic y G132. Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad (F_o), eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (PSII, F_v/F_m), fracción de centros abiertos del PSII (q_L), eficiencia máxima en la luz (Φ_{qL}), eficiencia cuántica operativa del PSII (F_q'/F_m'), tasa de transporte electrónico (ETR), rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica (Φ_{NPQ}) y rendimiento cuántico del decaimiento basal no-radiativo (Φ_{NO}) de la hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzadoms, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos ($n=5$; $P<0.05$).

	Hoja	Genotipo						mds		
		G132			Graphic			Gtpo	Hoja	G x H
		a	b	c	a	b	c			
Fase 13-14	F_o	0.90	0.43	0.29	0.24	0.23	0.23	0.059	0.073	0.103
	F_v/F_m	0.52	0.73	0.72	0.81	0.80	0.81	0.058	0.072	0.101
	q_L	0.43	0.42	0.37	0.43	0.39	0.34	0.075	0.092	0.130
	Φ_{qL}	0.33	0.54	0.69	0.86	0.96	1.06	0.120	0.148	0.209
	F_q'/F_m'	0.14	0.22	0.24	0.36	0.35	0.35	0.026	0.032	0.045
	ETR	62.70	98.80	107.0	169.1	156.2	151.9	15.43	18.89	26.72
	Φ_{NPQ}	0.73	0.68	0.63	0.50	0.52	0.49	0.047	0.058	0.082
	Φ_{NO}	0.13	0.09	0.13	0.13	0.14	0.17	0.031	0.038	0.053
Fase 15-17	F_o	0.61	0.41	0.38	0.21	0.23	0.24	0.037	0.045	0.063
	F_v/F_m	0.61	0.70	0.74	0.81	0.81	0.79	0.033	0.040	0.057
	q_L	0.54	0.49	0.35	0.60	0.43	0.42	0.095	0.116	0.164
	Φ_{qL}	0.33	0.40	0.54	0.69	0.83	0.86	0.088	0.107	0.152
	F_q'/F_m'	0.17	0.19	0.18	0.41	0.36	0.34	0.048	0.059	0.084
	ETR	73.70	81.50	75.90	185.8	166.1	150.1	19.3	23.6	33.4
	Φ_{NPQ}	0.70	0.70	0.71	0.48	0.52	0.51	0.048	0.059	0.083
	Φ_{NO}	0.13	0.11	0.11	0.11	0.12	0.14	0.020	0.024	0.034

3.1.3. Intercambio gaseoso

El análisis de gases en el infrarrojo mostró que la capacidad máxima de carboxilación catalizada por la Rubisco (V_{cmax25} ; normalizada a 25 °C) fue

significativamente mayor en Graphic que en G132 en ambos estadios de crecimiento (Tabla 3.3). En el primero, $V_{\text{cmax}25}$ tendió a aumentar en la hoja b comparada con la a de los dos genotipos, pero la diferencia no fue significativa; en el segundo no hubo diferencia entre hojas de un mismo genotipo. En G132 no fue posible determinar la velocidad de transporte fotosintético de electrones asociado a la reducción de NADP para la regeneración de RuBP ($J_{\text{max}25}$; normalizada a 25 °C) debido a que V_{cmax} limitó la fotosíntesis con todas las concentraciones de CO_2 de la curva A- C_i . $J_{\text{max}25}$ fue similar en las tres hojas de Graphic en el primer estadio de desarrollo y disminuyó significativamente con la edad de la hoja en el segundo. La tasa de respiración en la luz ($R_{\text{d}25}$; normalizada a 25 °C) no mostró diferencias entre genotipos en el primer estadio pero sí lo hizo en el segundo, obteniéndose valores mayores en Graphic que en el mutante. La asimilación neta de CO_2 (A) en la primera fase de crecimiento fue significativamente mayor en Graphic que en G132. Para las medidas realizadas con CO_2 de referencia de $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$, la hoja a de G132 tuvo menos asimilación de CO_2 que la b, mientras que no hubo diferencias entre hojas en Graphic. En la segunda fase de crecimiento y para la medida de referencia de $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , en la hoja más joven A fue mayor en Graphic que en G132, mientras que en hojas de más edad las diferencias entre genotipos no fueron significativas. Las hojas b y c no mostraron diferencias significativas en A dentro de ambos genotipos, mientras que en la hoja más joven A fue mayor que en las dos de más edad en Graphic y que en la hoja c en G132. Para la medida de referencia de $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , Graphic mostró valores de A mayores que G132 en todas las hojas. La asimilación de CO_2 disminuyó de la hoja a a la c de ambos genotipos, alcanzando significación la diferencia de la hoja más joven con la más vieja.

La concentración intercelular de CO_2 del mesófilo (C_i) fue significativamente mayor en G132 que en Graphic, y fue similar entre las hojas de un mismo genotipo, para los dos estadios y ambas medidas de referencia. La conductancia estomática (g_s) en los dos estadios y para las dos concentraciones de CO_2 de referencia fue también mayor en G132 que en Graphic, aunque la diferencia no alcanzó significación en el primer estadio con $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . Solo hubo diferencias de conductancia entre hojas en el segundo estadio para medidas

con $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , con las que la hoja a de ambos genotipos mostró valores mayores que las hojas b y c. La velocidad de transpiración (E) en los dos estadios mostró valores mayores en G132 que en Graphic para el CO_2 de referencia de $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ y no lo hizo para CO_2 de $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$. En el segundo estadio y con $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 la transpiración fue mayor en la hoja a que en las restantes, en ambos genotipos.

Tabla 3.3. Intercambio gaseoso en hojas de Graphic y G132. Velocidad máxima de carboxilación catalizada por Rubisco ($V_{\text{cmax}25}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), velocidad de transporte de electrones (J_{25} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y respiración en la luz ($R_{\text{d}25}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) normalizadas a 25°C , tasa de asimilación fotosintética (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentración intercelular de CO_2 en el mesofilo (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$), conductancia estomática (gs, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y velocidad de transpiración (E, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de la hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Las medidas se realizaron con concentraciones de CO_2 en el aire de 390 y $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$, iluminancia de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20°C y 1.2 kPa de déficit de presión de vapor. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos ($n=5$; $P<0.05$).

	Hoja	Genotipo						mds		
		G132			Graphic			Gtpo	Hoja	G x H
		a	b	c	a	b	c			
Fase 13-14	$V_{\text{cmax}25}$	29.7	36.3	-	71	82.8	-	21.04	21.04	29.76
	$J_{\text{max}25}$	-	-	-	146.9	142.8	-	-	15.49	-
	$R_{\text{d}25}$	2.07	2.28	-	3.96	3.96	-	1.88	1.88	2.66
	A_{390}	5.6	7.4	-	13.6	12.5	-	2.3	2.3	3.3
	C_{i390}	334	327	-	245	262	-	8.8	8.8	12.4
	$g_{\text{S}390}$	289	314	-	205	217	-	59	59	83
	E_{390}	2.6	3.1	-	2.1	2.1	-	0.62	0.62	0.87
	A_{1200}	11.4	15.5	-	21.9	20.4	-	2.21	2.21	3.12
	C_{i1200}	1293	1250	-	1203	1202	-	23.8	23.8	33.6
	$g_{\text{S}1200}$	334	285	-	271	254	-	56	56	79
	E_{1200}	2.8	2.9	-	2.5	2.3	-	0.55	0.55	0.77
Fase 15-17	$V_{\text{cmax}25}$	39.2	35.2	28.8	90.8	73	61	8.6	10.53	14.89
	$J_{\text{max}25}$	-	-	-	145.8	118.9	102.3	-	11.49	-
	$R_{\text{d}25}$	3.72	3.46	3.28	7.62	6.01	5.51	1.176	1.44	2.036
	A_{390}	6.6	5.0	3.8	9.3	4.3	5.1	0.99	1.21	1.71
	C_{i390}	318	300	317	214	236	256	20	25	35
	$g_{\text{S}390}$	197	105	107	99	48	65	28	34	48
	E_{390}	2.1	1.4	1.5	1.5	0.9	1.3	0.29	0.36	0.51
	A_{1200}	15.3	14.6	12.5	19.6	18.2	16.5	1.66	2.04	2.88
	C_{i1200}	1214	1246	1238	1027	1035	1088	56	69	97
	$g_{\text{S}1200}$	160	171	156	102	96	109	26	32	45
	E_{1200}	1.8	2.0	2.0	1.6	1.7	2.0	0.31	0.38	0.54

3.1.4. Densidad y conductancia de los estomas

En el segundo estadio de crecimiento, la densidad de estomas en el haz de la última hoja completamente extendida (hoja a) fue mayor en G132 que en Graphic

y aumentó de la base al ápice en los dos genotipos (Fig. 3.3 A). La conductancia normalizada a la densidad de estomas en la sección central de las hojas fue también mayor en G132 que en Graphic. La frecuencia o índice estomático fue ligera, pero significativamente más alta en el mutante (Fig. 3.3 B).

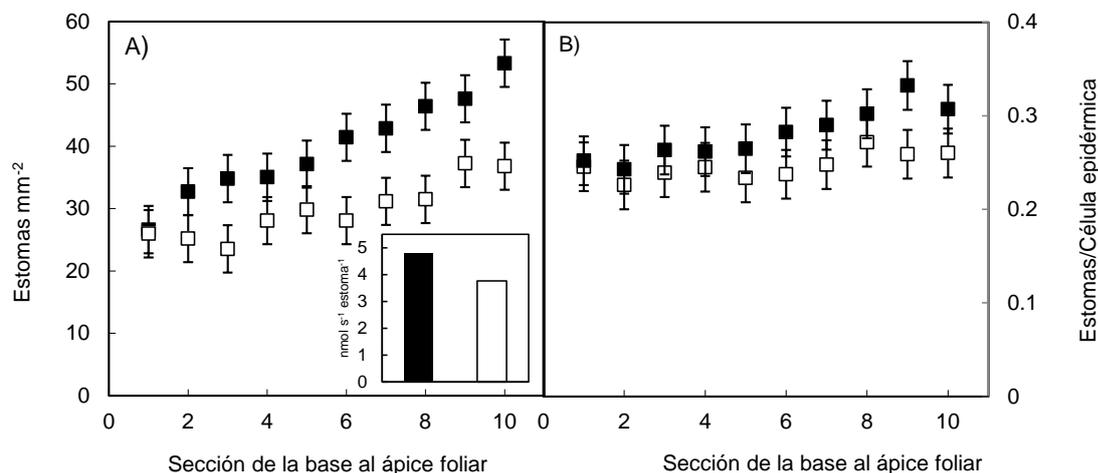


Figura 3.3. Recuento estomático en hojas de Graphic y G132. (A) Densidad de estomas y (B) índice estomático a lo largo del haz de la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando dicha hoja era la 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Las plantas se cultivaron en invernadero. Cuadrados y columnas blancos, Graphic; cuadrados y columnas negros, G132. Las barras verticales representan la mds ($n=5$; $P < 0.05$). Inserción en (A): Conductancia estomática (haz y envés) normalizada a la densidad de estomas en el haz ($\text{nmol s}^{-1} \text{estoma}^{-1}$) de la sección central de las hojas. La conductancia en el estado estable se determinó después de unos 20 min en una atmósfera con $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , iluminancia de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20°C y déficit de presión de vapor de $0.95 \pm 0.12 \text{ kPa}$.

En las medidas de las curvas fotosíntesis- CO_2 en los dos estadios de crecimiento, la conductancia de los estomas cambió poco o aumentó al disminuir el CO_2 atmosférico (C_a) en pasos desde 390 a $60 \mu\text{mol mol}^{-1}$ en unos 10 min (Fig. 3.4), y disminuyó al aumentar de vuelta C_a a $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ y en pasos sucesivos hasta $1800 \mu\text{mol mol}^{-1}$, en un tiempo total de aproximadamente 15 min. El aumento de g_s con C_a decreciente fue menor en G132 que en Graphic. En valores altos de CO_2 , la conductancia disminuyó con C_a creciente en menor medida en G132 que en Graphic.

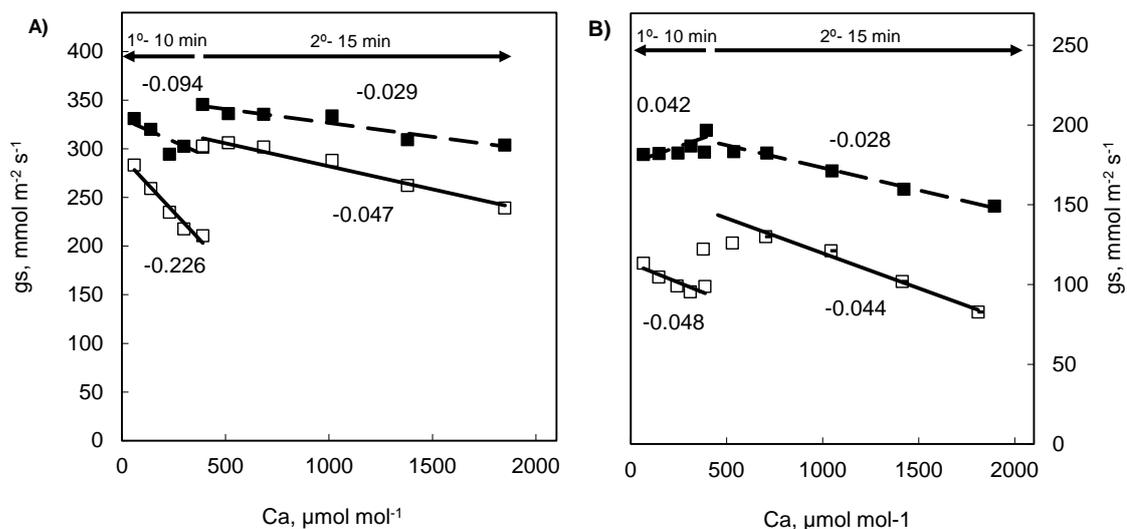


Figura 3.4. Respuestas a corto plazo de la conductancia de los estomas a la concentración atmosférica de CO_2 (Ca) en la cebada Graphic (cuadrados blancos) y el mutante G132 (cuadrados negros) cultivados en invernadero. Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de (A) 3 (G132)- 4 (Graphic) hojas; (B) 5 (G132)-7 (Graphic) hojas. Las flechas horizontales muestran el orden en que la concentración de CO_2 se disminuyó y después se aumentó. Los números son las pendientes de respuesta de g_s a la concentración descendente o ascendente de CO_2 . Cada punto es la media de 5 repeticiones.

Generalmente g_s responde más lentamente que la fotosíntesis a cambios en las condiciones ambientales (Morison, 1998). Por tanto, los cambios a corto plazo de g_s durante las medidas de las curvas fotosíntesis/ CO_2 solo son indicativas de la respuesta inicial g_s/CO_2 . Los parámetros de intercambio gaseoso se determinaron también durante los 40-50 min siguientes a un aumento en un paso desde la concentración ambiental de CO_2 hasta $1800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ con luz roja de alta intensidad. En Graphic la fotosíntesis aumentó inicialmente en pequeña medida y después permaneció estable (Fig. 3.5A). En G132, en cambio, no se observó aumento de la fotosíntesis durante las medidas. La concentración intercelular de CO_2 disminuyó más hasta el estado estable en Graphic que en G132 (Fig. 3.5B), que tuvo mayor C_i . La disminución de g_s como fracción de su valor inicial después de 40-50 min en la concentración elevada de CO_2 fue menor en G132 que en Graphic (Fig. 3.6A). G132 mostró mayor g_s y menor disminución de la misma con el tiempo que Graphic (Fig. 3.6B). Las regresiones de g_s frente al tiempo ($g_s = A + B \cdot \exp^{(k \cdot \text{tiempo})} + C \cdot \text{tiempo}$) para los dos genotipos fueron significativamente diferentes (Tabla 3.4), siendo más lenta la velocidad de cierre

de estomas en el mutante (Fig. 3.6C). Por tanto, la sensibilidad de g_s al aumento de CO_2 fue menor en el mutante G132 que en Graphic.

El papel de la fotosíntesis en la apertura de los estomas se investigó también suministrado el inhibidor del PSII DCMU a hojas cortadas y manteniendo C_i constante en luz roja brillante. Comenzando unos 10 min desde la transferencia del extremo cortado de las hojas a una solución de DCMU 100 μM , la fotosíntesis disminuyó gradualmente hasta alcanzar el punto de compensación alrededor de 90 min más tarde (Fig. 3.7A). La conductancia de los estomas todavía aumentó por unos 20 o 30 min – por más tiempo en Graphic que en G132 - desde la transferencia a DCMU y entonces disminuyó gradualmente. La razón entre g_s final y g_s inicial fue menor en G132 que en Graphic (Fig. 3.7C). La velocidad de disminución de la conductancia fue significativamente mayor en G132 que en Graphic (Tabla 3.4; Fig. 3.7E), alcanzando menores valores el primero. Subsiguientemente, una vez que la fotosíntesis estuvo completamente inhibida, la concentración de CO_2 en el aire se disminuyó a alrededor de 50 $\mu mol mol^{-1}$, lo que indujo un aumento de la conductancia de los estomas a una velocidad similar en los dos genotipos (Tabla 3.4; Fig. 3.7B, F). Unos 100 min desde el descenso del CO_2 , éste se aumentó a 800 $\mu mol mol^{-1}$, provocando una disminución de la conductancia de los estomas hasta valores muy bajos en unos 90 min (Fig. 3.7B). La fracción de disminución en la conductancia estomática fue ligera, aunque significativamente mayor (Fig. 3.7D), y la velocidad de descenso de la conductancia en respuesta al aumento de CO_2 significativamente menor, en G132 que en Graphic (Tabla 3.4; Fig. 3.7F).

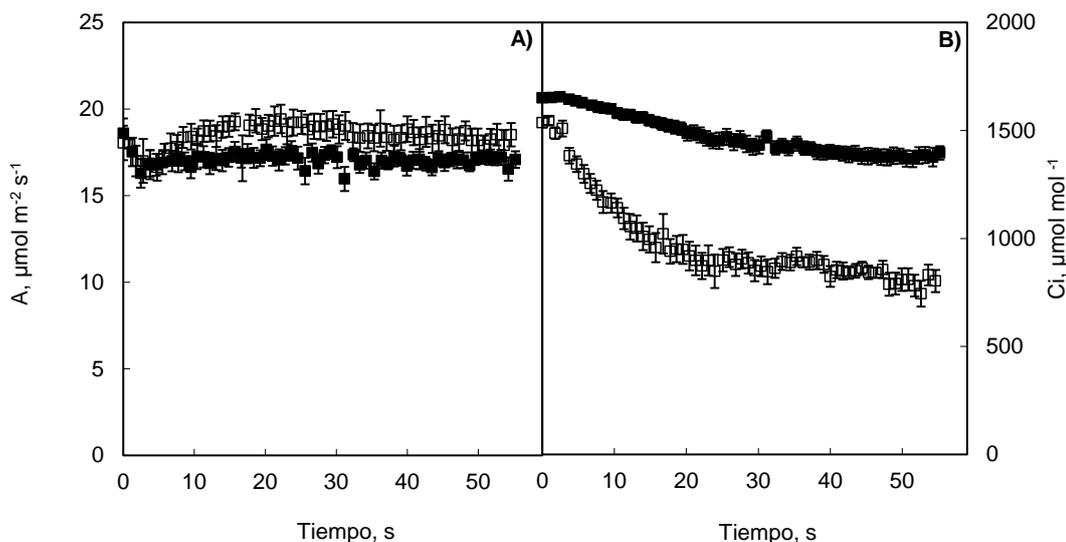


Figura 3.5. Cambio con el tiempo en A y C_i tras un aumento de CO_2 . Cambio con el tiempo en (A) la fotosíntesis y (B) la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) tras un aumento de la concentración de CO_2 de la atmósfera de 390 a 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ con iluminancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz roja en Graphic (cuadrados blancos) y G132 (cuadrados negros) cultivados en invernadero. Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de desarrollo de 5 (G132)-7 (Graphic) hojas. Las barras verticales representan el doble de los errores estándar de las medias ($n=5$).

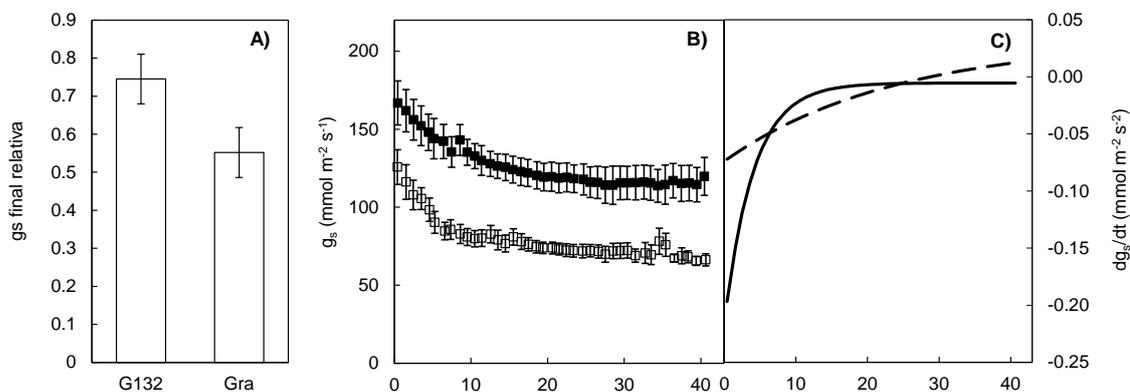


Figura 3.6. Conductancia de los estomas (g_s) tras un aumento de CO_2 de 390 a 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ con iluminancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz roja. (A) g_s después de 40-50 min respecto a la g_s inicial. (B) Cambio con el tiempo en g_s de Graphic (cuadrados blancos) y G132 (cuadrados negros). Se ajustaron regresiones de la conductancia frente al tiempo de la forma (exponencial más lineal) $g_s = A + B \cdot \exp^{(k \cdot \text{tiempo})} + C \cdot \text{tiempo}$. La Tabla 3.4 muestra los parámetros de las regresiones y la significación estadística (análisis de paralelismo) de las diferencias entre genotipos. (C) Velocidades de cambio de g_s con el tiempo para Graphic (líneas continuas) y G132 (líneas quebradas), estimadas como derivadas respecto al tiempo de las curvas en el panel (B). Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de desarrollo de 5 (G132)-7 (Graphic) hojas de plantas cultivadas en invernadero. Las barras verticales representan (A) la mínima diferencia significativa y (B) el doble de los errores estándar de las medias ($n=5$).

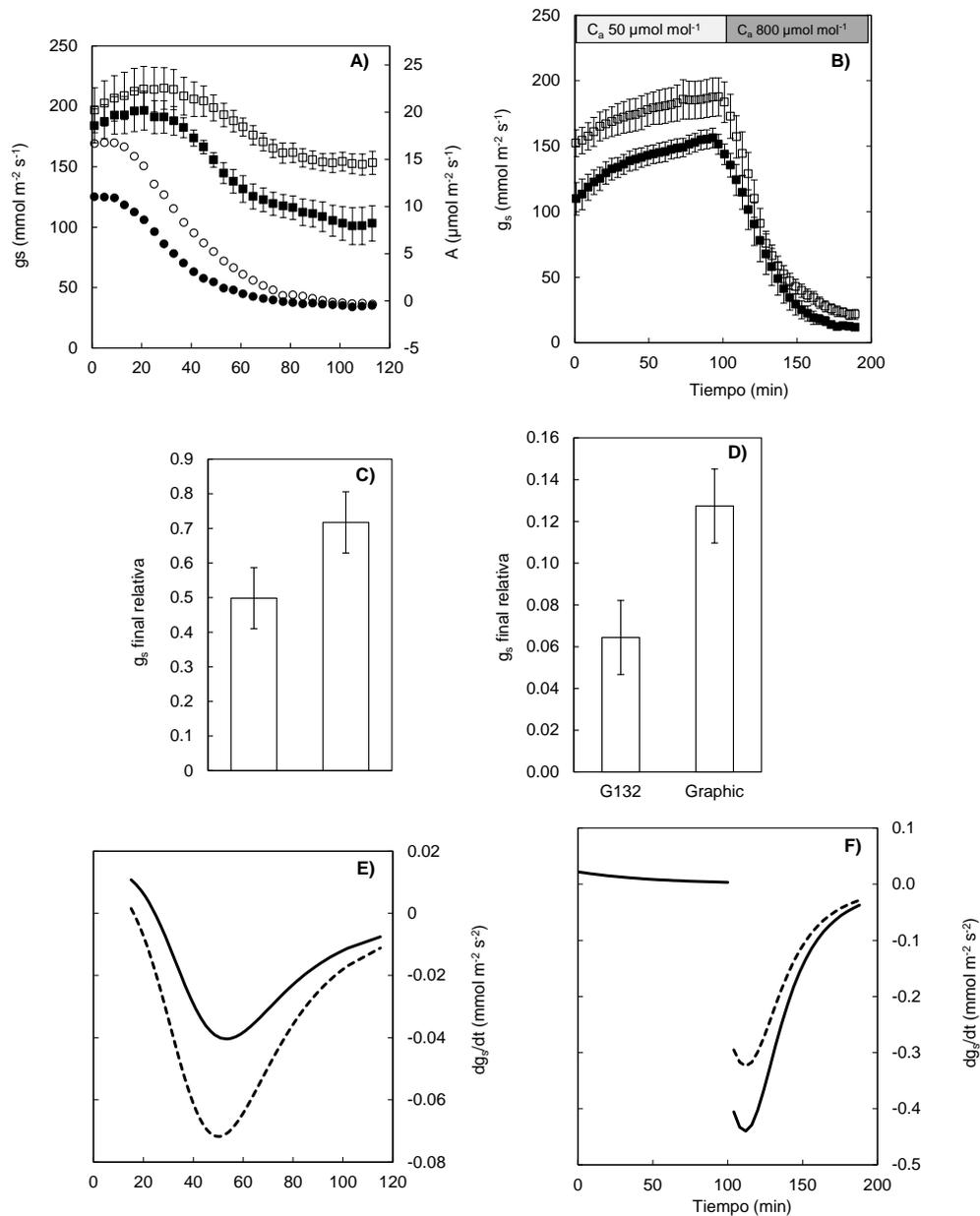


Figura 3.7. Conductancia de los estomas en respuesta al DCMU y CO_2 . Cambio con el tiempo: (A) en la fotosíntesis (círculos) y la conductancia de los estomas (cuadrados) en Graphic (símbolos blancos, líneas continuas) y G132 (símbolos negros, líneas quebradas) después de suministrar a tiempo 0 DCMU 100 μM a hojas cortadas mantenidas en 390 μmol mol⁻¹ de CO_2 con iluminancia de 1000 μmol m⁻² s⁻¹ de luz roja; C_i se mantuvo constante disminuyendo C_a ; (B) en la conductancia al disminuir C_a de 390 a 50 μmol mol⁻¹ de CO_2 y aumentarla posteriormente a 800 μmol mol⁻¹ de CO_2 a continuación de la exposición a DCMU mostrada en el panel (A). La Tabla 3.4 muestra las regresiones de la conductancia frente al tiempo y la significación estadística (análisis de paralelismo) de las diferencias entre genotipos. (C y D) g_s final respecto a g_s inicial después de (C) añadir DCMU; (D) aumentar el CO_2 de 50 a 800 μmol mol⁻¹. (C y D) Velocidades de cambio de g_s con el tiempo, estimadas como derivadas respecto al tiempo de las curvas en los paneles (A) y (B), respectivamente. Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de desarrollo de 5 hojas de plantas cultivadas en invernadero. Las barras verticales representan (A, B) el doble de los errores estándar de las medias y (C,D) la mínima diferencia significativa (n=6).

Tabla 3.4. Regresiones g_s -tiempo y probabilidades en Graphic y G132. Parámetros de regresión y probabilidades en el análisis de paralelismo de las curvas de respuesta g_s -tiempo (t) mostradas en las figuras indicadas. Se ajustó una secuencia de modelos de regresión a los valores para Graphic y el mutante G132 cultivados en invernadero. El primer modelo a ajustar fue una curva única con parámetros comunes para ambos genotipos. A continuación, el modelo se extendió para incluir una constante (A) diferente para cada genotipo, dando dos curvas paralelas. El siguiente modelo tuvo todos los parámetros lineales diferentes para cada genotipo. Finalmente, se ajustaron curvas con todos los parámetros diferentes en los dos genotipos. Se seleccionó el modelo de regresión significativo con mayor complejidad (en negrita).

Experimento	Función	Genotipo	Parámetros de la regresión						P en el análisis de varianza de la regression			
			A	B	C	k	D	E	param. comunes	constantes separadas	param. lineales separados	todos los param. separados
1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ (Fig. 3.6A)	$g_s=A+B \cdot \exp^{(k \cdot t)}+C \cdot t$	Graphic	38.33	74.04	-0.180	-0.2369			<.001	<.001	<.001	<.001
		G132	49.70	139.20	0.215	-0.0643						
390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ DCMU (Fig. 3.7A)	$g_s=A+(B+C \cdot t)/(1+D \cdot t+E \cdot t)$	Graphic	147.60	49.67	-0.415		-0.0249	3.4E-04	<.001	<.001	<.001	0.658
		G132	120.60	67.13	-0.945		-0.0249	3.4E-04				
50 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ con DCMU (Fig. 3.7B)	$g_s=A+B \cdot \exp^{(k \cdot t)}$	Graphic	198.00	-49.26		-0.0186			<.001	<.001		0.315
		G132	162.40	-49.26		-0.0186						
800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ con DCMU (Fig. 3.7B)	$g_s=A+(B+C \cdot t)/(1+D \cdot t+E \cdot t)$	Graphic	44.17	54.32	-0.369		-0.0169	8.2E-05	<.001	<.001	<.001	0.227
		G132	22.08	42.44	-0.269		-0.0169	8.2E-05				

3.1.5. Contenido de clorofilas

El contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total en el primer estadio aumentó en los dos genotipos de la hoja a la b y disminuyó en la c (Fig. 3.8). En la fase 15-17, el contenido de clorofilas cambió poco entre hojas en G132 y disminuyó en Graphic en las hojas b y c respecto a la a. En la primera fase Graphic tuvo más clorofila a y clorofila total que G132 en todas las hojas. La diferencia entre genotipos en contenido de clorofila b tuvo la misma tendencia pero menor magnitud, y solo alcanzó significación en la hoja c.

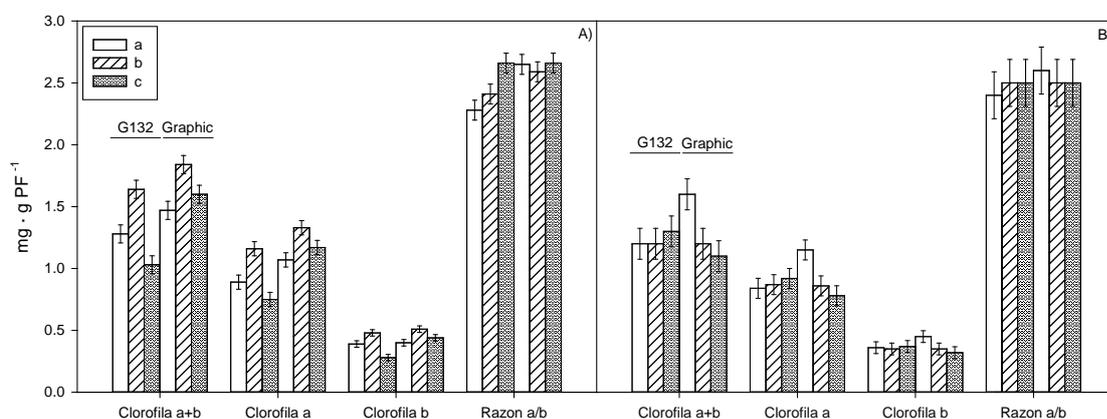


Figura 3.8. Contenido en clorofilas en hojas de Graphic y G132. Contenido en clorofilas a y b, clorofilas totales y razón clorofila a/b de la hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la (A) 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y (B) 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Las plantas se cultivaron en invernadero. Las barras verticales representan mínimas diferencias significativas para la interacción genotipo x hoja ($n=5$; $P<0.05$).

En la fase 15-17 Graphic tuvo más clorofilas en la hoja a que G132, pero tuvo un contenido similar al de este último en las dos hojas de más edad. Con respecto a la razón clorofila a/clorofila b, en la primera fase las hojas a y b de G132 mostraron valores menores que la hoja c y que las tres hojas de Graphic, que al mismo tiempo no mostraron diferencias entre sí. En la fase más tardía no hubo diferencias significativas entre hojas en la razón clorofila a/clorofila b.

3.1.6. Contenido de carbohidratos

El contenido de hexosas libres no fue detectable en las muestras del primer estadio con el análisis fluorimétrico utilizado (menos de $0.3 \mu\text{mol g PF}^{-1}$), mientras que en la segunda fase sí se detectaron, encontrándose mayores contenidos en Graphic que en G132 (Tabla 3.5). Aunque la diferencia entre hojas no fue significativa, los contenidos de glucosa y fructosa en la segunda fase tendieron a ser mayores en la hoja a que en las b y c de G132 y a aumentar de la a a la b y disminuir en la c en Graphic. Los contenidos de sacarosa fueron mayores en Graphic que en G132 en los dos estadios.

Tabla 3.5. Contenido de carbohidratos en hojas de Graphic y G132. Contenido ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$) en glucosa (Glc), fructosa (Fru), sacarosa (Sac), glucosa + fructosa de los fructanos (Ftn (Glc+Fru)) y glucosa del almidón (Alm) de la hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Ftn(Fru/Glc), razón de los contenidos de fructosa y glucosa de los fructanos. Las plantas se cultivaron en invernadero. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos ($n=5$; $P<0.05$).

		Genotipo						mds		
		G132			Graphic			Gtpo	Hoja	G x Hoja
Hoja	a	b	c	a	b	c				
Fase 13-14	Glc	-	-	-	-	-	-			
	Fru	-	-	-	-	-	-			
	Sac	5.60	7.63	4.91	13.90	15.91	16.73	2.01	2.46	3.48
	Ftn (Glc+Fru)	0.92	1.32	1.05	1.94	2.51	3.1	0.765	0.937	1.325
	Ftn(Fru/Glc)	0.5	2.8	0.9	3.7	2.3	2.0	1.56	1.91	2.70
	Alm	0.75	1.74	0.93	2.71	4	4.1	0.577	0.707	1.000
Fase 15-17	Glc	3.37	1.66	0.89	6.34	7.29	5.47	1.307	1.6	2.263
	Fru	3.08	1.71	1.1	6.59	10.19	9.46	2.242	2.745	3.883
	Sac	9.09	9.20	9.04	20.66	18.08	12.90	1.943	2.379	3.365
	Ftn (Glc+Fru)	13.9	14.1	16.9	26.2	30.7	17.5	10.98	13.44	19.01
	Ftn(Fru/Glc)	1.8	2.3	1.9	3.4	4.0	3.8	1.10	1.34	1.90
	Alm	0.33	0.28	0.49	7.34	3.8	1.18	0.847	1.037	1.467

En el primer estadio, aunque los contenidos de sacarosa no fueron significativamente diferentes entre hojas de una misma variedad, en G132 tendieron a aumentar de la hoja a a la b y a disminuir en la c, mientras que en Graphic tendieron a ser menores en la hoja a que en las otras dos. En el segundo estadio, en el mutante los valores fueron semejantes para todas las hojas, mientras que en Graphic la hoja más antigua mostró menos contenido de sacarosa. En cuanto a los fructanos, en los dos estadios se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos, siendo en Graphic más abundantes; no hubo

diferencias significativas entre hojas en el contenido de fructanos . La razón entre fructosa y glucosa procedentes de la degradación de estos carbohidratos es indicativa de la presencia de fructanos y su grado de polimerización. Los valores inferiores a 2 en hojas de G132 (excepto la hoja b) de los dos estadios indican ausencia de fructanos e interferencia de otros compuestos en el análisis. Los ensayos enzimáticos realizados excluyen que se trate de carbohidratos de la serie de la rafinosa. En Graphic esta razón superó dicho umbral, alcanzando como promedio valores más altos en el segundo estadio. Los valores de almidón en los dos estadios fueron también mayores en Graphic que en G132. En el primero hubo menos almidón en la hoja a que en las de más edad en ambos genotipos, mientras que en el segundo los valores fueron semejantes entre hojas para el mutante y distintos para Graphic, siendo la hoja más joven la que más abundancia mostró y la hoja más antigua la que menos.

3.1.7. Contenido de nitrato y aminoácidos

3.1.7.1. Contenido de nitrato

El contenido de nitrato en el primer estadio de muestreo mostró en G132 una disminución de la hoja a a las de más edad y en Graphic una tendencia a aumentar de la hoja a a la b y una disminución significativa en la c respecto a la b (Fig 3.9A). Los contenidos de nitrato de los dos genotipos no fueron significativamente diferentes. En el segundo estadio, los valores de nitrato descendieron respecto al primero, de forma más acusada en Graphic que en G132, que mostró más contenido de nitrato que Graphic. No hubo diferencias significativas entre hojas en el contenido de nitrato en este estadio.

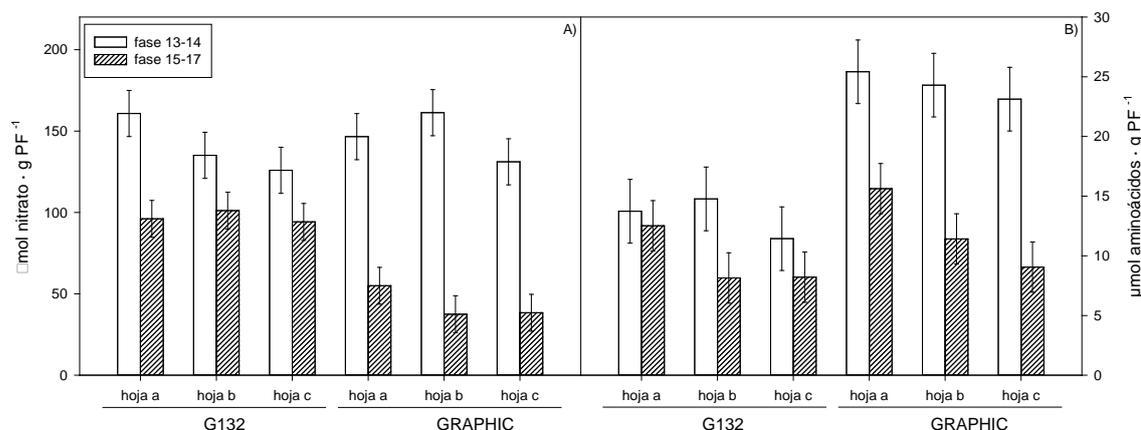


Figura 3.9. Contenido de nitrato y aminoácidos en hojas de Graphic y G132. Contenido de (A) nitrato y (B) aminoácidos de la hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Las barras verticales representan mínimas diferencias significativas para la interacción genotipo x hoja dentro de cada fase (n=5; P<0.05).

3.1.7.2. Contenido de aminoácidos

El contenido en aminoácidos fue cerca del doble en Graphic que en G132 en la primera fase (Fig 3.9B), en la que no hubo diferencias entre hojas en dicho contenido. En la segunda fase de crecimiento, también hubo mayor contenido de aminoácidos en Graphic que en G132, pero las diferencias fueron menores que en la primera fase. Ambos genotipos mostraron mayores contenidos en la hoja a que en la b y c.

3.1.8. Contenido de proteínas y actividades enzimáticas

3.1.8.1. Contenido de proteína total, soluble, Rubisco y de membrana

G132 mostró un contenido de proteínas significativamente menor que Graphic, excepto para la proteína soluble menos proteína Rubisco, en el primer estadio (Tabla 3.6). En ambos genotipos la tendencia fue que la hoja a tuvo menos cantidad de proteína soluble, de membrana y total que la hoja b, mientras que la hoja c tuvo una cantidad inferior a ambas. En cuanto al contenido de enzima Rubisco, en G132 se mantuvo esta tendencia, siendo significativa, mientras que

el genotipo silvestre tuvo mayor contenido de Rubisco en la hoja más joven que en las inferiores. El contenido de proteína soluble restando la cantidad de enzima Rubisco fue inferior en la hoja b que en las otras dos en G132. En Graphic, en cambio, dicho contenido fue inferior en la hoja a que en las hojas b y c. Los western blots mostraron un polipéptido de 33 kDa que reaccionó con el anticuerpo para la subunidad grande de la Rubisco (RbcL). Como fracción de RbcL total, el polipéptido de 33 kDa tendió a ser mayor en G132 que en Graphic, y en las hojas de más edad que en las más jóvenes de ambos genotipos (Fig. 3.10).

Tabla 3.6. Contenido de proteínas en hojas de Graphic y G132. Contenidos (mg g PF⁻¹) de proteína soluble, de membrana, total, Rubisco, soluble menos Rubisco y Rubisco como porcentaje de la proteína soluble en la hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos (n=5; P<0.05).

		Genotipo						mds		
		G132			Graphic			Gtpo	Hoja	G x H
		a	b	c	a	b	c			
Fase 13-14	Prot Rubisco	1.4	2.5	0.95	6	4.6	5.1	0.45	0.52	0.77
	Prot. soluble	7.1	7.3	5.7	11	12.2	10.8	0.52	0.64	0.90
	Prot. membrana	6.8	9.0	5.2	8.9	9.5	7.2	1.00	1.23	1.73
	Prot. Sol.-Rbco.	5.8	3.7	5.9	5.3	6.8	6.2	0.86	1.05	1.48
	Prot. total	13.8	16.4	10.9	19.9	21.8	18	1.11	1.36	1.92
Fase 15-17	Prot. Rubisco	1.6	1.6	1.1	5.3	3.3	2.3	0.80	0.98	1.39
	Prot. soluble	7.5	6.2	6	12.4	8.7	6.4	1.01	1.24	1.75
	Prot. membrana	2.9	3.2	3.1	8.7	5	3.6	1.14	1.4	1.98
	Prot. Sol.-Rbco	5.9	4.9	5.1	7.1	5.4	4.1	1.08	1.33	1.87
	Prot. total	10.5	9.4	9.1	21.1	13.7	10	1.73	2.12	3.00

En el segundo estadio los contenidos de proteína Rubisco, soluble, de membrana y total fueron también menores en G132 que en Graphic, excepto para la hoja c (Tabla 3.6). Al restar la cantidad de enzima Rubisco de la cantidad de proteína soluble, se observó que no hubo diferencias significativas entre genotipos. Las tres hojas de G132 mostraron un contenido similar de todas las fracciones de proteína, mientras que en Graphic dichas fracciones disminuyeron al aumentar la edad de la hoja. La fracción del polipéptido de 33 kDa en el total de RbcL fue mucho mayor en las hojas a y b de G132 que en las de Graphic, mientras que fue no significativamente mayor que en la hoja c del mutante (Fig. 3.10). Esta hoja de más edad tuvo más porcentaje de 33 kDa en el total de RbcL que las hojas más jóvenes en los dos genotipos, de modo estadísticamente significativo en Graphic.

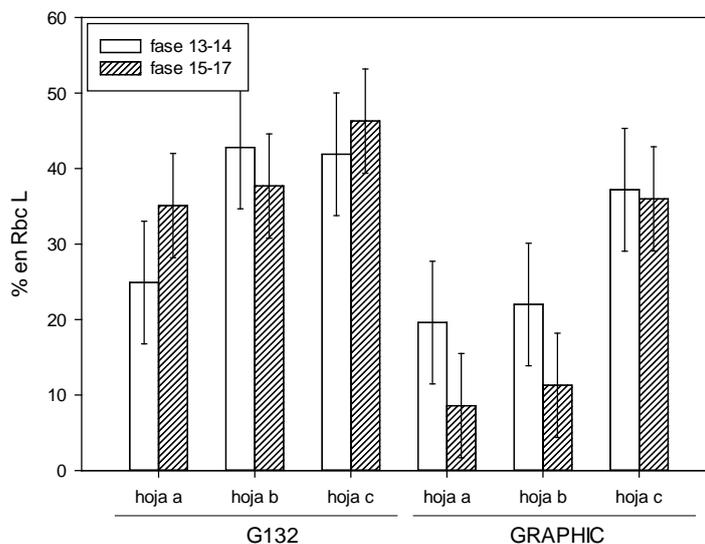


Figura 3.10. Polipéptido de 33 kDa como porcentaje de la subunidad grande de Rubisco en Graphic y G132. La hoja más joven completamente extendida (hoja a), y las dos inferiores (hojas b y c) de cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3-4 (fase 13-14 de Zadoks, barras blancas) y 5-7 (fase 15-17 de Zadoks, barras rayadas), con Graphic más avanzado. Las barras verticales representan mínimas diferencias significativas para la interacción genotipo x hoja dentro de cada fase (n=5; P<0.05).

3.1.8.2. Ensayos enzimáticos *in vitro*

3.1.8.2.1. Actividad Rubisco

La actividad inicial y total de la enzima Rubisco en los dos estadios fue mayor en Graphic que en G132, aunque la diferencia de actividad total de la hoja c en el segundo estadio no fue significativa (Fig. 3.11). El porcentaje de activación de la enzima fue mayor en G132 que en Graphic en ambas fases de crecimiento. En la primera fase no se encontraron diferencias significativas entre hojas, pero la actividad inicial tendió a ser menor en la hoja a que la hoja b de G132. En la segunda fase, las actividades Rubisco inicial y total mostraron tendencias decrecientes de la hoja más joven a la de más edad en los dos genotipos.

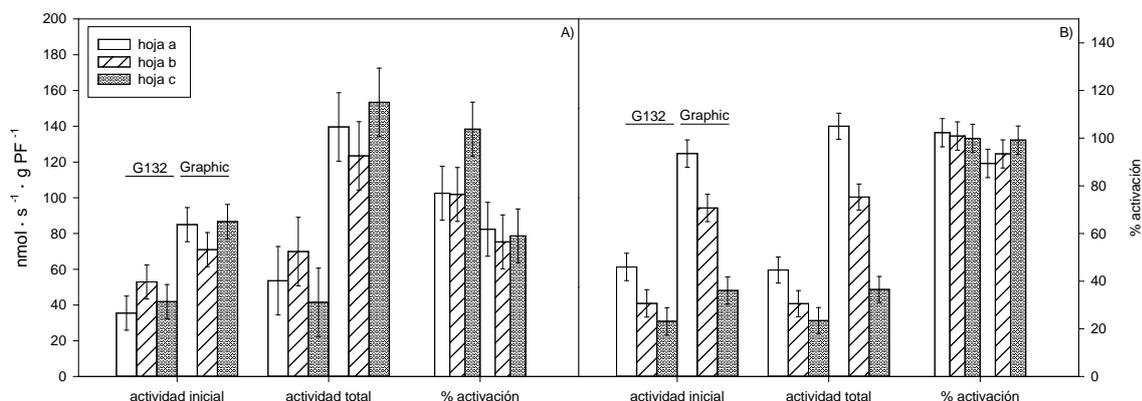


Figura 3.11. Actividad y estado de activación de Rubisco en Graphic y G132. La hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la (A) 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y (B) 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Las barras verticales representan mínimas diferencias significativas para la interacción genotipo x hoja (n=5; P<0.05).

3.1.8.2.2. Actividad nitrato reductasa

Los valores de actividad de la nitrato reductasa fueron en el primer estadio mayores en Graphic que en G132, tanto para la actividad máxima, como para la selectiva (Fig. 3.12), que mostraron valores mayores en la hoja b que en las restantes en G132 y valores similares en las tres hojas de Graphic. La activación de la enzima fue mayor en Graphic que en G132 y menor en la hoja c que en las más jóvenes. En el segundo estadio la actividad enzimática fue mayor en G132 que en Graphic, cuyos valores de actividad descendieron más de 12 veces respecto al primer estadio, mientras que el mutante mostró menores descensos. Las diferencias entre hojas en actividad nitrato reductasa no fueron significativas en el segundo estadio. No hubo diferencias entre hojas en la activación de la enzima, que fue mayor en G132, al contrario de lo observado en el primer estadio.

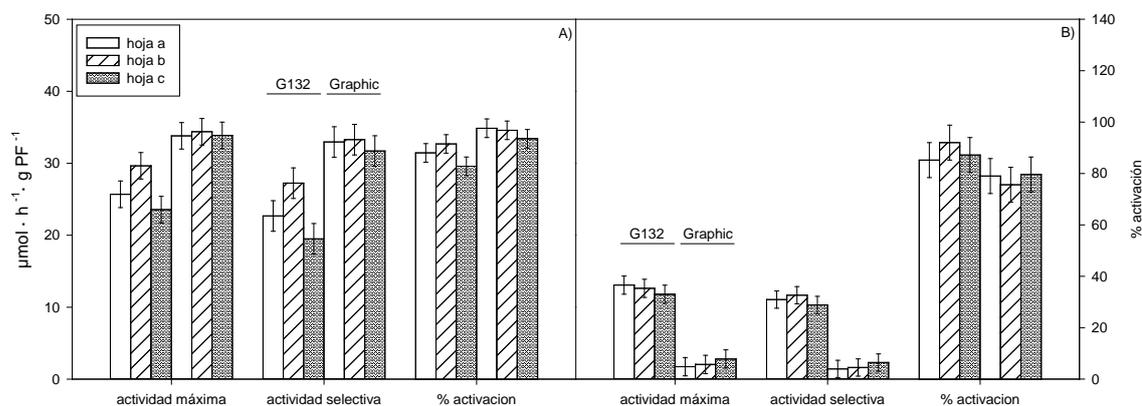


Figura 3.12. Actividad y estado de activación de nitrato reductasa en Graphic y G132. La hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la (A) 3-4 (fase 13-14 de Zadoks) y (B) 5-7 (fase 15-17 de Zadoks), con Graphic más avanzado. Las barras verticales representan mínimas diferencias significativas para la interacción genotipo x hoja ($n=5$; $P<0.05$).

3.1.9. Niveles de ARNm

3.1.9.1 Identificación de genes y cebadores para RT-qPCR

En base a los resultados del chip de ARN descritos más adelante, se seleccionaron los genes de interés que mostraron una expresión diferencial en G132 y Graphic (Tabla 3.7). Estos genes se relacionan con diversos aspectos del metabolismo y otras funciones celulares de interés en la caracterización del mutante. Se comprobó que los cebadores diseñados para qPCR (Tabla 3.7) amplificaban para un único producto atendiendo a su curva de disociación por temperatura y al tamaño esperado de amplicón en gel de agarosa. Se siguió un procedimiento similar para la adopción de genes de referencia y se tuvo en cuenta el umbral de ciclo (C_T).

3.1.9.2 Abundancia de transcritos génicos

En la primera fase de crecimiento, la abundancia de transcritos de genes para el complejo de captación de la luz y la proteína psbP, del PSII, así como para las proteínas psaA y psaB, del PSI, y la subunidad grande (rbcL) de Rubisco fue

mayor en G132 que en Graphic (Tabla 3.8). En contraste, los genes para las proteínas psbQ y psbR, integrantes o asociadas al complejo de producción de oxígeno del PSII, y para la protoclorofilida reductasa A, de la síntesis de clorofila (tetrapirrol), se subexpresaron en el mutante en comparación con el tipo silvestre, el último fuertemente. El nivel de transcritos para enzimas de la síntesis de fructanos (1-SST y 6-SFT) disminuyó también fuertemente en G132 respecto a Graphic. La expresión para la xiloglucano endotransglucosilasa, implicada en la modificación de la pared celular, disminuyó en G132 respecto a Graphic en las dos hojas más jóvenes, pero aumentó en la hoja de más edad. La abundancia de transcritos para la subunidad alfa de la ARN polimerasa plástica, implicada en la transcripción de ARN, y para las proteínas ribosómicas S3 y L6 (subunidades 30S y 50Ss, respectivamente) del cloroplasto aumentaron fuertemente en el mutante respecto a Graphic. Por el contrario, los niveles de dos transcritos de genes para la síntesis de ADN (estructura de la cromatina) disminuyeron fuertemente en G132. Finalmente, el transcrito para una proteína similar a la proteína quinasa HT1, implicada en la respuesta al CO₂ de la apertura de los estomas, fue menos abundante en G132 que en Graphic, significativamente para la hoja más joven.

Tabla 3.7. Lista de genes y cebadores para qRT-PCR y pares de cebadores correspondientes. Se indica el unigen del ensamblaje 35 de HarvEst barley, la accesión correspondiente en GenBank, la descripción del gen obtenida en bases de datos, y los cebadores directo (D) e inverso (I). Se conserva la denominación inglesa encontrada en las bases de datos.

GENBANK	UNIGENE	DESCRIPCIÓN		SECUENCIA (5'-3')
AK356022	35_189	photosystem II light harvesting chlorophyll a/b binding protein	D	CATCCCCTCACGGCTTTCTT
			I	CGCCGCCATTGTAGAGCTAA
AK361860	35_28165	photosystem II light harvesting chlorophyll a/b binding protein	D	CGCCACCAACTTTGTTCCTG
			I	ATCGAAGGCGGGCAAATCTT
AK365564	35_15169	photosystem II subunit R	D	GCGGATTATAACCGTCAGGACA
			I	TGTGAGAGAGCTTAGCACTGAA
AK360942	35_26681	Oxygen evolving enhancer protein 3 (PsbQ)	D	AAAGGGGACTACGCAGAAGC
			I	AGCTCTTGATCCGGCAAACA
AK252670	35_6275	photosystem II reaction center PsbP	D	GACCTAGGCCCTCCTGAGAA
			I	ATAGAGCTTGCCATCGTCCG
KC912689	35_31646	photosystem I P700 apoprotein A1/ psaA	D	CGCAAGGAAAAGCGAAAACCT
			I	ATTTGCTCGGAGTTCCCGTT
AGP50910	35_34138	photosystem I P700 apoprotein A2	D	CATTGAAAGCGGGGCCATTC
			I	TGCTCATGGCAAGACGACAT
AGP50919	35_38001	Rubisco large subunit (RbcL)	D	ACGTGCTCTACGTTTGGAGG
			I	GCGGGCCTTGAAAAGTTTTT
U43493		Rubisco small subunit (Rbcs)	D	ACCAACATGCTCGAGAAAAGCA

GENBANK	UNIGENE	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (5'-3')
			I GTGTGGCGTGCAAAGATGT
AK357958	35_2595	Glycosyl hydrolase	D GTCAGAGGAGGAACACTACGCAC
			I GGCGGTCTGAGTCTGTCATAA
AK253058	35_1173	Sucrose: fructan 6-fructosyltransferase	D GTCCCGGAACCTTGTCCAAT
			I GGTAGCACCGTCATAGAGCC
AK366020	35_15653	Sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase	D GGCCAGGAAACAATCTACCCA
			I GGGATGAGAATGACGCGAGA
AK369112	Contig15936_at	Alternative oxidase 1A	D CCGCTCGGGTACCACTAATC
			I TATGGTCCGTTGAACCACCG
AK358343	35_31642	Xyloglucan endotransglycosylase 3	D AACACAAGTTTCCATCCAGCA
			I GTTGCCTGCTCCCAAAAGTA
AK248297	35_17079	glycerophosphodiester phosphodiesterase / phosphoric diester hydrolase	D TTTCTGACTCCAGTGACGC
			I GTCTGGAAGGCAGATGCCAA
AK358128	35_17981	Nitrate reductase [NADH]	D ACCGATCGATGTTTTGCCCT
			I ACAAACACACCCTCAATCGGA
X15869	35_14488	oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase	D CGTGTACTGGAGCTGGAACA
			I GGATTTGCGGTGGATCATGC
AK359654	35_1389	structural constituent of cell wall	D CATAGATCGAGCGGTGGCTA
			I AATCCGGGCCATCATGCTC
AGP50941	35_13021	RNA polymerase alpha subunit	D TGCTTCTCTAGAGTGCCCA
			I TGAGAATTGACAGTTTTTCGTATGGA
AK357412	35_15515	Minichromosome maintenance/DNA- dependent ATPase	D GAAGGGCGTGGGATCATCAA
			I GGTCACCTCGCTCTTGAACA
AK354750	35_14051	histone H3	D TCACCATCATGCCCAAGGAC
			I CGCAGCTGACACATCACAGA
AGP50948	35_8551	ribosomal protein S3 (chloroplast)	D TGTTTGGAGGGGAAGTCTGC
			I GGGTCGTCTCGGAGGAAAAG
AGP50947	35_16486	ribosomal protein L16 (chloroplast)	D AGTGTAACCGTTTGTCCGGG
			I ATATGCACGTCGTGGTGGAA
AK369833	35_20431	protein (tyrosine) kinase	D CAACGGCAACGCTTACAACA
			I TCACAGCAGTAGACCTCCCA
AK365098	35_1989	leucine-rich repeat family protein	D TAATCGTCACGCCCTGGAAT
			I ACGAGTTGTTGCGCTGAAGA
AK368060	35_38703	SLAH3	D CCAACACAAGCAGCAAGACC
			I GAAGCCGTCGAGATGGGAAA

Tabla 3.8. Nivel de expresión génica en hojas de Graphic y G132 (fase 13-14 Zadoks). La hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 3 (G132)- 4 (Graphic) (fase 13-14 de Zadoks), estando Graphic más avanzado en el crecimiento. Con un *mapa de calor*, los números indican el cambio de expresión (razón de logaritmos en base 2) entre genotipos (Graphic como referencia), entre hojas (hoja a como referencia) y en la interacción genotipo x hoja (hoja a de Graphic como referencia). Las categorías funcionales se anotaron con Mercator. P, probabilidad en el análisis de la varianza para los efectos del genotipo, la posición de la hoja y la interacción de ambas; los números en negrita representan efectos significativos (n=3; P<0.05).



Categoría funcional	Nombre	Genotipo x Hoja											
		Genotipo G132/ GRA	Hoja		Genotipo x Hoja						P		
			hoja b	hoja c	hoja a	hoja b	hoja c	hoja b	hoja c	Gtpo	Hoja	G x H	
PS.lightreaction.photosystem ILLHC-II	LHCII	2.12	-2.91	-2.27	1.85	-1.02	-0.12	-3.02	-4.44	<.001	<.001	0.025	
PS.lightreaction.photosystem ILLHC-II	LHCII	1.4	-1.36	-1.72	0.86	-0.14	-0.45	-2.39	-3.07	<.001	<.001	0.841	
PS.lightreaction.photosystem IILPSII polypeptide	psbR	-1.41	1.26	1.32	-1.98	-1.05	0.37	1.34	0.89	<.001	<.001	0.002	
PS.lightreaction.photosystem IILPSII polypeptide	psbQ	-0.53	0.46	0.35	-0.19	0.17	-0.3	0.55	0.66	0.006	0.098	0.148	
PS.lightreaction.photosystem IILPSII polypeptide	psbP	1.16	0.25	0.11	0.48	0.98	1.03	-0.18	-0.88	<.001	0.108	<.001	
PS.lightreaction.photosystem I.LPSI polypeptide	psaA	2.68	-0.12	-0.45	2.24	2.25	1.86	-1.05	-0.86	<.001	0.029	0.108	
PS.lightreaction.photosystem I.LPSI polypeptide	psaB	1.88	-0.29	-0.48	1.44	1.37	1.09	-1.07	-0.88	<.001	0.019	0.308	
PS.calvin cycle.rubisco large subunit	rbcL	1.26	-0.43	-0.17	0.63	0.45	0.85	-0.94	-1.14	<.001	0.031	0.006	
PS.calvin cycle.rubisco small subunit	rbcS	0.17	-0.42	-0.56	-0.37	-0.37	-0.45	-0.85	-1.06	0.334	0.028	0.051	
major CHO metabolism	FEH	-0.68	-0.78	-1.76	-1.08	-1.38	-2.27	-1.08	-2.15	0.027	<.001	0.061	
major CHO metabolism	6-SFT	-2.69	0.03	-0.48	-5.55	-2.04	-3.17	-0.32	-0.69	<.001	0.214	0.045	
major CHO metabolism	1-SST	-2.5	0.05	0.12	-3.35	-2.08	-2.47	-0.15	0.01	<.001	0.957	0.731	

		Genotipo x Hoja										
		Genotipo	Hoja		G132			Graphic		P		
Categoría funcional	Nombre	G132/ GRA	hoja b	hoja c	hoja a	hoja b	hoja c	hoja b	hoja c	Gtpo	Hoja	G x H
mitochondrial electron transport	Alternative oxidase 1A	-1.25	1.65	2.31	0.58	1.67	1.05	2.21	3.38	<.001	<.001	<.001
cell wall.modification	Xyloglucan endotransglycosylase	-0.47	-3.63	-3.43	-0.59	-5.27	-2.95	-3.2	-5.39	0.14	<.001	0.052
lipid degradation.lysophospholipases	glycerophosphodiester phosphodiesterase	-0.01	-0.86	-1.22	0.16	-1.05	-1.03	-0.55	-1.23	0.957	0.001	0.469
N-metabolism.nitrate metabolism.NR	Nitrate reductase [NADH]	-0.14	-0.59	-0.26	-0.07	-1	-0.21	-0.34	-0.38	0.205	0.001	0.057
tetrapyrrole synthesis	Protochlorophyllide reductase A	-4.84	-1.44	-3.54	-5.34	-6.16	-6.45	-1.45	-3.71	<.001	<.001	<.001
misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	cell wall constituent	0.31	0.25	0.34	0.34	0.83	0.37	-0.15	0.66	0.245	0.579	0.164
RNA.transcription	plastid RNA polymerase alpha subunit	2.11	-0.96	-0.21	2.19	1.05	2.05	-0.32	-0.56	<.001	0.021	0.032
DNA.synthesis/chromatin structure	DNA-dependent ATPase	-3.15	-0.86	-0.49	-3.7	-3.27	-3.91	-1.03	-0.51	<.001	0.244	0.193
DNA.synthesis/chromatin structure.histone	histone H3	-2.13	1.2	1.96	-1.19	-1	-0.02	1.49	2.2	0.003	0.038	0.136
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit	ribosomal protein S3 (chloroplast)	2.42	-0.17	0.56	2.08	1.99	2.73	-0.54	0.12	<.001	<.001	0.005
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.50S subunit	ribosomal protein L16 (chloroplast)	2.36	-0.7	-0.09	2.24	1.52	2.22	-0.65	-0.46	<.001	0.041	0.13
protein.postranslational modification	threonine-protein kinase ht1-like	-0.86	-1	-1.1	-1.18	-1.87	-1.77	-1.17	-1.4	0.002	<.001	0.04
protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	leucine-rich repeat family protein	0.04	0.16	0.59	-0.36	-0.01	0.58	-0.01	0.26	0.783	0.003	0.12
transport.metabolite transporters	SLAH3 C4-dicarboxylate transporter	-0.62	0.14	0.6	-0.13	0.12	-0.46	0.02	1.12	0.021	0.109	0.009



En la primera fase de crecimiento hubo mayor nivel de transcritos para proteínas de antena del PSII en la hoja más joven que en las de más edad, y mayor nivel de transcritos para las proteínas psaA y psaB del PSI en las dos hojas más jóvenes que en la de más edad (Tabla 3.8). Los transcritos para las proteínas psbQ y psbR del PSII aumentaron de la hoja a hasta la b, con resultados más variables para la hoja c, tanto en G132 como en Graphic. El transcrito de la proteína psbP, también del complejo de formación de oxígeno del PSII, siguió la misma pauta que las anteriores en G132, pero disminuyó de la hoja más joven hasta la antepenúltima en Graphic. La expresión génica para las dos subunidades de Rubisco cambió en hojas de más edad respecto a la hoja más joven de modo diferente en los dos genotipos, mostrando poca variación en G132 y disminución en Graphic. El nivel de transcrito para la oxidasa alternativa 1A mitocondrial fue menor en la hoja a que en las hojas b y c de los dos genotipos, con mayores diferencias en el genotipo silvestre que en el mutante. Los transcritos para la síntesis de fructanos (1-SST y 6-SFT) aumentaron en G132 de la hoja a a la b y disminuyeron en la hoja c; en Graphic disminuyeron o cambiaron poco con la edad de la hoja. Los transcritos para fructano exohidrolasa y xiloglucano endotransglicosilasa de pared celular decrecieron, el segundo fuertemente, en hojas de más edad comparadas con la hoja más joven de los dos genotipos. La abundancia de transcritos para glicerofosfodiéster fosfodiesterasa, implicada en degradación de lípidos, nitrato reductasa y protoclorofilida reductasa A disminuyó en hojas de más edad comparadas con la hoja más joven. La expresión génica para la histona H3 (estructura de la cromatina) fue menor en la hoja a que en hojas más viejas. Los niveles de mensaje para la subunidad alfa de la ARN polimerasa fueron menores en la hoja b que las hojas a y c de G132, mientras que disminuyeron al progresar la edad de la hoja en Graphic. La abundancia de transcritos para la proteína ribosómica S3 fue mayor en la hoja c que en las más jóvenes de G132, pero disminuyó en la hoja b comparada con las otras dos de Graphic. El transcrito para la proteína ribosómica L6 fue menos abundante en la hoja b que en las hojas a y c. El nivel de transcrito para la proteína similar a la proteína quinasa HT1 decreció en las hojas de más edad comparadas con la hoja a, mientras que una proteína de la familia rica en leucina (ubiquitina), involucrada en la degradación de proteínas, tuvo la tendencia opuesta.

Tabla 3.9. Nivel de expresión génica en hojas de Graphic y G132 (fase 15-17 Zadoks). La hoja más joven completamente extendida (hoja a) y las dos inferiores (hojas b y c) de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja a era la 5 (G132)- 7 (Graphic) (fase 15-17), estando Graphic más avanzado en el crecimiento. Con un mapa de calor, los números indican el cambio de expresión (razón de logaritmos en base 2) entre genotipos (Graphic como referencia), entre hojas (hoja a como referencia) y en la interacción genotipo x hoja (hoja a de Graphic como referencia). Las categorías funcionales se anotaron con Mercator. P, probabilidad en el análisis de la varianza para los efectos del genotipo, la posición de la hoja y la interacción de ambas; los números en negrita representan efectos significativos (n=3; P<0.05).



Categoría funcional	Nombre	Genotipo x Hoja								P		
		Genotipo	Hoja		G132			Graphic		Gtpo	Hoja	G x H
		G132/ GRA	hoja b	hoja c	hoja a	hoja b	hoja c	hoja b	hoja c			
PS.lightreaction.photosystem IILHC-II	LHCII CAB-1	2.8	-4.19	-3.67	3.47	-1.32	-1.08	-2.04	-1.04	<.001	<.001	<.001
PS.lightreaction.photosystem IILHC-II	LHCII CAB-2	3.68	-2.3	-3.05	3.46	1.24	0.46	-3.68	-3.58	<.001	<.001	0.002
PS.lightreaction.photosystem IILPSII polypeptide	psbR	2.8	0.81	1.58	3.73	4.35	5.25	2.19	2.23	<.001	<.001	0.007
PS.lightreaction.photosystem IILPSII polypeptide	psbQ	-1.83	-0.62	1.25	-1.48	-1.9	-0.8	-0.71	1.41	<.001	<.001	<.001
PS.lightreaction.photosystem IILPSII polypeptide	psbP	1.74	-1.14	-0.78	1.09	0.21	0.69	-1.93	-2.29	<.001	0.008	0.603
PS.lightreaction.photosystem I.LPSI polypeptide	psaA	2.21	-0.78	-1.44	1.96	1.29	0.59	-1.32	-1.77	<.001	<.001	0.004
PS.lightreaction.photosystem I.LPSI polypeptide	psaB	2.6	0.07	-0.22	3.8	3.78	3.26	0.94	1.68	<.001	0.591	0.076
PS.calvin cycle.rubisco large subunit	rbcL	2.23	-0.6	0.09	3.27	2.67	2.98	-0.51	1.78	<.001	0.27	0.307
PS.calvin cycle.rubisco small subunit	rbcS	0.81	-1.38	-1.52	0.31	-0.58	-0.82	-2.38	-2.19	0.004	<.001	0.685
major CHO metabolism	FEH	1.73	0.32	1.28	2.13	2.57	3.18	-0.32	2.02	<.001	0.001	0.552
major CHO metabolism	6-SFT	2.05	-0.55	0.07	3.2	2.62	2.82	-0.35	1.87	<.001	0.296	0.183
major CHO metabolism	1-SST	0.04	0.08	0.06	0.05	0.14	0.09	0.06	0.08	0.723	0.87	0.973

Categoría funcional	Nombre	Genotipo x Hoja									P		
		Genotipo	Hoja		G132			Graphic		Gtpo	Hoja	G x H	
		G132/ GRA	hoja b	hoja c	hoja a	hoja b	hoja c	hoja b	hoja c				
mitochondrial electron transport	Alternative oxidase 1A	-4.7	0.81	1.05	-5.33	-4.7	-3.09	0.81	1	<.001	0.019	0.045	
cell wall.modification	Xyloglucan endotransglycosylase	0.75	-1.29	-1.94	1.45	-0.51	-1.08	-0.28	-1.02	0.044	<.001	0.01	
lipid degradation.lysophospholipases	glycerophosphodiester phosphodiesterase	-0.41	0.3	1.58	1.1	1.55	0.97	-0.1	2.89	0.098	<.001	<.001	
N-metabolism.nitrate metabolism.NR	Nitrate reductase [NADH]	2.61	-0.68	-1.46	2.64	1.97	1.13	-0.74	-1.22	<.001	<.001	<.001	
tetrapyrrole synthesis	Protochlorophyllide reductase A	0.06	-1.34	-1.29	0.37	-1.09	-1.51	-1.19	-0.77	0.688	<.001	0.032	
misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	cell wall constituent	-0.03	0.85	2.5	4.67	5.55	5.25	-0.58	6.79	0.898	<.001	<.001	
RNA.transcription	plastid RNA polymerase alpha subunit	1.72	-1.13	-1.25	1.57	0.44	0.48	-1.12	-1.88	<.001	<.001	0.155	
DNA.synthesis/chromatin structure	DNA-dependent ATPase	-2.43	0.62	4.04	-0.09	0.6	1.71	0.51	4.83	<.001	<.001	<.001	
DNA.synthesis/chromatin structure.histone	histone H3	-2.3	0.71	5.13	-0.4	0.4	3.18	0.64	5.71	<.001	<.001	<.001	
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit	ribosomal protein S3 (chloroplast)	-1.9	-1.26	-0.36	-1.97	-2.22	-3.16	-1.71	-0.2	<.001	0.009	0.008	
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.50S subunit	ribosomal protein L16 (chloroplast)	-4.06	-0.68	-2.21	-4.19	-5.03	-5.38	-0.67	-2.29	<.001	<.001	<.001	
protein.postranslational modification	threonine-protein kinase ht1-like	0.33	-1.14	-1.22	0.57	-0.9	-0.77	-0.76	-1.06	0.184	<.001	0.249	
protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	leucine-rich repeat family protein	-3.03	-0.67	-1.73	-3.19	-4.02	-4.02	-0.65	-1.88	<.001	<.001	<.001	
transport.metabolite transporters	SLAH3 C4-dicarboxylate transporter	-1.36	0.02	2.66	-0.95	-0.5	1.22	-0.26	2.86	<.001	<.001	<.001	



En la fase 15-17 de crecimiento (Tabla 3.9), excepto por el nivel menor de transcrito para *psbQ*, las hojas de G132 tuvieron en comparación con Graphic niveles incrementados de transcritos para todos los polipéptidos de los PSI y II analizados, así como para las dos subunidades de Rubisco, fructano exohidrolasa, 6-SFT, nitrato reductasa (la tendencia no alcanzó significación), subunidad alfa de la ARN polimerasa de cloroplasto, glicerofosfodiester fosfodiesterasa y un constituyente de la pared celular implicado en la transferencia de lípidos (en estos dos últimos excepto para la hoja c, en la que fue al contrario). En contraste, fue menor en G132 que Graphic la abundancia de mensaje para la oxidasa alternativa 1A, las proteínas ribosómicas S3 y L3 de cloroplasto, una proteína de la familia rica en leucina (ubiquitina) y el transportador SLAH3, implicado en la respuesta al CO₂ de la apertura de los estomas. Puede por tanto observarse una constancia en las dos etapas del crecimiento de la planta de la estimulación en G132 respecto a Graphic de la expresión génica para varios elementos implicados en la fotosíntesis y para la subunidad alfa de la ARN polimerasa de cloroplasto, así como una constancia de la represión génica para *psbQ*. En cambio, en la segunda etapa de crecimiento desaparecieron los descensos en G132 comparado con Graphic de transcritos para la síntesis de fructanos, xiloglucano endotransglicosilasa y tetrapirroles, así como los aumentos de transcritos para las proteínas ribosómicas S3 y L6, que cambiaron a disminuciones.

En la segunda fase de crecimiento de la planta (fase 15-17, Tabla 3.9), la comparación entre hojas de diferente edad mostró disminuciones de la hoja a hasta la hoja b, con resultados más variables para la hoja c, en los transcritos para el complejo de captación de la luz del PSII, *psbQ*, *psbP*, *psaA*, *rbcS*, xiloglucano endotransglicosilasa, nitrato reductasa, protoclorofilida reductasa A, subunidad alfa de la ARN polimerasa plastidial, proteína quinasa similar a HT1 y la proteína de la familia rica en leucina (ubiquitina). La abundancia de transcritos para las proteínas ribosómicas de cloroplasto S3 y L6 generalmente decreció también al avanzar la edad de las hojas. En contraste, la expresión génica para *psaB* aumentó con la edad de la hoja en Graphic, pero mostró pocas diferencias entre hojas en G132. Además, los niveles de transcritos para *psbR*, FEH, oxidasa alternativa 1A, ATPasa dependiente de ADN, histona H3, SLAH3 y un constituyente de la pared celular implicado en la transferencia de lípidos (excepto por la hoja b de

Graphic), fueron menores en la hoja más joven que en las de más edad. La diferencia entre hojas en abundancia de transcrito para glicerofosfodiester fosfodiesterasa no siguió una pauta regular con la edad de la hoja. Consiguientemente, en ambas fases del crecimiento de la planta la hoja más joven tuvo comparada con las de más edad mayor nivel de transcritos para LHCII, psaA, psaB, rbcS, xiloglucano endotransglicosilasa, nitrato reductasa, protoclorofilida reductasa A, con alguna variación subunidad alfa de la ARN polimerasa, S3, L6 y HT1. En contraste, el nivel de transcritos para psbQ, psbP, FEH, oxidasa alternativa 1A e histona H3 mostró la pauta opuesta en ambas fases de crecimiento. La abundancia de transcritos para síntesis de fructanos no cambió significativamente entre hojas en la segunda fase, en contraste con las diferencias entre las mismas encontradas en la primera fase.

3.1.10. Crecimiento y producción de grano

En el segundo estadio de crecimiento el peso seco de la planta en G132 fue aproximadamente un 25 % del de Graphic (Tabla 3.10). Posteriormente el crecimiento hasta la madurez de G132 tuvo mayor duración que el de Graphic, alcanzando el primero esta etapa 16 días después que el segundo, de forma que la biomasa final y los componentes de la producción de grano no fueron significativamente diferentes en los dos genotipos.

Tabla 3.10. Peso seco y componentes de la producción de grano de Graphic y G132. Mediciones en la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja más joven completamente extendida era la 5-7 (fase 15-17 Zadoks) y en la madurez. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos (n=5; P<0.05).

		G132	Graphic	mds
Fase 15-17	P. seco total g/planta	1.0	4.2	0.46
Madurez	Num. espigas/planta	10.8	13.2	2.59
	Num. granos/espiga	18.5	17.0	2.51
	Superficie de grano (mm ²)	25.9	26.9	n/s
	Ancho de grano (mm)	3.9	4	n/s
	Largo de grano (mm)	8.8	9	n/s
	P. seco por grano (mg)	45.2	44.6	3.22
	P. seco grano (g/planta)	8.9	9.9	1.66
	P. seco glum. y_raq. (g/planta)	2.1	2.5	0.47
	P. seco espiga (g/planta)	11.0	12.5	0.90
	P. seco paja (g/planta)	12.1	13.4	2.30
	P. seco total (g/planta)	23.1	25.9	4.22
	Índice de cosecha	0.39	0.38	0.024
	Días hasta la madurez	224.0	208.0	

3.2. Respuesta al CO₂ elevado de la cebada Graphic y su mutante G132

3.2.1. Fluorescencia de la clorofila

En el primer experimento en cámaras de ambiente controlado, en las medidas de la fluorescencia de la clorofila realizadas se analizaron la primera hoja en la fase 11 de Zadoks y la tercera (G132) y cuarta (Graphic) en la fase 13-14. En la primera hoja se encontraron valores menores en G132 que Graphic de la eficiencia cuántica operativa (Fq'/Fm') (Tabla 3.11). Al mismo tiempo, G132 mostró un incremento de este parámetro al crecer en concentraciones elevadas de CO₂. En Graphic no hubo efectos de la concentración de CO₂ en la primera hoja. En las hojas tercera y cuarta se encontraron valores mayores de fluorescencia mínima (F_0) y menores de los demás parámetros en G132 que en Graphic, independientemente de la concentración de CO₂ de crecimiento. G132 mostró también cambios en la eficiencia operativa (Fq'/Fm'), que incrementó de forma significativa en CO₂ elevado. En Graphic no hubo efectos de la concentración de CO₂ en los parámetros de extinción de la fluorescencia. Como en el primer

experimento, en el segundo la fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad (F_o) fue más alta en G132, reduciéndose significativamente en este genotipo, pero no en Graphic, al crecer en CO_2 elevado (Tabla 3.11). En este segundo experimento la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) fue también mayor en Graphic que en G132, en el que aumentó con el CO_2 de crecimiento. La fracción de centros abiertos del PSII (q_L ; con la Q_a oxidada) fue menor en G132 que en Graphic para plantas crecidas en CO_2 ambiental de $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, pero la diferencia se invirtió en CO_2 elevado. En G132, pero no en Graphic, el CO_2 elevado aumentó q_L . La eficiencia cuántica máxima en la luz (Φ_{qL}) mostro diferencias entre genotipos, siendo mayor en Graphic; el CO_2 elevado no modificó significativamente este parámetro en ninguno de los dos genotipos. En consecuencia, la eficiencia cuántica operativa del PSII (F_q'/F_m') fue mayor en Graphic que en G132, siendo en este último mayor en CO_2 elevado que ambiente.

Tabla 3.11. Fluorescencia de la clorofila en CO_2 ambiente y elevado. Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad (F_o), eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (PSII, F_v/F_m), fracción de centros abiertos del PSII (q_L), eficiencia cuántica máxima en la luz (Φ_{qL}), eficiencia cuántica operativa del PSII (F_q'/F_m'), tasa de transporte electrónico (ETR), rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica (Φ_{NPQ}) y rendimiento cuántico del decaimiento basal no-radiativo (Φ_{NO}) de la cebada Graphic y su mutante G132 cultivados en CO_2 ambiente ($390 \mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado ($1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$) en cámaras de crecimiento. Las medidas se realizaron con la concentración de CO_2 de crecimiento, oscuridad o iluminancia de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Parámetros de la fluorescencia de la clorofila en la hoja 1 cuando la 2 estaba desplegada y en la hoja 3 (G132)-4 (Graphic) recientemente extendida de la cebada Graphic y el mutante G132, en el primero y segundo experimentos realizados. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan diferencias significativas ($n=5$; $P < 0.05$).

		CO_2 Ambiente		CO_2 Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO_2	G x CO_2
Exp. 1								
Hoja 1	F_q'/F_m'	0.26	0.54	0.40	0.55	0.018	0.018	0.026
Hoja 3-4								
	F_o	0.93	0.23	0.79	0.27	0.147	0.120	0.207
	F_v/F_m	0.51	0.79	0.58	0.77	0.057	0.047	0.081
	F_q'/F_m'	0.05	0.30	0.12	0.26	0.045	0.037	0.064
Exp. 2								
Hoja 3-4								
	F_o	1.14	0.29	0.90	0.26	0.087	0.087	0.123
	F_v/F_m	0.40	0.78	0.51	0.78	0.041	0.041	0.058
	q_L	0.52	0.62	0.70	0.59	0.071	0.071	0.101
	Φ_{qL}	0.24	0.91	0.36	0.99	0.103	0.103	0.155
	F_q'/F_m'	0.13	0.56	0.24	0.56	0.026	0.026	0.037
	ETR	54.1	233	98.3	228	10.78	10.78	15.24
	Φ_{NPQ}	0.74	0.25	0.62	0.26	0.031	0.031	0.043
	Φ_{NO}	0.13	0.19	0.14	0.17	0.014	0.014	0.020

La tasa de transporte electrónico (ETR) fue menor en G132 que Graphic, aumentando con el CO₂ de crecimiento solamente en el primero. El rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica (Φ_{NPQ}) fue más alto en G132, en el que disminuyó con el CO₂ elevado de crecimiento, y el rendimiento cuántico de decaimiento basal no-radiativo (Φ_{NO}), o de otras pérdidas basales no radiativas en el PSII, fue mayor en Graphic y no cambió significativamente con la concentración de CO₂.

3.2.2. Intercambio gaseoso

En el primer experimento, el análisis de gases en el infrarrojo mostró que la asimilación neta de CO₂ (A) fue significativamente mayor en Graphic que en G132 independientemente de la concentración de CO₂ utilizada en las medidas (Tabla 3.12). Además, las plantas de Graphic crecidas en CO₂ ambiente tuvieron una velocidad de asimilación fotosintética significativamente mayor que las crecidas en CO₂ elevado, para las medidas realizadas con CO₂ de referencia tanto de 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ como de 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; no así las plantas de G132, que no mostraron cambios significativos con el CO₂ de crecimiento. De las medidas de la fotosíntesis a las dos concentraciones de CO₂ se deduce que el CO₂ elevado tuvo como efecto directo en A un aumento del 46 % en Graphic y del 99 % en G132, mientras que, como efecto de aclimatación, redujo la fotosíntesis un 12 % en Graphic y solo un 4 % en G132. El efecto neto del aumento del CO₂ en la fotosíntesis fue un incremento del 28 % en Graphic y del 90 % en G132 (Tabla 3.13). La concentración intercelular de CO₂ del mesófilo (C_i), la conductancia estomática (g_s) y la velocidad de transpiración (E) fueron significativamente mayores en G132 que en Graphic, independientemente del CO₂ de crecimiento (Tabla 3.12). Como cabría esperar, g_s y E fueron menores en plantas crecidas y medidas en CO₂ elevado que ambiente. Además, en medidas con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, g_s y E fueron también menores en plantas crecidas en CO₂ elevado que ambiente, pero esta diferencia desapareció en medidas con 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂.

Tabla 3.12. Intercambio gaseoso en CO₂ ambiente y elevado. Velocidad máxima de carboxilación catalizada por Rubisco ($V_{c_{max25}}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), velocidad máxima de transporte de electrones (J_{max25} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y respiración en la luz (R_{d25} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) normalizadas a 25 °C, tasa de asimilación fotosintética (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentración intercelular de CO₂ en el mesófilo (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$), conductancia estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y velocidad de transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de la hoja más joven completamente extendida del genotipo silvestre Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente (390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en cámaras de crecimiento. Las medidas de A , C_i , g_s y E se realizaron con concentraciones de CO₂ en el aire de 390 y 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, iluminancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 °C y 0.95±0.12 kPa de déficit de presión de vapor. Resultados del primero y segundo experimentos realizados. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos ($n=5$; $P<0.05$).

		CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Exp. 1	$V_{c_{max25}}$	30.6	82.6	32.1	75.1	6.91	6.91	9.78
	J_{max25}	-	209.8	-	196.2		27.43	
	R_{d25}	2.32	8.22	3.93	6.48	2.94	2.94	4.16
	A_{390}	6.36	20.8	5.48	14.2	1.79	1.46	2.53
	C_{i390}	353	277	340	223	13.2	10.7	18.6
	g_{s390}	610	437	296	161	67.7	55.3	95.8
	E_{390}	5.09	3.92	2.89	1.79	0.49	0.40	0.69
	A_{1200}	12.7	30.4	12.1	26.7	2.31	1.89	3.27
	C_{i1200}	1281	1160	1292	1129	31.7	25.9	44.8
	g_{s1200}	332	297	396	203	86.4	70.5	122
	E_{1200}	3.1	2.79	3.62	2.08	0.58	0.48	0.82
	Exp. 2	$V_{c_{max25}}$	29.9	105	35.2	97.0	6.24	6.24
J_{max25}		-	213	-	192	-	15.6	-
R_{d25}		3.73	6.31	4.09	6.06	0.83	0.83	1.18
A_{390}		4.9	15.2	6.17	14.3	1.44	1.44	2.03
C_{i390}		362	233	326	220	14.2	14.2	20.0
g_{s390}		235	157	158	132	31.9	31.9	45.1
E_{390}		2.10	1.60	1.70	1.60	0.26	0.26	0.37
A_{1200}		11.4	29.5	14.2	28.0	1.66	1.66	2.34
C_{i1200}		1355	1060	1300	1096	59.7	59.7	84.4
g_{s1200}		211	129	192	139	33.1	33.1	46.8
E_{1200}		1.90	1.30	2.10	1.60	0.29	0.29	0.40

Tabla 3.13. Efectos directo, de aclimatación y neto del CO₂ elevado en la velocidad de fotosíntesis de la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y el mutante G132 (hoja 3), cultivados en CO₂ ambiente (390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en cámaras de crecimiento.

	Exp. 1		Exp. 2	
	G132	Graphic	G132	Graphic
Efecto directo	1.99	1.46	2.33	1.94
Efecto de aclimatacion	0.96	0.88	1.25	0.95
Efecto neto	1.90	1.28	2.90	1.84

Con concentraciones de CO₂ por encima de un umbral, las curvas de respuesta de la asimilación fotosintética a la concentración de CO₂ intercelular (A vs. C_i) mostraron para Graphic la transición normal de fotosíntesis limitada por la actividad Rubisco a limitada por la regeneración de RuBP (Fig. 3.13). El punto

de co-limitación fue mayor en las plantas crecidas en CO₂ ambiente (460 μmol mol⁻¹ C_i y 27.8 μmol m⁻² s⁻¹ A) que en las crecidas en CO₂ elevado (360 μmol mol⁻¹ C_i y 21.8 μmol m⁻² s⁻¹ A). En G132, en contraste, la fotosíntesis estuvo limitada únicamente por la actividad Rubisco hasta concentraciones de CO₂ superiores a 1200 μmol mol⁻¹. Como muestran las curvas A vs. C_i, la capacidad máxima de carboxilación catalizada por la Rubisco (normalizada a 25 °C; V_{cmax25}) fue significativamente mayor en Graphic que en G132 (Tabla 3.12). No fue posible con estas curvas establecer comparaciones entre genotipos de la tasa máxima de transporte fotosintético de electrones asociado a la reducción de NADP para la regeneración de RuBP (normalizada a 25 °C; J_{max25}), puesto que ésta no limitó la fotosíntesis de G132. El CO₂ elevado tendió a disminuir V_{cmax25} y J_{max25} en Graphic, aunque el efecto no fue significativo. La tasa de respiración en la luz (normalizada a 25 °C; R_{d25}) fue menor en G132 que en Graphic con ambas concentraciones de CO₂ de crecimiento.

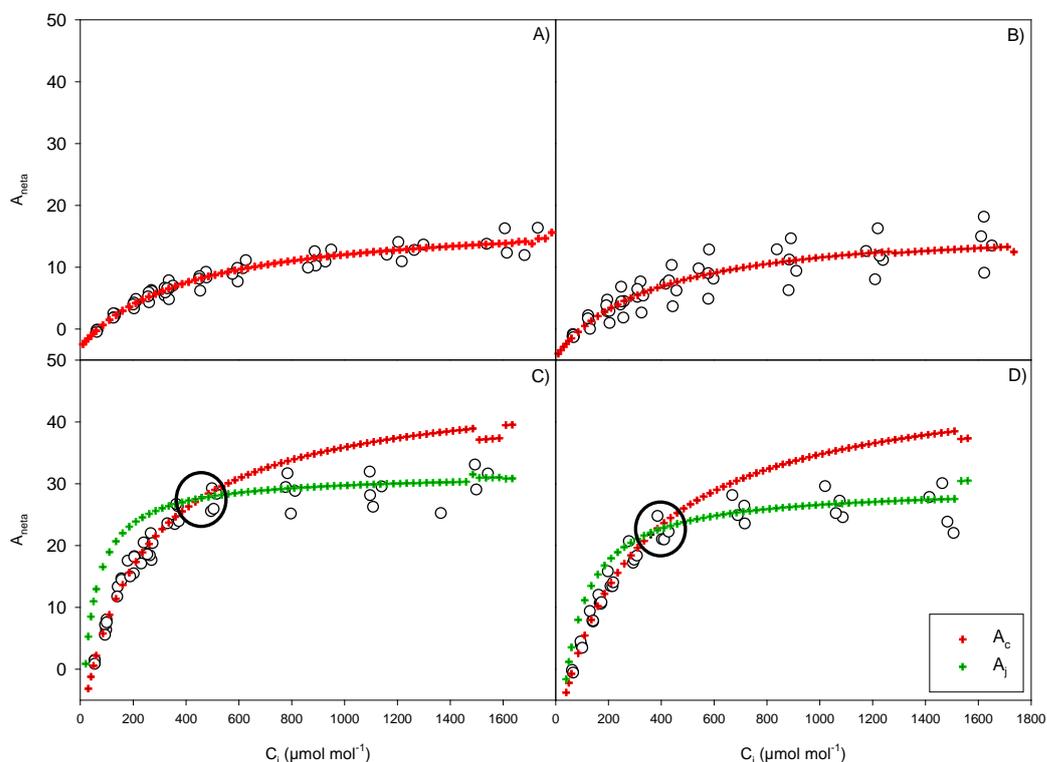


Figura 3.13. Curvas de respuesta al CO₂ de la fotosíntesis en CO₂ ambiente y elevado en el primer experimento. Velocidad de asimilación fotosintética (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a la concentración intercelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en la hoja más joven completamente extendida de la cebada (A, B) G132 (hoja 3) y (C, D) Graphic (hoja 4) cultivadas en (A, C) 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y (B, D) 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ en el primer experimento en cámaras de crecimiento. Los círculos abiertos representan la tasa fotosintética neta de asimilación de carbono y las líneas rojas y verdes la modelización de la limitación por Rubisco (A_c) y la limitación por regeneración de RuBP (A_j), respectivamente. Los círculos abiertos grandes representan el punto de co-limitación. Las curvas se ajustaron con la utilidad LeafWeb (Gu *et al.*, 2010).

En el segundo experimento, la asimilación neta de CO₂ (A) medida a 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ fue, como en el primero, significativamente mayor en Graphic que en G132 y tendió a aumentar en G132 y a disminuir en Graphic con el CO₂ elevado, aunque el efecto no alcanzó significación (Tabla 3.12). Para las medidas realizadas con CO₂ de referencia de 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, la asimilación de CO₂ fue igualmente menor en G132 que en Graphic y aumentó con el CO₂ de crecimiento en el primero y no así en Graphic. La concentración intercelular de CO₂ del mesófilo (C_i) y la conductancia estomática (g_s) fueron significativamente mayores en G132 que en Graphic para medidas con las dos concentraciones de CO₂ de referencia y disminuyeron con el crecimiento en CO₂ elevado de modo significativo en medidas con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ (Tabla 3.12). La velocidad

de transpiración (E) fue significativamente mayor en G132 para ambas concentraciones de CO_2 en las medidas y no cambió significativamente con el CO_2 de crecimiento. El efecto directo del CO_2 elevado en la fotosíntesis fue positivo en los dos genotipos y mayor en G132 que en Graphic (Tabla 3.13). El efecto de aclimatación fue positivo en G132, pero ligeramente negativo en Graphic. En consecuencia, el efecto neto del CO_2 elevado fue mucho más positivo en el mutante que en el genotipo silvestre.

El análisis de gases en el infrarrojo mostró que la capacidad máxima de carboxilación catalizada por la Rubisco ($V_{\text{cmax}25}$) fue, como en el primer experimento, significativamente mayor en Graphic que en G132 y también mostró una disminución con el CO_2 elevado en Graphic y un aumento en G132 (Tabla 3.12); la interacción genotipo x CO_2 fue significativa, aunque el efecto del CO_2 elevado no alcanzó significación en ninguno de los dos genotipos. La tasa máxima de transporte fotosintético de electrones asociado a la reducción de NADP para la regeneración de RuBP ($J_{\text{max}25}$) tampoco se pudo determinar en este experimento para G132 debido a que $V_{\text{cmax}25}$ limitó la fotosíntesis con todas las concentraciones de CO_2 de la curva A vs. C_i (Fig. 3.14). En Graphic $J_{\text{max}25}$ disminuyó significativamente con el CO_2 elevado. La tasa de respiración en la luz (R_d), confirmando lo observado en el primer experimento, fue menor en G132 que en Graphic en ambas concentraciones de CO_2 , que no tuvieron efecto en la respiración.

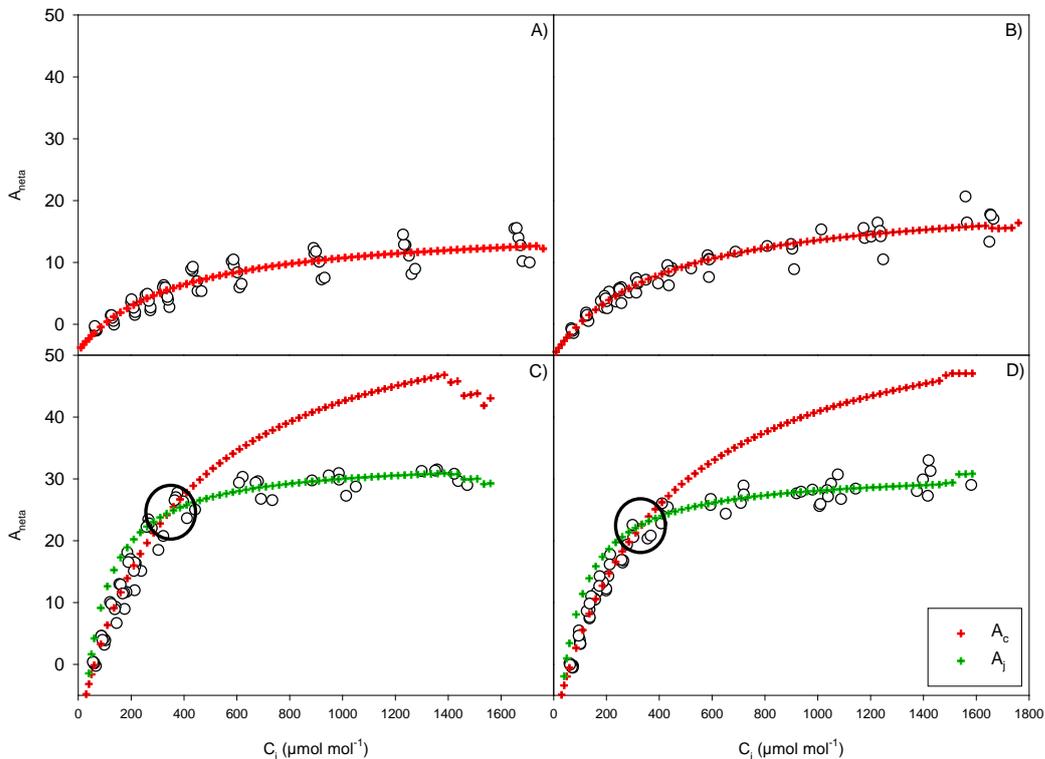


Figura 3.14. Curvas de respuesta de la fotosíntesis en CO₂ ambiente y elevado en el segundo experimento. Velocidad de asimilación fotosintética (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a la concentración intercelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en la hoja más joven completamente extendida de la cebada (A, B) G132 (hoja 3) y (C, D) Graphic (hoja 4) cultivadas en (A, C) 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y (B, D) 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ en el segundo experimento en cámaras de crecimiento. Los círculos abiertos representan la tasa fotosintética neta de asimilación de carbono y las líneas rojas y verdes la modelización de la limitación por Rubisco (A_c) y la limitación por regeneración de RuBP (A_i) respectivamente. Los círculos abiertos grandes representan el punto de co-limitación. Las curvas se ajustaron con la utilidad LeafWeb (Gu *et al.*, 2010).

3.2.3. Densidad y conductancia de los estomas

La densidad de estomas en la sección central de la última hoja completamente extendida (hoja 3 en G132 y 4 en Graphic) fue mayor en G132 que en Graphic (Figura 3.15), como ya se observó en el experimento de invernadero, mientras que la frecuencia de estomas en la epidermis (índice estomático) no mostró diferencias entre genotipos. La concentración de CO₂ de crecimiento no tuvo efectos en la densidad y la frecuencia de estomas, ni en la conductancia normalizada a la densidad de estomas.

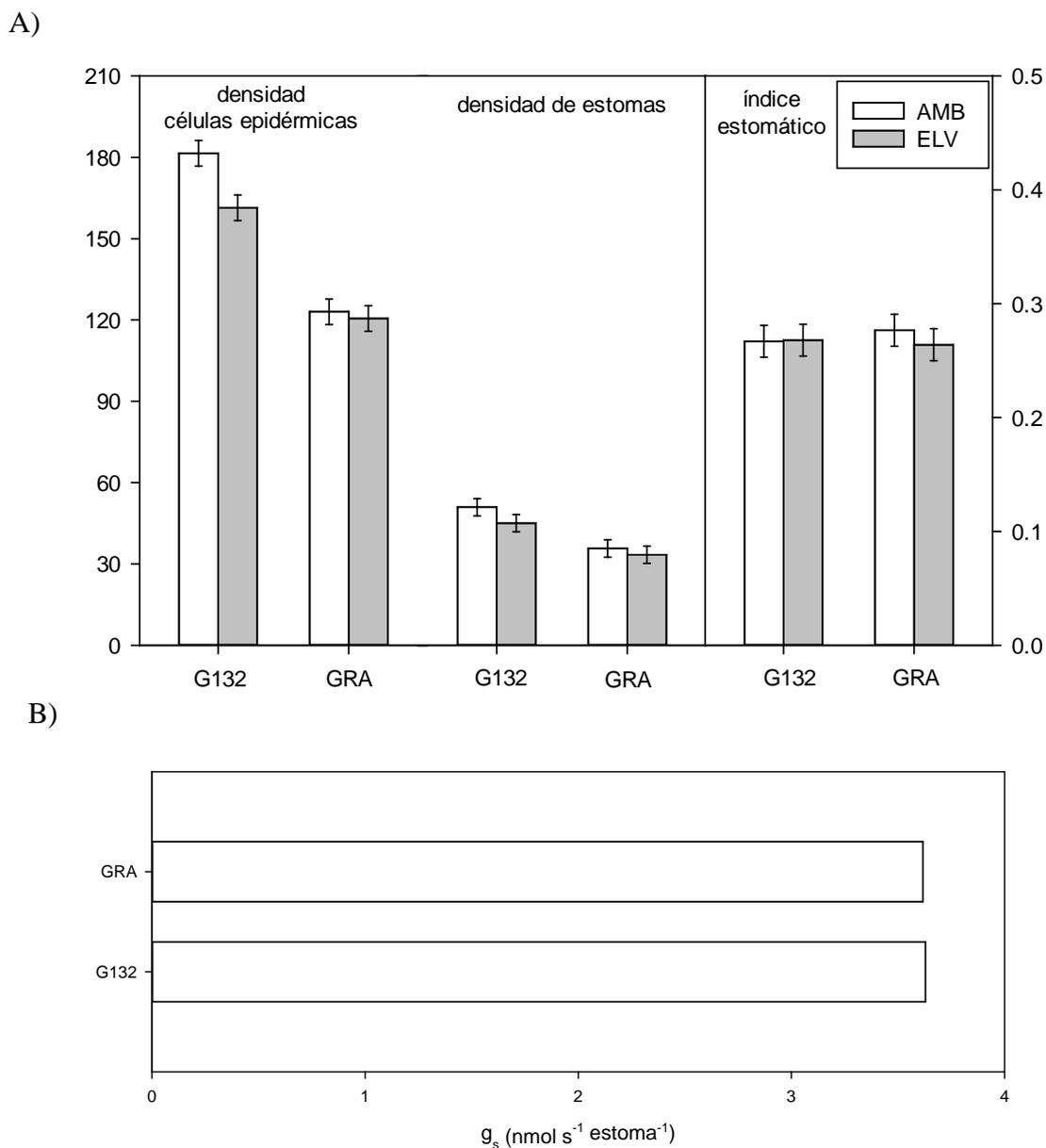


Figura 3.15. Cuantificación de estomas y su conductancia en CO₂ ambiente y elevado. (A) densidad de células epidérmicas (célula epidérmica·mm⁻²), densidad (estoma·mm⁻²) e índice (estoma·célula epidérmica⁻¹) de estomas (haz) en CO₂ ambiente (barras blancas) o elevado (barras oscuras) y (B) conductancia estomática (haz y envés) normalizada a la densidad de estomas en el haz de la sección central de la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y G132 (hoja 3). Las plantas se cultivaron con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (columnas blancas) y 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ (columnas negras) en el segundo experimento en cámaras de crecimiento. La conductancia en el estado estable se determinó, en plantas crecidas en CO₂ ambiente, después de unos 20 min en una atmósfera con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, iluminancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 °C y déficit de presión de vapor de 1.2 kPa. Las barras verticales representan la mds para la interacción genotipo x CO₂ (n=5; P< 0.05).

En las medidas de las curvas fotosíntesis-CO₂ en plantas crecidas en CO₂ ambiente, g_s cambió poco en Graphic y disminuyó en G132, más que aumentar,

con C_a decreciente desde 390 a 60 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ en unos 10 min (Fig. 3.16). En valores altos de CO_2 (390-1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) la conductancia disminuyó menos en G132 que en Graphic al crecer C_a en aproximadamente 15 min. Las concentraciones de CO_2 en las medidas cambiaron en orden distinto en plantas crecidas en CO_2 ambiente y elevado, por lo cual las respuestas de la conductancia de los estomas no fueron comparables y las correspondientes a CO_2 elevado no se presentan aquí.

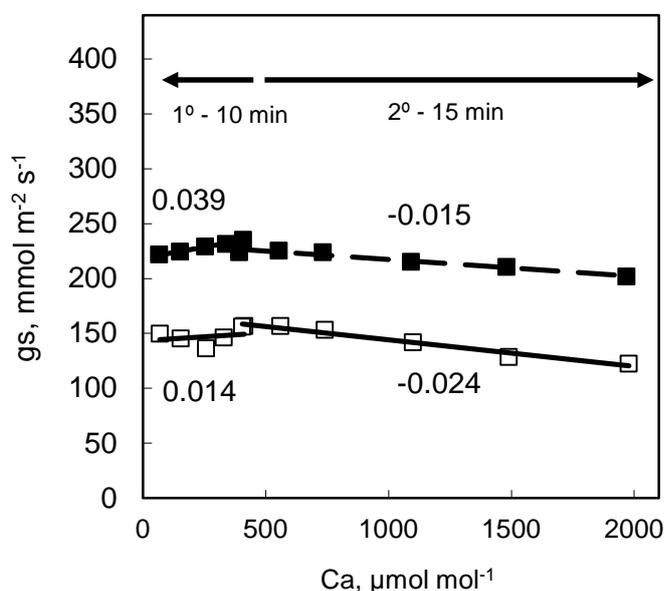


Figura 3.16. Respuestas a corto plazo de la conductancia a la concentración de CO_2 de los estomas a la concentración atmosférica de CO_2 (C_a) en la cebada Graphic (cuadrados blancos) y su mutante G132 (cuadrados negros) cultivados con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 en el segundo experimento en cámara de crecimiento. Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de 3 (G132)- 4 (Graphic) hojas. Las flechas horizontales muestran el orden en que la concentración de CO_2 se disminuyó y después se aumentó. Los números son las pendientes de respuesta de g_s a la concentración descendente o ascendente de CO_2 . Cada punto es la media de 5 repeticiones.

En el segundo experimento en cámaras de crecimiento se midió, como en el experimento en invernadero, el intercambio gaseoso durante 40-50 min después de aumentar en un paso la concentración de CO_2 desde 390 a 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ con luz roja de alta intensidad. La fotosíntesis en Graphic fue notablemente mayor que en G132 y aumentó inicialmente hasta alcanzar un valor estable, mientras que en G132 no hubo aumento de la fotosíntesis (Fig. 3.17A). Paralelamente, C_i disminuyó en Graphic, pero no en G132, que mostró valores más altos de este parámetro (Fig. 3.17B). g_s como fracción de su valor inicial fue

mayor en G132 que en Graphic (Fig. 3.18A). G132 tuvo mayor g_s y menor disminución de la misma con el tiempo que Graphic (Fig. 3.18B). De forma similar a lo observado en el experimento de invernadero, las regresiones de g_s frente al tiempo ($g_s=A+B \cdot \exp^{(k \cdot \text{tiempo})}+C \cdot \text{tiempo}$) fueron significativamente diferentes para los dos genotipos (Tabla 3.14), con menor velocidad de cierre de los estomas en G132 que en Graphic (Fig. 3.18C). El mutante mostró, por tanto, menor sensibilidad de g_s al aumento de CO_2 que el genotipo silvestre.

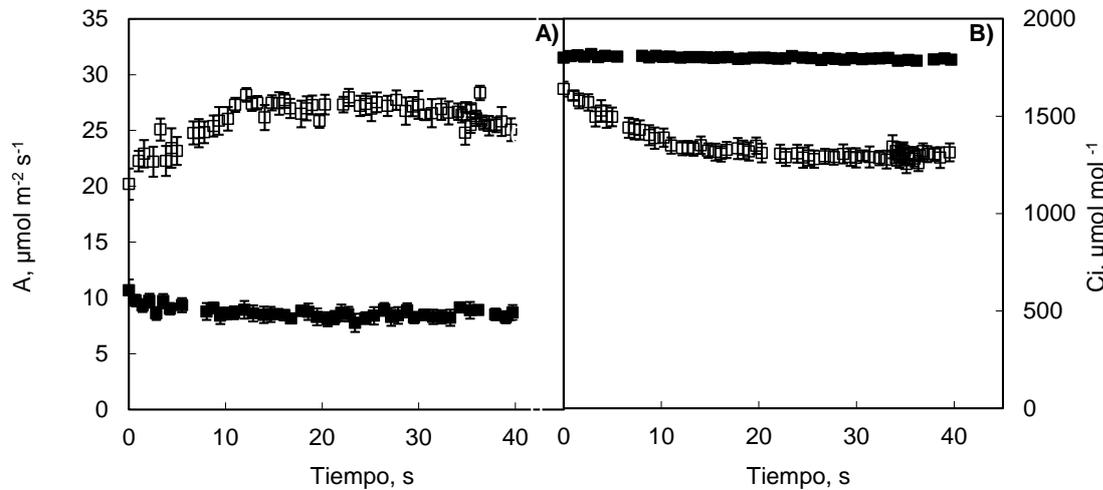


Figura 3.17. Cambio con el tiempo en A y C_i tras un aumento de CO_2 . Cambio con el tiempo en (A) la fotosíntesis y (B) la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) tras un aumento de la concentración de CO_2 de la atmósfera de 390 a 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ con iluminancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz roja en Graphic (cuadrados blancos) y G132 (cuadrados negros) cultivados con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 en el segundo experimento en cámara de crecimiento. Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de desarrollo de 3 (G132)-4 (Graphic) hojas. Las barras verticales representan el doble de los errores estándar de las medias ($n=5$).

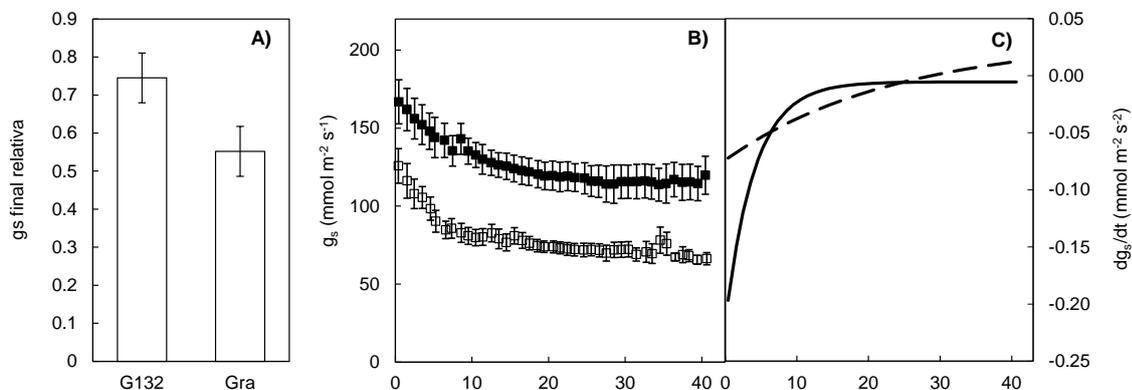


Figura 3.18. Conductancia de los estomas tras un aumento de CO_2 . Conductancia (g_s) tras un aumento de la concentración de CO_2 de la atmósfera de 390 a 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ con iluminancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz roja (A) g_s después de 40-50 min respecto a la g_s inicial. (B) Cambio con el tiempo en g_s de Graphic (cuadrados blancos) y G132 (cuadrados negros). Se ajustaron regresiones de la conductancia frente al tiempo de la forma (exponencial más lineal) $g_s = A + B \cdot \exp^{(k \cdot \text{tiempo})} + C \cdot \text{tiempo}$. La Tabla 3.14 muestra los parámetros de las regresiones y la significación estadística (análisis de paralelismo) de las diferencias entre genotipos. (C) Velocidades de cambio de g_s con el tiempo para Graphic (líneas continuas) y G132 (líneas quebradas), estimadas como derivadas respecto al tiempo de las curvas en el panel (B). Medidas en la hoja más joven completamente extendida en la fase de desarrollo de 3 (G132)-4 (Graphic) hojas de plantas cultivadas con 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 en el segundo experimento en cámara de crecimiento. Las barras verticales representan (A) la mínima diferencia significativa y (B) el doble de los errores estándar de las medias ($n=5$).

Tabla 3.14. Regresiones g_s -tiempo y probabilidades en CO_2 ambiente. Parámetros de regresión y probabilidades en el análisis de paralelismo de la curvas $g_s=A+B \cdot \exp(k \cdot t)+C \cdot t$ de respuesta g_s -tiempo (t) mostradas en la Figura 3.18. Se ajustó una secuencia de modelos de regresión a los valores para Graphic y el mutante G132 cultivados en cámara de crecimiento. El primer modelo a ajustar fue una curva única con parámetros comunes para ambos genotipos. A continuación, el modelo se extendió para incluir una constante (A) diferente para cada genotipo, dando dos curvas paralelas. El siguiente modelo tuvo todos los parámetros lineales diferentes para cada genotipo. Finalmente, se ajustaron curvas con todos los parámetros diferentes en los dos genotipos. Se seleccionó el modelo de regresión significativo con mayor complejidad (en negrita).

Experimento	Función	Genotipo	Parámetros de la regresión				P en el análisis de varianza de la regression			
			A	B	C	k	param. comunes	constantes separadas	param. lineales separados	todos los param. separados
1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Fig. 3.18A)	$g_s=A+B \cdot \exp^{(k \cdot t)}+C \cdot t$	Graphic	80.76	51.01	-0.328	-0.2477	<.001	<.001	0.831	0.036
		G132	16.00	150.00	1.880	-0.0421				

3.2.4. Contenido en clorofilas

En el primer cultivo en cámaras de crecimiento, el contenido en clorofilas totales y clorofila a, y la razón clorofila a/clorofila b, fueron significativamente menores en G132 que en Graphic (Fig. 3.19A); el contenido de clorofila b tendió también a ser menor en G132. El crecimiento en CO₂ elevado no tuvo efecto en los contenidos de clorofilas ni la razón entre ellas.

En el segundo cultivo, el contenido total en clorofilas, en clorofila a y en clorofila b fue también significativamente menor en el mutante G132 (Fig. 3.19B). El CO₂ elevado aumentó la clorofila a+b y la clorofila a en G132, pero no en Graphic, en el que el CO₂ disminuyó significativamente el contenido en clorofila b. En cuanto a la razón clorofila a/clorofila b de la cebada Graphic y su mutante G132, encontramos que fue menor en el mutante, aunque la significación de la diferencia fue escasa en CO₂ ambiente. El CO₂ elevado aumentó esta razón significativamente en Graphic, pero el aumento no fue significativo en G132.

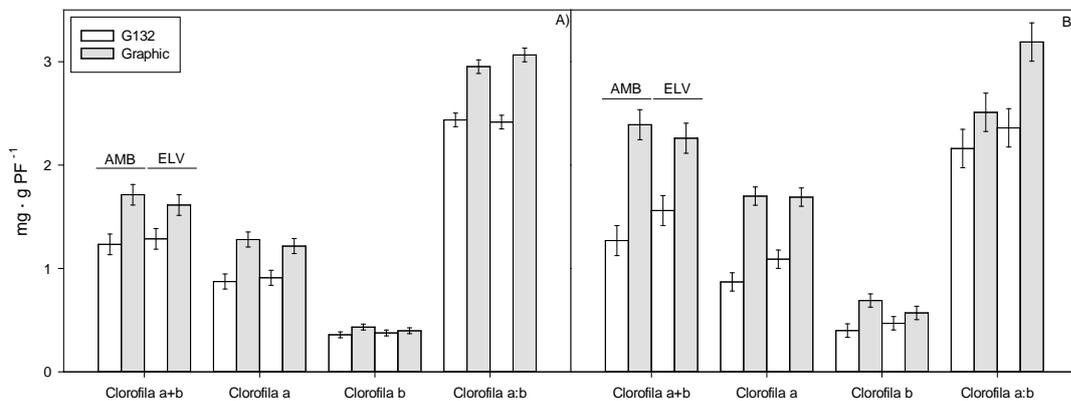


Figura 3.19. Contenido en clorofilas en CO₂ ambiente y elevado. Clorofilas a y b, clorofila total y razón clorofila a/clorofila b de la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente (390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en (A) el primer y (B) el segundo experimento en cámaras de crecimiento. Las barras verticales representan la mds para la interacción genotipo x CO₂ (n=5; P<0.05)

3.2.5. Contenido de carbohidratos

En el primer cultivo, los contenidos de glucosa fueron muy bajos y sus diferencias escasamente significativas (Tabla 3.15). Los contenidos de fructosa, sacarosa, fructanos y almidón fueron menores en G132 que en Graphic. La razón fructosa/glucosa menor que dos en los fructanos indicó ausencia de estos carbohidratos en G132. El CO₂ elevado aumentó los contenidos de carbohidratos en los dos genotipos, aunque este efecto no alcanzó significación para la fructosa, fructanos y almidón en G132, debido a la influencia de la gran diferencia entre genotipos en el análisis de la varianza. En Graphic los contenidos de los diferentes carbohidratos fueron de 1.6 a 7 veces mayores en CO₂ elevado que en CO₂ ambiente. El CO₂ elevado aumentó la polimerización de los fructanos en Graphic, como mostró el incremento de la razón fructosa/glucosa de estos carbohidratos. Los efectos del genotipo y el CO₂ de crecimiento en el contenido de carbohidratos en el segundo cultivo fueron similares a los descritos para el primero. Así, la cantidad de glucosa libre fue indetectable en las muestras con el análisis fluorimétrico utilizado (menos de 0.3 $\mu\text{mol g PF}^{-1}$), mientras que el contenido en fructosa libre, sacarosa, fructanos y almidón fue menor en G132 que en Graphic (Tabla 3.15). En G132, en contraste con Graphic, la razón fructosa/glucosa de los fructanos fue inferior al mínimo de dos típico de estos carbohidratos, indicando de nuevo ausencia de los mismos. El CO₂ elevado aumentó el contenido de todos los carbohidratos analizados, aunque, por la heterogeneidad de valores de los dos genotipos, en G132 el efecto solo fue significativo para la sacarosa. La polimerización de los fructanos (razón fructosa/glucosa) tendió a aumentar con el CO₂ elevado en Graphic.

Tabla 3.15. Contenido de carbohidratos CO₂ ambiente y elevado. Contenido ($\mu\text{mol g PF}^{-1}$) en glucosa (Glc), fructosa (Fru), sacarosa (Sac), glucosa + fructosa de los fructanos (Ftn (Glc+Fru)) y glucosa del almidón (Alm) de la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente ($390 \mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado ($1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$) en cámaras de crecimiento. Ftn(Fru/Glc), razón de los contenidos de fructosa y glucosa de los fructanos. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos ($n=5$; $P<0.05$)

		CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	GRA	G132	GRA	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Exp. 1	Glc	0.065	0.090	0.015	0.904	0.295	0.295	0.417
	Fru	0.118	0.515	0.333	1.521	0.238	0.238	0.337
	Sac	11.0	27.2	28.9	43.8	3.33	3.33	4.71
	Ftn (Glc+Fru)	1.40	13.90	2.10	92.00	16.99	16.99	24.02
	Ftn(Fru/Glc)	1.25	1.91	0.87	4.34	0.775	0.775	1.096
	Alm	0.80	28.00	5.60	46.30	5.34	5.34	7.55
Exp. 2	Glc	-	-	-	-			
	Fru	0.019	0.219	0.048	0.455	0.062	0.062	0.088
	Sac	6.17	30.72	14.78	40.63	3.15	3.15	4.46
	Ftn (Glc+Fru)	1.60	9.30	3.10	58.00	10.31	10.31	14.58
	Ftn(Fru/Glc)	1.77	2.67	1.14	3.46	0.66	0.66	0.93
	Alm	0.42	11.14	2.74	36.60	3.89	3.89	5.50

3.2.6. Contenido en nitrato aminoácidos y ATP

En el primer experimento no hubo diferencias entre genotipos en el contenido foliar de nitrato, que disminuyó significativamente al crecer en CO₂ elevado (Tabla 3.16). El contenido de aminoácidos libres fue notablemente mayor en Graphic que en G132. El CO₂ elevado aumentó este contenido en Graphic y solo lo hizo escasa y no significativamente en G132.

El contenido de nitrato en el segundo cultivo fue también similar en G132 y Graphic y menor con CO₂ elevado que ambiente en ambos genotipos (Tabla 3.16). El contenido foliar de aminoácidos libres fue, como en el primer cultivo, mucho mayor en el genotipo silvestre que en el mutante. El CO₂ elevado tendió a disminuir el contenido de aminoácidos en Graphic y a aumentarlo en G132, siendo la interacción genotipo x CO₂ significativa, aunque las diferencias causadas por el CO₂ no alcanzaron significación estadística en ningún genotipo. El contenido de ATP en el segundo experimento fue mayor en G132 que en Graphic y no cambió con el CO₂ elevado.

Tabla 3.16. Contenido en nitrato, aminoácidos y ATP en CO₂ ambiente y elevado. Contenido ($\mu\text{mol g PF-1}$) de la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente ($390 \mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado ($1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$) en cámaras de crecimiento. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos ($n=5$; $P<0.05$).

		CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	GRA	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Exp. 1	Nitrato	164.6	158.6	140.5	137.5	9.8	9.8	13.86
	Aminoácidos	13.7	47.5	14.9	58.1	4.27	4.27	6.04
Exp. 2	Nitrato	172.6	170.8	163.8	147.3	15.48	15.48	21.89
	Aminoácidos	9.33	41.78	13.90	37.95	3.878	3.878	5.484
	ATP	0.280	0.165	0.264	0.167	0.091	0.091	0.128

3.2.7. Contenido de proteínas y actividades enzimáticas

3.2.7.1. Contenido de proteínas

En el primer experimento el contenido total de proteína, la proteína soluble y la proteína de membrana, así como la proteína Rubisco fueron significativamente mayores en Graphic que en G132, independientemente de la concentración de CO₂ de cultivo (Tabla 3.17). El descenso en G132 respecto a Graphic fue mucho mayor en proteína soluble que en proteínas de membrana o clorofilas (ver Fig. 3.19). Más aún, la Rubisco explicó toda la disminución de la proteína soluble en G132 comparada con Graphic. La enzima Rubisco representó un 56,4 y 52,6 % de la proteína soluble en Graphic y sólo un 13,7 y 10,4 % en el mutante para CO₂ ambiente y elevado, respectivamente; esta diferencia fue significativa, con una tendencia a la baja al aumentar el CO₂. El polipéptido de 33 kDa que reaccionó con el anticuerpo para la subunidad grande de la Rubisco fue una fracción significativamente mayor de dicha subunidad en G132 que en Graphic (Fig. 3.20). El crecimiento en CO₂ elevado disminuyó la concentración de Rubisco en Graphic, pero la disminución no fue significativa en G132. Las otras fracciones de proteína no cambiaron con el crecimiento en CO₂ elevado.

En la segunda experimentación los contenidos en proteína soluble, de membrana y total y, en gran medida, Rubisco y su porcentaje con respecto al contenido de proteína soluble, fueron menores en el mutante G132 (Tabla 3.15), como ya se observó en la primera experimentación. El contenido de proteínas en la fracción

soluble, descartando la cantidad de enzima Rubisco, fue similar en ambos genotipos, mostrando así que la principal diferencia entre ellos fue la abundancia de Rubisco. La proporción de proteína de 33 kDa en la subunidad grande de Rubisco fue notablemente mayor en G132 que en Graphic (41,2 % y 21,9 %, respectivamente). Las proteínas analizadas mostraron en G132 una tendencia a aumentar con el CO₂ de crecimiento, al contrario que en Graphic, en el que tendieron a disminuir, siendo esta disminución significativa para Rubisco y su porcentaje en la proteína soluble. Fueron excepción las proteínas solubles con exclusión de Rubisco, que aumentaron con el CO₂ de crecimiento en los dos genotipos. El CO₂ elevado aumentó la abundancia relativa del polipéptido de 33 kDa, en mayor medida en G132 que en Graphic, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 3.17. Contenido de proteínas CO₂ ambiente y elevado. Contenido (mg g PF⁻¹) de proteína soluble, de membrana, total, Rubisco, soluble menos Rubisco y Rubisco como porcentaje de la proteína soluble en la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente (390 μmol mol⁻¹) y elevado (1200 μmol mol⁻¹) en cámaras de crecimiento. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos (n=5; P<0.05).

		CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Exp. 1	Soluble	10.8	20.7	11.5	19.6	2.526	2.526	3.573
	Membrana	5.60	7.96	5.91	8.37	1.114	1.114	1.575
	Total	16.35	28.64	17.43	27.99	3.255	3.255	4.603
	Rubisco	1.38	11.34	1.19	9.57	0.584	0.584	0.826
	Rubisco (%)	13.7	56.4	10.4	52.6	5.800	5.800	8.200
	Sol. - Rubisco	8.68	8.86	10.34	8.87	1.703	1.703	2.408
Exp. 2	Soluble	7.98	16.0	9.57	15.8	1.650	1.650	2.330
	Membrana	3.39	10.5	4.39	8.74	2.032	2.032	2.873
	Total	11.4	26.5	14.0	24.6	2.900	2.900	4.110
	Rubisco	0.86	9.37	1.17	6.88	0.780	0.780	1.100
	Rubisco (%)	10.7	58.8	12.1	43.8	5.060	5.060	7.160
	Sol. - Rubisco	7.12	6.67	8.40	8.94	1.456	1.456	2.058

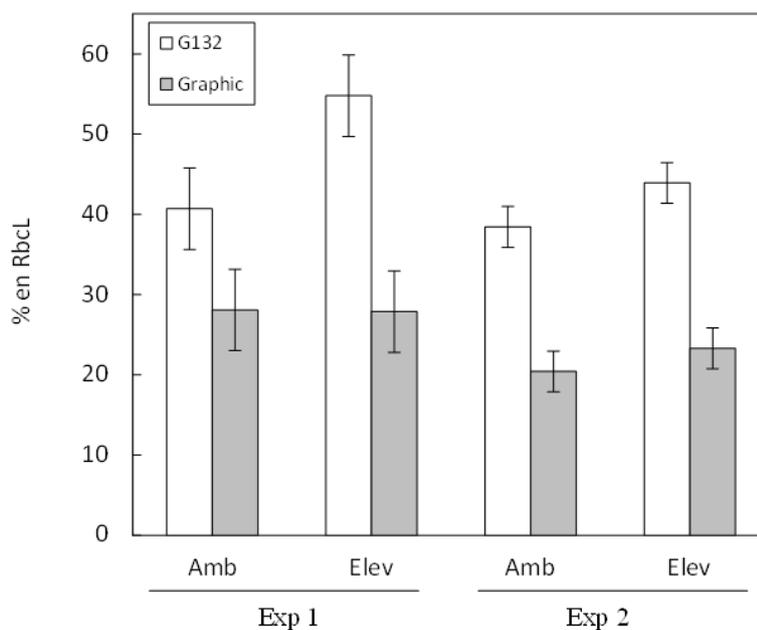


Figura 3.20. Polipéptido de 33 kDa como porcentaje de la subunidad grande de Rubisco en CO₂ ambiente y elevado. La hoja más joven completamente extendida de cebada Graphic (barras grises) y su mutante G132 (barras blancas) (hojas 4 y 3, respectivamente), cultivados en CO₂ ambiente (390 μmol CO₂ mol⁻¹) y elevado (1200 μmol CO₂ mol⁻¹) en cámaras de crecimiento. Las barras verticales representan la mds para la interacción genotipo x CO₂ (n=5; P<0.05).

En la segunda experimentación, mediante blotting con anticuerpos conjugados, se analizó en términos absolutos la proteína D1 del PSII. Y en términos relativos de abundancia se analizaron el complejo cosechador de luz II (LHCII) y el citocromo b6 (Cyt b6) del complejo citocromo b6f implicado en la conexión de los dos fotosistemas (Fig. 3.21). Para esta cuantificación relativa se tuvo en cuenta la cantidad de proteína total y se empleó como referencia el tratamiento control de Graphic cultivado a CO₂ ambiente.

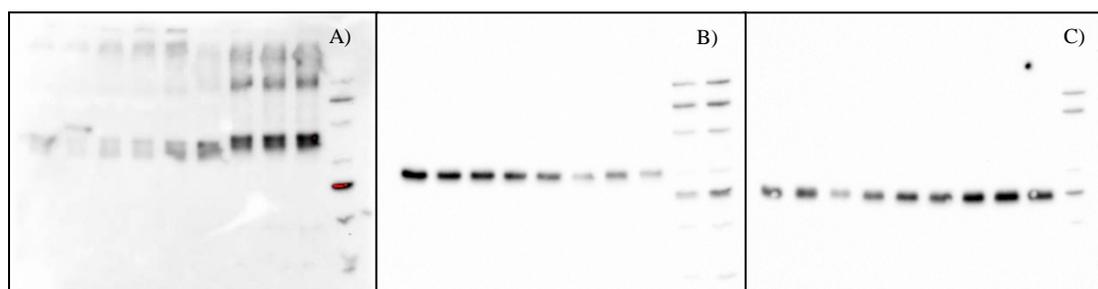


Figura 3.21. Detalle de membranas de hibridación incubadas con anticuerpo conjugado de las proteínas (A) D1, (B) LHCII y (C) Cyt b6 en extractos de la hoja más joven completamente extendida de cebada Graphic y su mutante G132 (hojas 4 y 3, respectivamente), cultivados en CO₂ ambiente (390 μmol CO₂ mol⁻¹) y elevado (1200 μmol CO₂ mol⁻¹) en cámaras de crecimiento. No se especifican los diferentes genotipos o tratamientos.

La cantidad encontrada de los polipéptidos D1, LHCII y Cyt b6 en el mutante fue menor que en el genotipo silvestre en CO₂ ambiental, pero idéntica en CO₂ elevado para el caso de la proteína D1 y mayor en el caso de LHCII y Cyt b6. En el mutante se observó un aumento de las tres proteínas con el CO₂ elevado de crecimiento mientras que el efecto fue inverso en Graphic, con reducciones del 33 y 61 % en LHCII y Cyt b6, respectivamente.

Tabla 3.18. Western Blots en CO₂ ambiente y elevado. Contenido (ng g PF⁻¹) de proteína D1 y abundancia relativa con respecto al tratamiento control (*) de LHCII y Cyt b6 en la hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente (390 μmol mol⁻¹) y elevado (1200 μmol mol⁻¹) en cámaras de crecimiento. mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan efectos significativos (n=5; P<0.05).

	CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
	G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
D1	0.325	0.708	0.507	0.544	0.117	0.117	0.165
LHCII	0.908	*1	1.681	0.669	-	-	-
Cyt b6	0.458	*1	1.120	0.386	-	-	-

3.2.7.2. Ensayos enzimáticos *in vitro*

3.2.7.2.1. Actividad Rubisco

En el primer experimento la actividad inicial y la actividad total de la enzima Rubisco fueron significativamente mayores en Graphic que en G132 (Fig. 3.22A), en el que el estado de activación de la enzima fue mayor. No hubo efectos significativos del CO₂ en la actividad Rubisco.

En el segundo experimento las actividades inicial y total de la enzima Rubisco fueron menores en el mutante G132 que en Graphic (Fig. 3.22B), confirmando el resultado del experimento anterior. En el caso de Graphic la actividad total disminuyó con el crecimiento en CO₂ elevado, mientras que tendió a aumentar en G132 sin que este efecto alcanzara significación estadística. En cuanto al porcentaje de activación de la enzima, no se observaron cambios significativos.

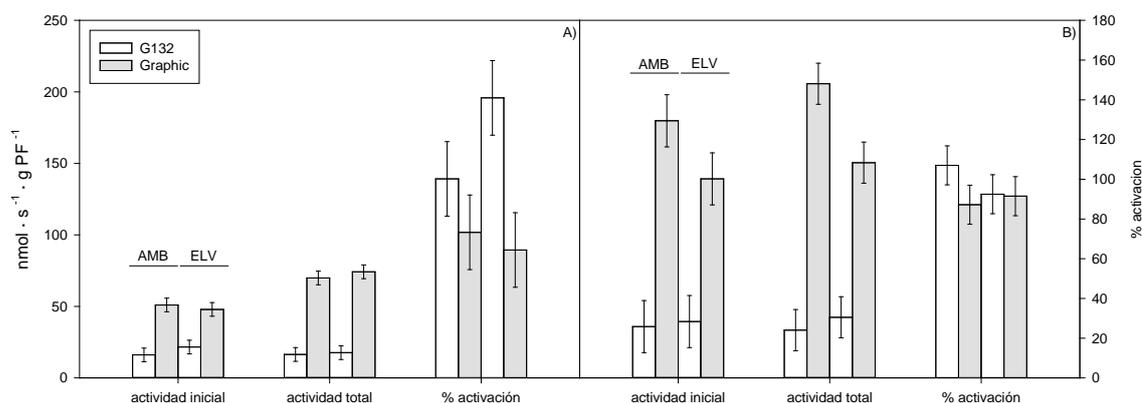


Figura 3.22. Actividad y estado de activación de Rubisco en CO₂ ambiente y elevado. La hoja recientemente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente (390 μmol mol⁻¹) y elevado (1200 μmol mol⁻¹) en cámaras de crecimiento en (A) el primer experimento y (B) el segundo experimento. Las barras verticales representan la mds para la interacción genotipo x CO₂ (n=5, P< 0.05).

3.2.7.2.2. Actividad Nitrato reductasa

En el primer experimento las actividades nitrato reductasa máxima y selectiva fueron mayores en la variedad Graphic que en G132 (Fig. 3.23A). En ambos genotipos dichas actividades tendieron a aumentar con el CO₂ de crecimiento, aunque en G132 el efecto no alcanzó significación. La activación de la enzima fue significativamente mayor en Graphic que en G132, mostrando en G132 un aumento con el CO₂ y no así en Graphic. La diferencia entre genotipos en actividad nitrato reductasa fue mucho menor que en el caso de la actividad Rubisco (Figura 3.22).

En el segundo experimento las actividades nitrato reductasa máxima y selectiva, y el estado de activación de la enzima, fueron menores en G132 que en Graphic (Fig. 3.23B), como ya se encontró en el primer experimento. El crecimiento en

CO₂ elevado aumentó estas actividades y activación en G132, pero las disminuyó en Graphic.

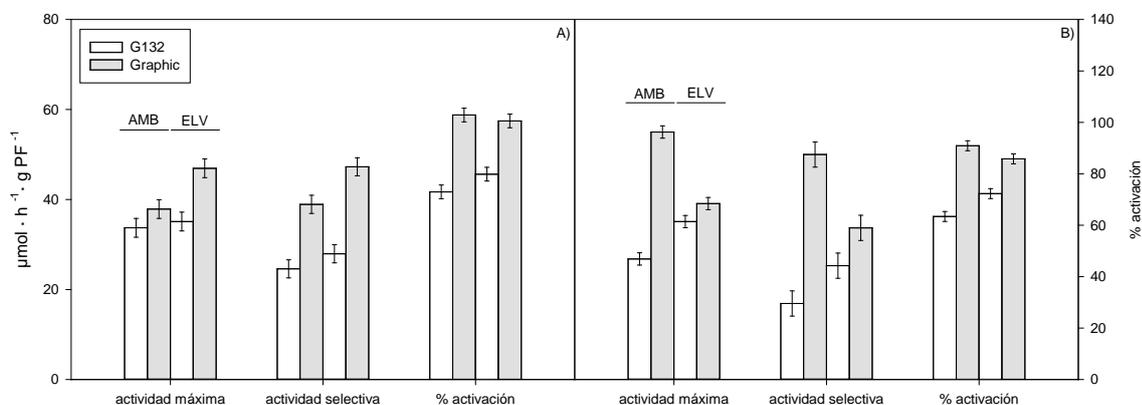


Figura 3.23. Actividad y estado de activación de nitrato reductasa en CO₂ ambiente y elevado. La hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic (hoja 4) y su mutante G132 (hoja 3) cultivados en CO₂ ambiente (390 μmol mol⁻¹) y elevado (1200 μmol mol⁻¹) en cámaras de crecimiento en (A) el primer experimento y (B) el segundo experimento. Las barras verticales representan la mds para la interacción genotipo x CO₂ (n=5, P< 0.05).

3.2.8. Análisis paralelo de la expresión génica: microarray

Para investigar la respuesta de los genes del mutante G132 y del genotipo silvestre de cebada a las diferentes condiciones de CO₂ atmosférico, se realizó un análisis comparativo del transcriptoma. Los siguientes estudios se realizaron en primer lugar para saber qué transcritos fueron cambiados en G132 en relación al tipo silvestre en ambas condiciones ambientales. En segundo lugar, se estudiaron los genes cuya expresión cambió con el mismo signo en ambos genotipos en respuesta al CO₂ elevado. El tercer objetivo fue averiguar la respuesta diferencial de cada genotipo al CO₂ elevado. El factor genético determinó gran parte de los resultados, si bien, en el caso del genotipo silvestre también lo hicieron las condiciones de crecimiento, y en menor medida en el mutante (Fig. 3.24).

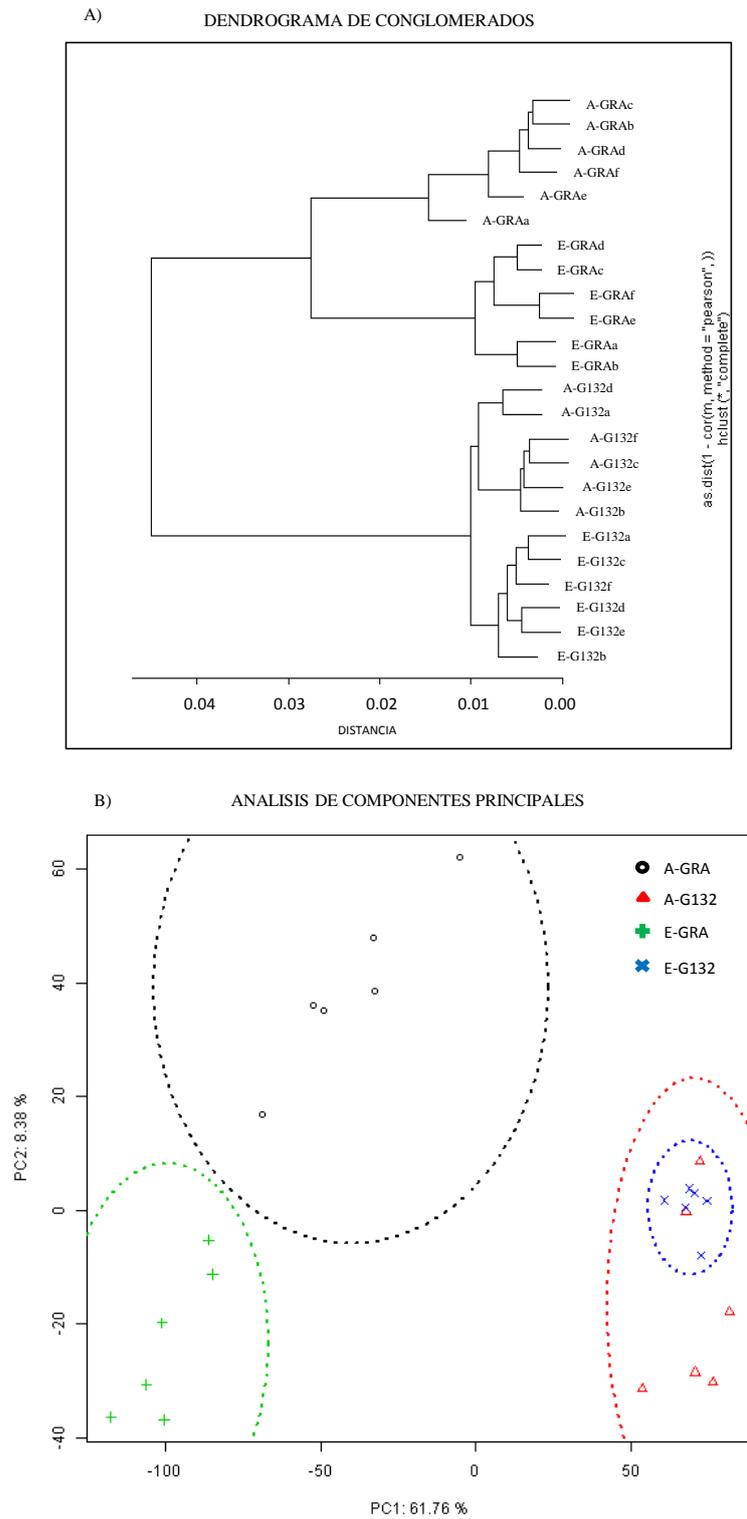


Figura 3.24. Representación del análisis transcriptómico del microarray de los cuatro tratamientos empleados. (A) Dendrograma de conglomerados de las muestras (*cluster analysis*) y (B) análisis de los componentes principales (PCA) de los cuatro tratamientos. A-GRa, Graphic en CO₂ ambiente; A-G132, mutante en CO₂ ambiente; E-GRa, Graphic en CO₂ elevado; E-G132, mutante en CO₂ elevado, con seis repeticiones por tratamiento.

3.2.8.1 Respuesta del genotipo

Encontramos 2043 transcritos que se expresaron diferencialmente en G132 respecto al genotipo silvestre, con el mismo patrón de expresión en ambas condiciones de CO₂. De ellos 917 estuvieron sobreexpresados y 1126 infraexpresados (Fig. 3.25 y 3.26). De todos ellos pudimos anotar funcionalmente un 49.4 % (Apéndice A.1).

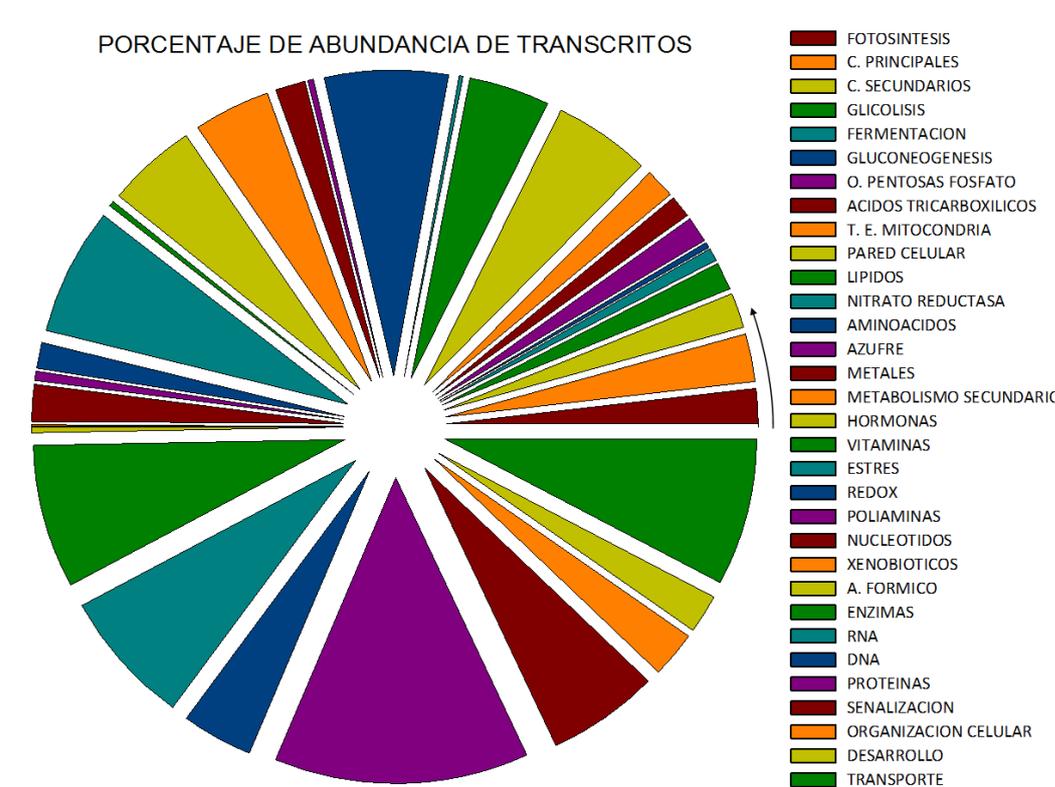


Figura 3.25. Gráfico circular del porcentaje de abundancia de transcritos anotados.

3.2.8.1.1 Fotosíntesis

Los transcritos anotados que se asocian a los procesos fotosintéticos de la planta se encontraron sobreexpresados en el mutante. Principalmente fueron genes del complejo colector de luz del PSII, proteínas del centro de reacción del PSII como PsbP y PsbR, y del PSI, como PsaA y PsaB. También dos fragmentos (subunidades 5 y 7) del complejo NADH-plastoquinona oxidoreductasa y un transcrito codificante para la subunidad grande de Rubisco.

3.2.8.1.2 Metabolismo de carbohidratos

El segundo grupo de transcritos fue anotado atendiendo a la implicación en el metabolismo de carbohidratos. Agrupados dentro del metabolismo de carbohidratos principales encontramos reprimido un grupo de hexoquinasas y fructoquinasas, transcritos con actividad glucosil hidrolasa (como beta-fructofuranosidasas, glucosidasas, fructano β -(2, 1) –fructosidasa y fructano 6-exohidrolasa, estas dos últimas sobreexpresadas), transferasas muy reprimidas del tipo fructosiltransferasas y una serie de invertasas de pared celular y otras vacuolares, estas últimas sobreexpresadas. Otro transcrito similar a sacarosa sintasa (SUS) estuvo sobreexpresado, mientras que dos transcritos identificados como almidon fosforilasa fueron reprimidos.

Dentro del metabolismo de carbohidratos secundarios se observó una sobreexpresión de transcritos del metabolismo de la trehalosa y un grupo diverso de quinasas. Concretamente hubo sobreexpresión de dos trehalosa sintasas (TPS) y dos trehalosa fosfatasas (TPP) implicadas en el proceso de biosíntesis de trehalosa y con una posible función reguladora del metabolismo de carbohidratos. Y en el grupo de quinasas se anotaron dos adenosin quinasas, transcritos identificados como genes necesarios para la acumulación de Rubisco (NARA) e implicados en la regulación fotosintética (Ogawa *et al.*, 2009) y dos transcritos similares a xilulosa quinasa (XK). Aunque teniendo una secuencia similar a xilulosa quinasas, varias líneas de evidencia experimental sugieren que no actúan sobre xilulosa o desoxi-xilulosa. También se encontraron infraexpresados un transcrito de galacturonosiltransferasa implicado en la biosíntesis de pectinas, uno de alfa galactosidasa alcalina y dos de galactinol-sacarosa galactosiltransferasas, probables proteínas de imbibición de la semilla (SIP) con acción transferasa de galactosil de estaquiosa a rafinosa.

Por otro lado se observó que podría estar reprimida la conversión de glucuronato a través de mio-inositol, ya que estuvo reprimida una serie de transcritos implicados en dicha ruta, como oxigenasas y quinasas de mio-inositol (MIOX, MIK), mientras que se encontró sobreexpresado un transcrito similar a mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS). (Loewus and Murthy, 2000). También se

subexpresaron dos oxidoreductasas, concretamente aldo-ceto reductasas y una aldosa reductasa.

3.2.8.1.3 Glicolisis

Estuvieron reprimidos los transcritos agrupados dentro de la glicólisis. De entre los localizados en el citosol se identificaron transcritos para pirofosfato-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa (PFP), que cataliza una reacción similar a la 6-fosfofructoquinasa, pero utiliza pirofosfato en lugar de ATP como donador de fosfato, cuatro piruvato quinasas (PK), dos enolasas (ENO), dos fosfoenol piruvato carboxilasas (PEPC), y un transcrito similar a gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAP-DH). Los transcritos para tres fosfoglicerato mutasas (PGM) localizados en los cloroplastos estuvieron también reprimidos.

3.2.8.1.4 Gluconeogénesis

Al mismo tiempo se clasificaron tres transcritos sobreexpresados e implicados en la gluconeogénesis, que codifican para piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK). Esta enzima, que cataliza la conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato, se asocia normalmente con la fotosíntesis C4. En plantas C3 se le ha implicado en la interconversión de aminoácidos y producción de los mismos para transporte durante la senescencia foliar, así como en el aporte de fosfoenolpiruvato a la ruta del sikimato en la biosíntesis de lignina (Aubry *et al.*, 2011).

3.2.8.1.5 Metabolismo fermentativo

Dentro del metabolismo fermentativo encontramos cuatro transcritos de aldehído deshidrogenasa (ALDH), dos reprimidos y supuestamente implicados en procesos de respuesta a la desecación, respuesta al estrés salino o respuesta al estímulo ácido abscísico, y otros dos de coniferil aldehído deshidrogenasa sobreexpresados, relacionados con la biosíntesis de fenilpropanoides y que también oxidan otros aldehídos aromáticos, pero no aldehídos alifáticos. Y por otro lado, tres transcritos subexpresados similares a la alcohol deshidrogenasa (ADH), relacionados con la respuesta a ion cadmio, la respiración celular, la respuesta al estrés salino, respuesta a la hipoxia o la respuesta al estrés osmótico.

3.2.8.1.6 Pentosas fosfato

En la ruta de las pentosas fosfato se encontraron diversos transcritos, en su mayoría reprimidos. Dentro de la fase oxidativa de las pentosas fosfato se identificó una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cloroplástica sobreexpresada y un transcrito perteneciente a la familia proteínica de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa reprimido. Por otro lado, en la fase no oxidativa de la ruta se subexpresaron tres transaldolasas. Además, hubo nueve transcritos reprimidos de una flavoproteína, la ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR), que se encuentra en los cloroplastos y actúa sobre los centros [2Fe-2S] de las ferredoxinas.

3.2.8.1.7 Ciclo de Krebs

Dentro del ciclo de Krebs hubo represión de la mayoría de transcritos. Principalmente siete transcritos de la malato deshidrogenasa (MDH) y dos transcritos de aconitasa. Estos últimos pueden catalizar la conversión de citrato a isocitrato a través de aconitato, indicando que puede participar en el ciclo de Krebs y otras rutas metabólicas primarias. Y afectan también a los niveles de transcripción de superóxido dismutasa, pudiendo desempeñar un papel en la respuesta al estrés oxidativo (Moeder *et al.*, 2007). Por otro lado se sobreexpresaron un transcrito que codifica la subunidad alfa del componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC-E1) con actividad oxidorreductasa, paso limitante de la velocidad de todo el complejo, y otros dos que codifican para lipoamida deshidrogenasa 1 (LPD1 o PDC-E3), otra subunidad del mismo complejo. Este complejo proporciona acetil-CoA para la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos.

3.2.8.1.8 Transporte electrónico mitocondrial y síntesis de ATP

Hubo una represión general de los transcritos identificados para esta ruta metabólica. Casi todos fueron componentes de la cadena transportadora de electrones. Empezando por una ubiquinol: citocromo b-c₁ oxidorreductasa y una subunidad de la misma, llamada citocromo c₁. Se encontraron también tres NAD(P)H: ubiquinona reductasa (NDB2), cuatro ubiquinol oxidasas (AOX) y una ubiquinona oxidorreductasa de transporte de electrones, esta última

sobreexpresada. Por otro lado estuvo reprimida la subunidad g de la ATP sintasa mitocondrial. Se observó la sobreexpresión de un transcrito implicado en la biogénesis del citocromo c.

3.2.8.1.9 Pared celular

Se identificaron 52 transcritos cuya anotación los ubicó dentro del metabolismo de pared celular. Estuvieron reprimidos de forma muy generalizada y de modo más acusado al crecer el mutante en CO₂ elevado. Atendiendo a la síntesis de moléculas precursoras de pectinas y hemicelulosas, compuestos estructurales de la pared celular, se localizó una serie de transcritos reprimidos anotados como epimerasas, deshidrogenasas y descarboxilasas, cuya función es la formación de xilosa, ramnosa, arabinosa, fucosa, galactosa y arabinosa. Por otro lado encontramos dos celulosa sintasas reprimidas cuya anotación encaja con la subunidad catalítica 2 mientras que otras dos celulosa sintasas sobreexpresadas correspondían con la subunidades 4 y 7. Posiblemente implicadas en la síntesis de hemicelulosa, se encontraron reprimidas tres glicotransferasas y cinco proteína arabinogalactano con dominio fasciclina, lo que las implica en la adhesión celular.

Por otro lado, en la degradación y modificación de la pared celular observamos glicosil hidrolasas, endoglucanasas que degradan celulosa, xilosidasas que degradan hemicelulosa y nueve xiloglucano endo-transglicosilasa (XET) reprimidas, especialmente en CO₂ elevado. Estas últimas son enzimas muy importantes durante la expansión de la pared celular que rompen un enlace beta 1-4 en la cadena de un xiloglucano y transfieren el segmento xiloglucanil a un aceptor. También se observó represión de un inhibidor de poligalacturonasas, o en otras palabras, un inhibidor de las enzimas pectolíticas. Además, se identificó un transcrito sobreexpresado relacionado con el crecimiento unidireccional y el ensanchamiento de la pared celular, anotado como expansina.

3.2.8.1.10 Metabolismo de lípidos

Dentro del metabolismo de lípidos encontramos once transcritos para la síntesis de ácidos grasos. Reprimidos, un par de tioesterasas, importantes en la síntesis de ácidos grasos al remover la coenzima A de la cadena de acilos, dos posibles

proteínas portadoras de grupos acilo (ACP) y dos transcritos de dihidrolipoamida S-acetiltransferasa (LTA2), que codifica la subunidad E2 del complejo piruvato descarboxilasa. Mientras que sobreexpresados, observamos cinco transcritos similares a 3-cetoacil-CoA sintasas implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (VLCFA; *very long chain fatty acids*). Por otro lado, atendiendo a la desaturación de ácidos grasos, nos encontramos reprimidos un transcrito de una ácido graso hidroxilasa (FAH) y dos desaturasas de ácidos grasos (FAD). Una de ellas, responsable de la síntesis de ácidos grasos 16:3 y 18:3 a partir de galactolípidos, sulfolípidos y fosfatidilglicerol, usa como donante de electrones la ferredoxina, y la otra es una desaturasa plástica sensible a la temperatura.

Dentro de la síntesis de fosfolípidos observamos mayor abundancia de transcritos sobreexpresados, como cuatro sintasas de fosfolípido ciclopropano ácido graso (Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase) o una diacilglicerol quinasa (DGK). Por otro lado encontramos subexpresados un transcrito de CDP-colina sintetasa y dos fosfoetanolamina N-metiltransferasa (PMEAMT), que cataliza los dos últimos pasos de metilación de la fosfoetanolamina, necesaria para la síntesis de fosfocolina en plantas.

Encontramos dentro de la degradación de lípidos nueve alfa-beta hidrolasas anotadas principalmente como fosfolipasas, cuatro de las cuales se sobreexpresaron y las restantes se reprimieron. Entre estas últimas había una GDSL(S) hidrolasa, una palmitoil esterasa, una carboxil esterasa que funciona como receptor dominante de giberelinas, y dos transcritos identificados como glicerofosfodiéster fosfodiésterasa similares a SHV3 1 (SVL1), que participan en la organización de la pared celular primaria, concretamente en la acumulación de celulosa cristalina. También se reprimieron dos transcritos similares a ceramidasas potencialmente implicados en la proliferación celular, adhesión y apoptosis.

Por último observamos dos transcritos sobreexpresados de dihidroxiacetona fosfato reductasa (DHAP) implicada en suministrar glicerol-3-fosfato dentro del cloroplasto para la síntesis de glicerolípidos. En procariotas se la relaciona con el flujo de ácidos grasos. Y también sobreexpresadas dos flavoproteínas *wrba* cuya respuesta se ve provocada por el fallo en la cadena de transferencia de electrones e inducen la reducción de quinonas para evitar la oxidación celular. Además se

identificaron una lípido transferasa (LTP) sobreexpresada y una esterol aciltransferasa subexpresada.

3.2.8.1.11 Asimilación de nitrógeno y azufre y manejo de metales

Por un lado encontramos dos transcritos muy infraexpresados que corresponden a la nitrato reductasa. En cuanto al azufre, observamos 3 ATP sulfurilasas sobreexpresadas, las cuales son las primeras enzimas en la asimilación de azufre. Dentro del movimiento de metales en la planta encontramos una sobreexpresión generalizada. Principalmente encontramos proteínas asociadas al transporte de metales pesados, tales como un transportador de hierro, necesario para el secuestro de hierro dentro de la vacuola, dos proteínas tsjt1 específicas de tallo, una proteína de unión a selenio o una reductasa quelante de hierro localizada en el cloroplasto. Solamente observamos reprimidos transcritos para una chaperona de cobre del citocromo c oxidasa, una ferritina y una fitoquelatina sintasa con función protectora frente al estrés oxidativo en las células vegetales.

3.2.8.1.12 Metabolismo de aminoácidos

En términos generales, observamos una represión de la síntesis de aminoácidos y una sobreexpresión de la degradación. En cuanto a la síntesis de aminoácidos, encontramos primeramente que la formación de serina a partir de glicerato estuvo reprimida (EC. 3.1.3.3, EC. 1.1.1.95 reprimida por serina). Y a partir de serina, encontramos que transcritos de la síntesis de cisteína se sobreexpresaron (cisteína sintasa y EC. 2.5.1.47).

Respecto a la síntesis de aminoácidos aromáticos, observamos una represión en la formación de fenilalanina (EC. 4.2.1.51 encima reprimida por fenilalanina) y triptófano (EC. 2.4.2.18, 4.1.1.48) así como corismato a partir de shikimato (EC: 2.7.1.71, 2.5.1.19, 4.2.3.5).

Por otro lado observamos reprimida la aspartato aminotransferasas (EC. 2.6.1.1), que convierte el oxalacetato y glutamato en aspartato. Siguiendo la formación de treonina a partir del aspartato por la vía de homoserina encontramos reprimida la treonina sintasa (EC. 4.2.3.1). Y por consiguiente la síntesis de isoleucina desde treonina se vio reprimida (EC. 1.1.1.86, enzima inhibida por NADP⁺ y 2,3-Dihidroxi-3-metilbutanoato, EC. 4.3.1.19 inhibida por cisteína, isoleucina,

leucina y activada por valina; via oxobutanoato desde treonina). Encontramos la asparagina sintetasa sobreexpresada (EC. 6.3.1.1, encima inhibida por asparagina), que convierte a su vez el aspartato en asparagina.

En la síntesis de aminobutanoato o GABA a partir de glutamato observamos una glutamato descarboxilasa ambiguamente expresada (EC. 4.1.1.15). Por otro lado, la primera encima en el proceso de transformacion de glutamato a prolina se vio altamente reprimida (encima inhibida por prolina y ADP) y también la síntesis de metionina (2.1.1.-, activada por metionina). Tambien vimos que la acetil ornitina transaminasa, implicada en la formación de agrinina via ornitina a partir de glutamato (EC. 2.6.1.11), estaba sobreexpresada.

Como potenciales transcritos sobreexpresados en las vías catabólicas de aminoácidos encontramos tres transcritos anotados como ureasas (EC. 3.5.1.5 urea que proviene de la arginina= ornitina+urea). Otros cinco transcritos que codificaban para asparaginasa que cataliza la hidrolisis de asparagina a aspartato y tambien dos posibles proteínas que contienen un dominio ACT (aspartate kinase, chorismate mutase and TyrA). Tambien el primer paso de la degradación de prolina a glutamato fue sobreexpresado (EC. 1.5.5.2), mientras que el último se observó reprimido (EC. 1.2.1.88). Mientras que reprimidos encontramos, dentro de la degradación de metionina, cuatro transcritos anotados para la formación de homocisteina Por otro lado encontramos reprimidos un par de transcritos (EC. 1.5.1.8) intermediarios en la degradacion de lisina a glutarato y un par de transcritos sobreexpresados que actúan en la degradación de valina, isoleucina y leucina (EC. 1.2.1.25).

3.2.8.1.13 Metabolismo secundario

Dentro del metabolismo secundario encontramos transcritos involucrados en la formación de isoprenoides y flavonoides que se sobreexpresaron principalmente, mientras que la de fenilpropanoides y alkaloides se reprimió.

Dentro de los isoprenoides observamos que la formación de carotenoides en sus primeros pasos se sobreexpresó mediante transcritos como fitoeno desaturasas, al mismo tiempo que encontramos un transcrito reprimido del tipo carotenoide oxigenasa. Ésta involucrada en los últimos pasos de la biosíntesis de carotenos con la formación de xantofilas. Por otro lado, la ruta del ácido mevalonico la

encontramos reprimida en uno de sus primeros pasos (hydroximetilglutaril-CoA sintasa) y encontramos sobreexpresadas dos linalool sintasas que enlazan dicha ruta a través del isoprenoide e intermediario universal geranil difosfato. En la biosíntesis de tocoferol, hubo un interesante transcrito sobreexpresado similar a una metil fitil hydroquinona metiltransferasa. Éste implicado en la síntesis de vitamina E y que probablemente bloquea la plastoquinona y cuyos mutantes padecen albinismo (2-metil-6-fetil-hidroquinona, APG1). Atendiendo al metabolismo de terpenoides encontramos varias cadineno sintasas, que catalizan la primera etapa en la biosíntesis de gosipol, un pigmento amarillo.

Mientras que dentro del metabolismo de fenilpropanoides encontramos una represión generalizada y más concretamente dentro de la biosíntesis de ligninas. Aquí encontramos transcritos como cuatro fenilalanina amonio liasa, cumarato-CoA ligasa, y shikimato hidroxi cinamoil transferasa. También reprimidos otros transcritos como deshidrogenasas (cinamil alcohol o manitol), metiltransferasas (cafeoil) o una monooxygenasa (trans-cinimato), concluyendo en una represión general de las diferentes rutas de biosíntesis de ligninas.

Atendiendo a la biosíntesis de alcaloides encontramos subexpresados dos descarboxilasas de aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28), una betaína aldehído deshidrogenasa y una strictosidina sintasa (EC 4.3.3.2) conocida como YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE (YLS2), enzima central de la síntesis de indol alcaloides monoterpénicos.

Entre los transcritos anotados la mayoría se identificó como parte de la ruta de biosíntesis de flavonoides. Los flavonoides constituyen una familia relativamente diversa de moléculas aromáticas que se derivan de fenilalanina. Encontramos sobreexpresadas dos chalcona sintasas (EC 2.3.1.74) y cuatro flavonona hidroxilasa/flavonol sintasas (EC 1.14.11.9, proteína srg1). Mientras que subexpresada encontramos una chalcona isomerasa (EC 5.5.1.6), enzima que se encuentra entre los pasos que catalizan las dos enzimas anteriores.

3.2.8.1.14 Metabolismo de hormonas

Se encontró una sobreexpresión de transcritos relacionados con el ácido abscísico (ABA), auxinas y parcialmente, con citoquininas. Mientras que se observó una represión de los implicados con etileno, brasinosteroides, giberelinas y jasmonato

(ácido jasmonico). Relacionados con ABA se observaron tres aldehído oxidasas, paso final para la formación de ABA, dos fosfatasas 2C una sobreexpresada y otra reprimida, que son represores de ABA y sus vías de señalización en procesos tales como cierre de estomas o crecimiento. En cuanto a auxinas, se observó la sobreexpresión de transcritos de proteínas de respuesta a auxina como por ejemplo las de tipo pequeña respuesta positiva a auxina (SAUR), factores de transcripción de rápida respuesta (IAA9-10), proteínas específicas de tallo tipo TSJT u otras asociadas a dormancia. Por otro lado se observó reprimido un regulador de tráfico entre endosomas y vacuola con unión a inositol. Dentro del metabolismo de citoquininas encontramos transcritos de citoquinina deshidrogenasa, que cataliza la degradación irreversible de dicha fitohormona. Dos sobreexpresados y uno reprimido. Se vio una represión de dos transcritos relacionados con giberelinas. Un precursor de su formación (ent-caureno sintasa; GA2) y un regulador del nivel endógeno en planta (giberelina 2-beta dioxigenasa; GA2OX). Con respecto al jasmonato se encontraron reprimidas diez lipoxigenasas (LOX) que se cree que están involucradas en la síntesis de ácido jasmonico y tres aleno óxido ciclasas (AOC) involucradas en la producción de un precursor de ácido jasmonico. Los transcritos relacionados con etileno se reprimieron en su mayoría. Se encontró un transcrito de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACC oxidasa), que en última instancia es responsable de la formación de etileno, y algunas proteínas reguladoras de transcripción de respuesta a etileno. Se encontraron transcritos, en su mayoría reprimidos, implicados en el metabolismo de los brasinoesteroides. Concretamente, tres receptor quinasa insensibles a brasinoesteroide (BAK1), que controlan la muerte celular y la expresión de genes asociados con la inmunidad innata de la planta en ausencia de agentes patógenos o elicitores.

3.2.8.1.15 Co-factores y vitaminas

Encontramos tres transcritos, uno de ellos reprimido e identificado como pantotenato quinasa, que cataliza la fosforilación de pantotenato, el primer paso en la biosíntesis de CoA. Puede jugar un papel en la regulación fisiológica de la concentración intracelular de CoA. Otros dos sobreexpresados, uno interviene en la síntesis de ácido salicílico (SA) y también participa en la síntesis de

filoquinona (vitamina K1). Otro codifica una proteína similar a fitoltransferasa ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico, implicado en la biosíntesis de filoquinona y plastoquinona. Los mutantes son de color verde pálido con defectos en el transporte de electrones fotosintético.

3.2.8.1.16 Estrés

Encontramos transcritos relacionados con diferentes estreses, tales como bióticos, temperatura o sequía, y que en su mayoría se observaron reprimidos. De entre ellos, veinte transcritos relacionados con la patogenicidad, todos ellos reprimidos y similares a la proteína taumatina. También se identificaron siete quitinasas y genes inducidos por lesiones y tres proteínas básicas de secreción. Mientras que sobreexpresados se encontraron tres transcritos identificados como proteínas termoestables (HS1) que confieren actividad antimicrobiana y antifúngica y dos proteínas loricrina. Se identificaron una serie de transcritos relacionados con el estrés por temperatura. En respuesta al calor se encontraron transcritos similares a chaperonas y proteínas de choque térmico (HSP) de 40, 70 y 90 KDa. También se identificaron dos transcritos de peroxidasa inducibles por frío. Dentro del estrés salino y por sequía se encontraron tres metiltransferasas subexpresadas del tipo PMT26, proteínas de la membrana del aparato de Golgi, y sobreexpresado un transcrito definido como canal permeable a cationes de calcio activado por estrés. Por otro lado, sin responder a un estrés concreto, se encontraron seis transcritos infraexpresados muy similares a proteínas de germinación, dos de ellas con función oxalato oxidasa. Mientras que sobreexpresados identificamos cinco transcritos similares a proteínas quinasas de respuesta a estrés ricas en cisteína y un transcrito similar al gen tolerante de sodio y litio (SLT).

3.2.8.1.17 Redox

Atendiendo a la naturaleza de sus secuencias, algunos transcritos se pudieron clasificar dentro de los procesos de óxido-reducción. En su mayoría se observó una sobreexpresión. Se encontraron cuatro tioerredoxinas (TRX) sobreexpresadas mientras que una ferredoxina-tioerredoxina reductasa (FTR) y dos proteínas disulfuro isomerasas se observaron reprimidas. Por otro lado se encontraron reprimidos dos transcritos similares a la ascorbato oxidasa y se observó una

sobreexpresión de dos dehidroascorbato reductasa. En el caso de esos transcritos reprimidos, la represión con CO₂ elevado fue notablemente mayor. También se observó una expresión reprimida para poliaminas, concretamente esperminas y una arginina descarboxilasa como enzima que cataliza el primer paso para la síntesis de poliaminas. Y una degradación sobreexpresada a través de poliamina oxidasas.

Se encontró una posible proteína cloroplastica de unión al grupo hemo e identificamos dos glutaredoxinas, una sobreexpresada y otra clasificada como del subgrupo III subexpresada.

3.2.8.1.18 Nucleótidos

En la síntesis de nucleótidos se encontró sobreexpresada una CTP sintetasa que está implicada en la biosíntesis de pirimidina. Por otro lado, se encontraron reprimidas dos fosforibosilpirofosfato sintetasa y una dihidropirimidina.

El metabolismo degradativo de nucleótidos se vio sobreexpresado en tres ureido permeasas, que transportan un amplio espectro de derivados oxo de los compuestos heterocíclicos de nitrógeno, y dos inositol-1-monofosfato con actividad nucleotidasa. Se encontraron también tres nudix hidrolasas, dos sobreexpresadas y una reprimida. Hubo además cuatro fosfatasas reprimidas, dos de ellas adenilato quinasas. También estuvo reprimida la subunidad grande de una ribonucleósido difosfato reductasa.

3.2.8.1.19 Biodegradacion

Se encontró una lactoglutation liasa implicada en la desintoxicación de metilglioxal y los otros aldehídos reactivos que se producen como una parte normal del metabolismo.

3.2.8.1.20 Metabolismo C1

Dentro del metabolismo de compuestos de un carbono se observó subexpresada una formato deshidrogenasa, mientras que sobreexpresadas hubo dos 5-formiltetrahidrofolato ciclo ligasa.

3.2.8.1.21 Miscelánea

Entre las monooxigenasas se encontraron cuatro transcritos subexpresados y otros cuatro sobreexpresados, que codifican para polipéptidos del tipo citocromo P450. Dentro de las glicosil transferasas hubo un trascrito sobreexpresado y cinco subexpresados, entre los que se incluyen antocianina o galacturano glicosiltransferasas, todas ellas implicadas en la biosíntesis de flavonoides. Se observó también represión de cuatro glucosidasas y dos xilosidasas, y sobreexpresión de una xilosidasa, todas con funciones en la pared celular. Así mismo, hubo nueve glucanasas reprimidas más fuertemente en CO₂ elevado y cuatro sobreexpresadas. También se encontró subexpresión de tres O-metiltransferasas. Hubo cuatro monooxigenasas dependientes de flavina, de las cuales dos se subexpresaron, junto con otras oxidasas como una quinona oxidoreductasa, una prolina hidroxilasa y una plastocianina. Se sobreexpresaron, además, dos amidasas y dos glutatión transferasas, mientras que se subexpresaron otras tres glutatión transferasas. Disminuyó la expresión de seis peroxidasas, tres fosfatasas ácido púrpura, una acetiltransferasa y cuatro lipotransferasas. Se encontraron sobreexpresadas dos estererasas/lipasas GDSL una aciltransferasa y una rodanasa o tiosulfato sulfurotransferasa. También se subexpresó una y se sobreexpresaron dos deshidrogenasas/reductasas de cadena corta y plegamiento de Rossman. La expresión de feofórbido A oxigenasa, que participa en la degradación de la clorofila, se subexpresó. La abundancia de transcrito para un miembro de la superfamilia de ferredoxinas 2Fe-2S, con actividad de transporte de electrones, aumentó.

3.2.8.1.22 ARN

Se clasificaron setenta y tres transcritos cuyas secuencias estaban relacionadas con los ácidos ribonucleicos, en su mayoría implicados en procesos de regulación de la transcripción y principalmente sobreexpresados. Se observó una represión de la degradación de ARN, encontrándose reprimidas tres ribonucleasas, mientras que una ribonucleasa E cloroplástica, posiblemente implicada en el desarrollo del cloroplasto, se sobreexpresó. Los fenómenos de corte y empalme (*splicing*) se estimularon con la sobreexpresión de dos maturasas y un factor de corte y

empalme cloroplastico. Tambien se encontraron dos helicasas sobreexpresadas, enzimas fundamentales del metabolismo del ARN.

La propia transcripción de ARN se vio sobreexpresada, encontrándose seis subunidades de ARN polimerasas así reguladas y un factor sigma de una ARN polimerasa cloroplastica. Varias secuencias de factores de transcripción con dominios hélice-giro-hélice básicos (Basic Helix-Loop-Helix, bHLH), MYB, NAC, bZIP, Aux/IAA y SET se sobreexpresaron en el mutante. Algunos factores de transcripción bHLH (bHLH, pif1, fama, une10) podrían estar implicados en diferenciación de los estomas e interacción con fotoreceptores phyA (PIF). Otros con un dominio MYB son cruciales para el control de la proliferación y la diferenciación de tipo de celular, o simplemente regulan la biosíntesis de flavonoides (proteína relacionada con Myb MYBAS2; subexpresado). El dominio NAC podría estar implicado en el control de formación de células del meristemo y en respuesta a estrés salino o ABA, y se encontró sobreexpresado. Atendiendo a los factores de transcripción con dominio bZIP podríamos relacionarlos con procesos importantes como el estrés abiótico, la señalización hormonal, el metabolismo energético y el desarrollo. Del último grupo, tres secuencias con dominio SET eran metiltransferasas de Rubisco (RMT) cuya actividad enzimática se ha mapeado en el dominio SET. Además se encontraron otros factores de transcripción como una proteína citoplasmática con dominio U-box ubiquitina ligasa E3, que está implicado en la respuesta al estrés hídrico, o un factor de transcripción con dominio homeobox e implicados en la regulación del desarrollo. Por otro lado se encontró menor número de factores de transcripción reprimidos, del tipo WRKY, C2H2, RAV o BTF3.

3.2.8.1.23 ADN

Las secuencias anotadas dentro de los procesos metabólicos del ADN se vieron claramente reprimidas. Se encontraron 21 histonas en su mayoría tipo H2A y subexpresadas. Implicados en la replicación del ADN, su reparación y la recombinación genética se anotaron también reprimidos transcritos codificantes para genes de mantenimiento de minicromosomas, subunidades de ADN polimerasa, proteínas de replicación A y proteína de reparación de lesiones del ADN causadas por UV. Por otro lado los únicos transcritos sobreexpresados

fueron helicasas de ARN dependientes de ATP con dominio DEAD-box y endonucleasas.

3.2.8.1.24 Proteínas

Relacionados con la síntesis de proteínas se encontraron reprimidos dos factores de iniciación, uno de elongación y un factor de liberación, proteína que permite la terminación de la traducción mediante el reconocimiento del codón de parada en una secuencia de ARNm. Se encontraron también tARN ligasas tipo leucina y alanina del citoplasma reprimidas, mientras que otra mitocondrial se sobreexpresó. En cuanto a las proteínas ribosomales se observaron las del cloroplasto sobreexpresadas, concretamente las fracciones 30S (subunidades S3, S11, S30A) y 50S (subunidades L2, L12, L16, L22, L28), mientras que las proteínas ribosomales citosólicas de las fracciones 40S (subunidades S8, S9, S19, S26, S27, S3A) y 60S (subunidades L9, L24, L28, L34, L13A, L37A) se reprimieron. En cuanto a la modificación postraduccional, encontramos un gran número de proteína quinasas, concretamente 23, de las que 14 se sobreexpresaron.

La expresión génica para proteínas involucradas en la secreción se vio reprimida en el mutante. Principalmente se reprimieron transcritos del sistema de secreción vesicular en la célula. Se identificaron como SEC61, que es el canal central de un complejo de proteínas asociado a la translocación de polipéptidos a través de membranas, SEC14, que es requerido para el tráfico de endosomas y regula distintas vías de exportación en Golgi, y SEC1. Se encontraron dos partículas de reconocimiento de señal (SRP) una de ellas sobreexpresada. Y también sobreexpresada una proteína vacuolar encargada del movimiento entre Golgi y endosomas. Por otro lado, se observó reprimido un transcrito para una proteína implicada en la importación a plastidios de la protoclorofilida oxidorreductasa A y sobreexpresado uno para una peptidasa requerida para el desarrollo de los tilacoides, con función en la maduración de la membrana exterior de los cloroplastos y del complejo de oxidación de agua (OE).

Para los transcritos implicados en la degradación de proteínas se observó claramente una sobreexpresión generalizada. Los grupos más numerosos fueron las serina proteasas y las ubiquitinas. La expresión de las serina endopeptidasas del tipo subtilisina se encontró muy reprimida, principalmente en CO₂ elevado.

Dichas proteasas estan probablemente relacionadas con la modificación de pared celular. Por otro lado se observaron sobrepresadas dos serina proteasas tipo CLP y varias metalopeptidasas. Estas últimas relacionadas con proteínas romboide localizadas en el cloroplasto y que se reprimieron. Entre sus posibles roles dentro de la planta podríamos destacar la regulación dentro de la membrana tilacoidal de la reparación del aparato fotosintético (PSII, D1). También se encontraron dos serina carboxilpeptidasas reprimidas y otras dos sobrepresadas. Se anotaron transcritos en un amplio grupo de ubiquitinas del tipo E2 y E3, que se sobrepresaron en su mayoría. Entre estas encontramos algunas con dominio RING (Realmente Interesante Nuevo Gen) y dedo de zinc CHY, C3HC4, caja F (CAJA-F 2 DE SEÑALIZACIÓN DE AUXINA) o BTB con dedo de zinc TAZ y enlazante de calmodulina. También se encontraron tres poliubiquitinas sobrepresadas, ubiquitinas que se unen a las proteínas destinadas a la degradación. Otras proteasas, como las cisteina proteasas, se sobrepresaron, mientras que se encontraron inhibidores de éstas reprimidos. Estas proteasas estan relacionadas con senescencia, por su respuesta a citoquininas, auxinas y azúcares (SAG12). Al mismo tiempo las aspártico proteasas se vieron reprimidas (solo tres). Se observaron reprimidas cuatro chaperonas mitocondriales tipo AAA ATPasa llamadas BCS1, que posiblemente se encargan de unir componentes para la formación del complejo citocromo bc (ubiquinol-citocromo c reductasa), en la membrana interna mitocondrial.

3.2.8.1.25 Señalización

Se observó un gran número de transcritos relacionados con la señalización por quinasas, calcio, proteínas G y luz. Estuvieron reprimidos cuatro transcritos de receptores quinasa involucrados en la elongación celular durante el crecimiento vegetativo, principalmente de forma independiente de brasinoesteroides. Y se encontraron siete receptores quinasa con motivo tipo repetición rica en leucina, sin una función concreta, regulados de forma desigual. También dos receptores quinasa con un motivo tipo repetición rica en cisteína uno de ellos reprimido, que probablemente estén implicados en el transporte a través de plasmodesmos. Por otro lado, se vieron sobrepresados algunos receptores quinasa asociados a pared celular.

Con dependencia del calcio encontramos siete transcritos reprimidos y otros seis sobreexpresados. Entre los reprimidos encontramos calreticulinas y calnexinas, que son chaperonas de control de calidad que impiden que se exporten las proteínas mal plegadas, y cuatro quinasas de proteínas dependientes de calcio. Por otro lado, entre los transcritos sobreexpresados encontramos calcineurinas, que son sensores del nivel de calcio en la planta. Se observaron otros transcritos con dominio mano EF que actúan en la regulación de muchos procesos celulares y de desarrollo.

Se encontraron nueve transcritos para proteínas G, que actúan como interruptores en la célula mediante actividad GTPasa, a modo de transductor de señal. Reprimidas encontramos cuatro GTPasas tipo Rab implicadas en el tráfico de vesículas intracelulares y transporte de proteínas. Y sobreexpresadas encontramos en su mayoría proteínas cabeza o Ran BP2/dedo de zinc NZF, con una función incierta.

Se sobreexpresaron transcritos de proteínas inducidas por la luz, concretamente proteínas reguladas por luz tipo LIR, que además están controladas por el reloj circadiano de la planta y cuya función es incierta, así como transcritos de proteínas inducidas tempranamente por la luz (ELIPs) de diferente masa molecular, probablemente implicadas en la integración de pigmentos en los complejos pigmento-proteína maduros.

Hubo ligera represión de dos MAP quinasas tipo PLC fosfodiesterasa. Se reprimieron también tres factores de rápida alcalinización (RAF), que juegan un papel fundamental en la biología celular, y lo más probable, regulan la expansión de células. También se encontraron dos transcritos fuertemente reprimidos identificados como exordium (EXO), genes regulados por brasinosteroides y que algunos datos sugieren que forman parte de una vía de regulación que controla el crecimiento y el desarrollo cuando el C y el suministro de energía es pobre. Finalmente, encontramos sobreexpresados dos transcritos para 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa, relacionados con la regulación de la actina del citoesqueleto.

3.2.8.1.26 Organización celular

Diversos genes implicados en la organización celular se reprimieron, siendo por tanto escasos varios transcritos similares a la actina, la tubulina y la organización de microtúbulos. Hubo sobreexpresión dentro del ciclo celular y se encontraron varias ciclinas tipo D2-2, B1-5 y P1-1 y una quinasa subexpresada (quinasa dependiente de ciclina) que juega un papel central en el control del ciclo celular mitótico. El transporte vesicular también se vio subexpresado con transcritos llamados anexinas, proteínas de unión a membrana, dependientes de calcio e involucradas en la secreción de Golgi. Se encontraron transcritos mayoritariamente reprimidos codificantes para coatómeros de dos subunidades putativamente distintas y un factor de ribosilación de ADP activado por GTPasa. Todos ellos son componentes principales de la proteína Coat de Complejo I y participan en el transporte de las vesículas entre el Retículo Endoplásmico y el Aparato de Golgi y en el transporte vesicular intra-Golgi.

Aumentó la sobreexpresión de un factor de reciclaje de ribosomas implicado en el desarrollo del cloroplasto. Encontramos un transcrito para un regulador de la condensación de cromosomas, proteína sobreexpresada y que inhibe la división en los plastidios. Por otro lado encontramos reprimido un transcrito de la familia de las tubulinas, proteína FtsZ, implicada también en la división de cloroplastos y que parece no interactuar con la anterior.

3.2.8.1.27 Transporte

Dentro de los transcritos asociados al transporte se observó una represión generalizada. Principalmente los transportadores tipo ABC (dominio de unión a ATP), de los que doce transcritos para proteína de resistencia a múltiples medicamentos (MRP) se reprimieron. En relación a esto, se encontraron también reprimidos varios transportadores de metabolitos y cationes orgánicos xenobióticos conocidos como extrusión de múltiples medicamentos y compuestos tóxicos (MATE).

Los transportadores de fosfato se encontraron reprimidos, principalmente en la mitocondria y cloroplastos. En cambio, los transportadores de protones vacuolares asociados a pirofosfatasa se sobreexpresaron. Por otro lado, cuatro

transportadores de nitrato (NRT1) y uno de nitrito se vieron reprimidos. También encontramos transportadores de zinc, de boro, de hierro y un transportador de baja afinidad de sulfato, todos sobreexpresados. Se observó que un transcrito de la proteína f para canales iónicos de cloruro se reprimió, mientras que la proteína c se sobrepresó. Se observó un transportador de calcio de retículo endoplasmático asociado a ATPasa reprimido y un transcrito (SLAH3) también reprimido, similar a una proteína de membrana tipo SLAC1 con función estabilizadora de la homeostasis de iones a nivel celular.

También se observaron reprimidos transcritos implicados en el transporte de biomoléculas: azúcares tipo polioles lineales (monosacáridos de tres a seis carbonos), fosfoenolpiruvato, glucosa-6-fosfato, glicerol-3-fosfato o UDP galactosa-glucosa. Se encontraron tres transcritos muy reprimidos codificantes para uracil permeasas, y sobreexpresados tres para xantina-uracil-ascorbato permeasas y una adenina-guanina permeasa. También se reprimieron transcritos codificantes para el transporte de aminoácidos, dos del tipo transmembrana y otro de transporte acoplado a calcio de aminoácidos neutros. Y hubo sobreexpresión de un transportador de histidina, otro transportador transmembrana y una aminoácido permeasa. Hubo una sobreexpresión de tres transportadores de oligopéptidos. Hubo tres transportadores de folato reprimidos y dos transportadores sobreexpresados de cationes orgánicos como carnitina.

Por otro lado se distinguieron transcritos codificantes para aquaporinas, dos (PIP, TIP) resultaron reprimidos y otro sobreexpresado (NIP). Hubo dos transcritos reprimidos para proteínas de membrana secretoras transportadoras (SCAMP), que funcionan como portadores a la superficie celular vía reciclaje en Golgi y también se encontraron tres transcritos sobreexpresados similares a transportadores de sustrato mitocondriales.

3.2.8.2 Respuesta común al CO₂

Hubo 20 transcritos que cambiaron con el aumento del CO₂ tanto para G132 como para Graphic. Entre estos transcritos se encontraron seis que estaban sobreexpresados (30 %) y 14 subexpresados (70 %). Entre los sobreexpresados se contó un transcrito relacionado con el estrés por sequía o salinidad con mediación

de ABA (RESPONSIVE TO DESSICATION 22; RD22), otro relacionado con el transporte transmembranoso de cationes (ZINC TRANSPORTER 5 PRECURSOR; ZIP5) y un tercer transcrito identificado como RIBONUCLEASE T2 y con actividad que cataliza la división nucleotídica de 3'-fosfatos y 3-fosfo oligonucleótidos como parte de un proceso que degrada ARNr para reciclar sus componentes (Garcia-Segura *et al.*, 1986). Todos localizados dentro del sistema endomembranoso. Por otro lado, en los transcritos subexpresados encontrados se pudo anotar un transcrito con actividad tiopurin S-metiltransferasa (HARMLESS TO OZONE LAYER 3; HOL3), localizado en el cloroplasto y expresado en las células oclusivas. Otro transcrito perteneciente a la superfamilia de las UDP-glucosiltransferasas con función de transferencia de hexosas, similar a flavonol 3-O-glucosiltransferasa (3-GT) o antocianidin 3-O-glucosiltransferasa (BZ1) (Nakajima *et al.*, 2001). Otros dos transcritos, también reprimidos, para la proteína de aclimatación al frío similar a WCOR413, cuya expresión es inducida en respuesta a la aclimatación al frío, la privación de agua y al estímulo por ácido abscísico, localizada en la membrana plasmática.

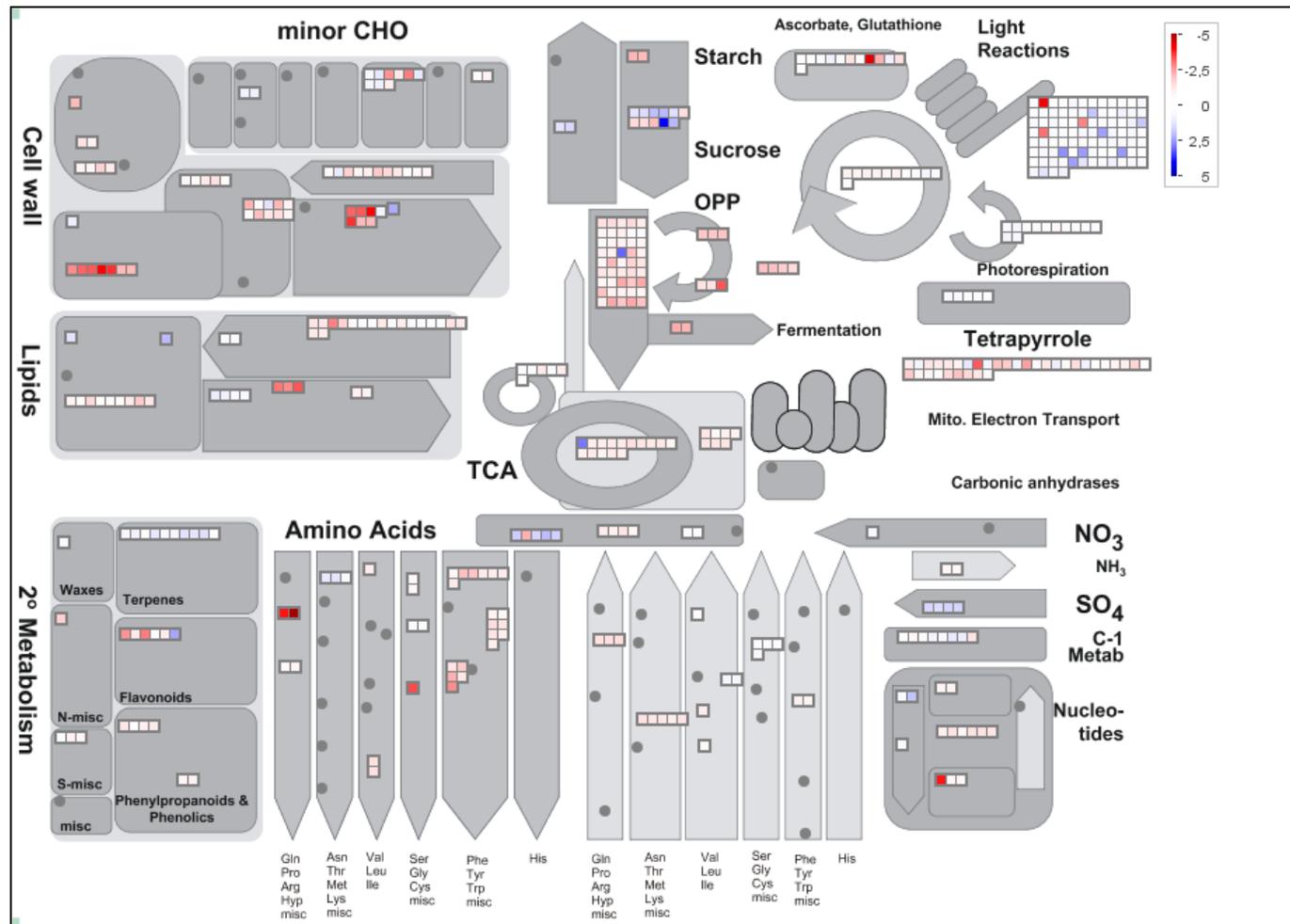


Figura. 3.26 Diferencias de expresión de genes involucrados en el metabolismo entre el mutante y Graphic cultivados en CO₂ ambiente.

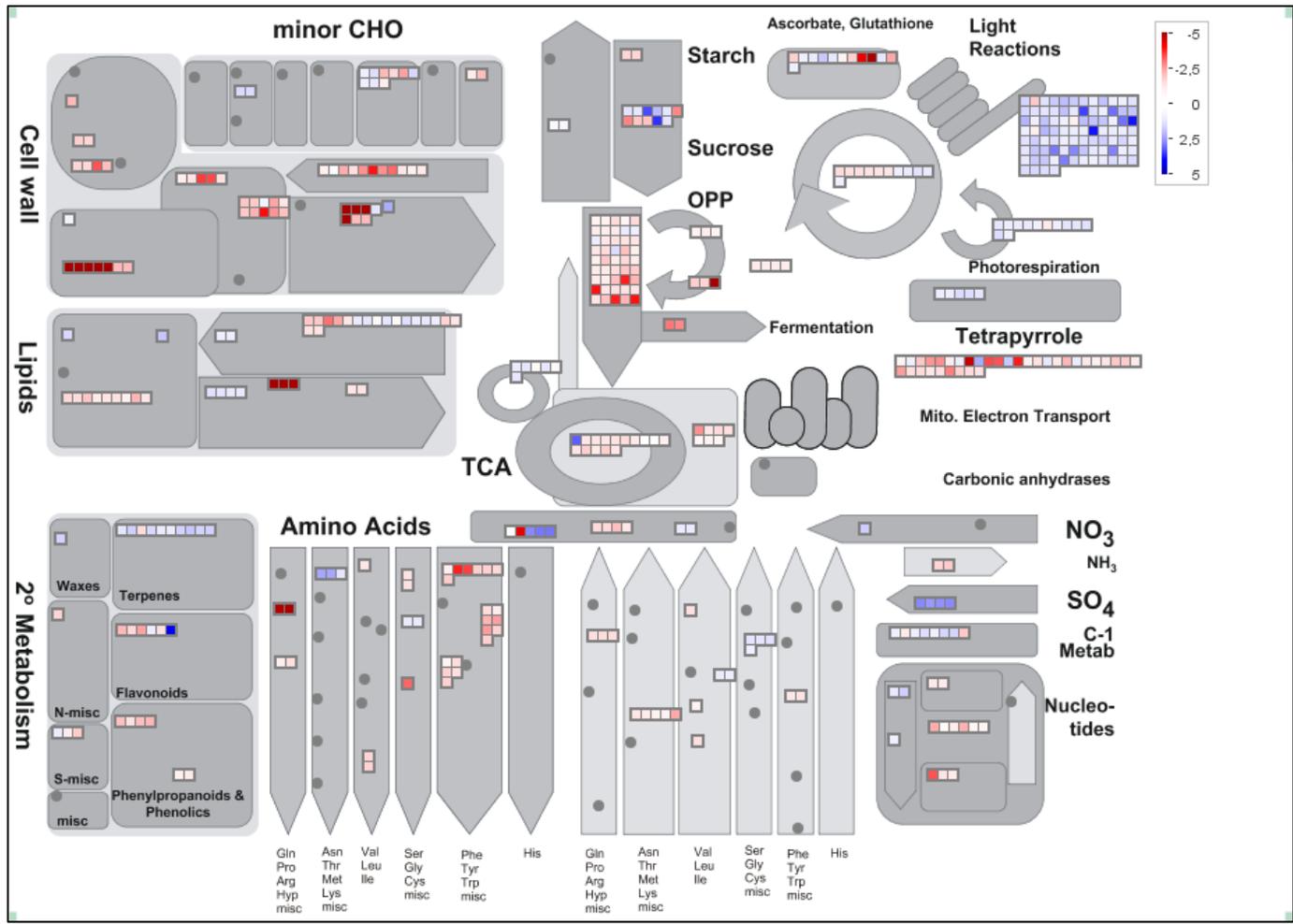


Figura 3.27. Diferencias de expresión de genes involucrados en el metabolismo entre el mutante y Graphic cultivados en CO₂ elevado.

3.2.8.3 Respuesta específica al CO₂

3.2.8.3.1 Respuesta de Graphic al CO₂

Se encontraron 149 transcritos que se expresaron diferencialmente en el genotipo silvestre en CO₂ elevado, sobreexpresados en su totalidad prácticamente (Apéndice A.1.2). Los grupos más numerosos en cuanto a cantidad de transcritos fueron aquellos relacionados con el estrés y la señalización.

En cuanto al metabolismo de carbohidratos se vieron dos aldosa epimerasas y una fructano 6 exohidrolasa sobreexpresadas. Atendiendo a la cadena transportadora de electrones se encontraron tres ferredoxinas cloroplásticas sobreexpresadas. En las rutas de metabolitos secundarios tipo fenilpropanoides hubo seis fenilalanina amonio liasas, una cumarato-CoA ligasa y una monoxigenasa tipo citocromo p450 sobreexpresadas. Esta última, por su homología con *Arabidopsis*, sabemos que se requiere para la transducción de señales fitocromo en luz roja y cuya mutación confiere superproducción de auxina.

Se encontraron ocho hexosiltransferasas (EC 2.4.1) sobreexpresadas como galacturonosil, glucuronosil o glucosil transferasas implicadas en la formación de pared celular, con implicación en el metabolismo de pectinas, hemicelulosa y xilanos respectivamente. También se sobreexpresaron otros transcritos relacionados con el metabolismo de auxinas, como la indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa (IAGLU), que es parte de un mecanismo de regulación para controlar los niveles de IAA a través de la captura y reutilización. Y se identificaron dos transcritos reprimidos, uno sin caracterizar y otro que afecta a la glucosilación de antocianinas (similar a cianidin 3-o-rutinósido 5-o-glucosiltransferasa). Se identificaron siete endoglucano-1,3-beta glucosidasa, cinco de ellas sobreexpresadas y anotadas como glucosil hidrolasas de la familia 17. Otras dos se reprimieron y una de ellas se anotó como liquenasa. Se anotaron tres fosfatasas ácidas púrpura que son metaloenzimas que hidrolizan ésteres fosfato y anhídridos en condiciones ácidas.

Se distinguieron cinco transcritos sobreexpresados para serina-treonina quinasas, una de ellas concretamente se anotó como STRUBBELIG-receptor 6 (SRF6). También se identificó un transcrito como transportador involucrado en los eventos de tráfico de membrana asociados a la formación de placa celular durante la citocinesis. Se une a algunas moléculas hidrofóbicas como fosfoinosítidos y promueve su transferencia entre los diferentes sitios celulares.

Involucrados en el mecanismo de defensa hubo veinte transcritos de proteínas relacionadas con patogénesis (PR1-5) y entre ellas se encontraron algunas del tipo taumatina, proteína básica de secreción (BSP), respuesta resistente a daño o incluso ocho quitinasas y un transcrito de respuesta a virus (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9). Ubicados dentro del estrés abiótico se encontraron quince transcritos para proteínas de choque térmico principalmente de tamaño pequeño (sHSP), 17.6 kDa (HSP17.6II), del tipo chaperona dnaJ (HSP40) y otras como proteínas de enlace en el lumen (HSP70). Se encontró también un grupo de tres oxalato oxidasas y trece germin proteínas, que poseen un dominio oxalato oxidasa conservado pero inactivo y probablemente confieren resistencia ante enfermedades de forma generalizada. De todos los transcritos anotados solamente dos estuvieron reprimidos. Uno de ellos fue una clp proteasa, fundamental en el desarrollo de cloroplastos y otro fue una ferredoxina tipo 3fe-4s.

Dentro de los procesos de señalización en la planta se observó una sobreexpresión de un gran número de receptores, además de transcritos de señalización de calcio. Se encontraron seis transcritos con repeticiones ricas en leucina similares al receptor quinasa de la subfamilia II (LRR-RLK II), identificados como SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1-3 (SERKs) que son esenciales para los primeros eventos de señalización por brasinoesteroides. Hubo nueve receptores quinasa del tipo herk (HERK) y feronia (FER), ambos necesarios para la elongación celular durante el crecimiento vegetativo y en su mayoría de una manera independiente de brasinoesteroides. Aparecieron seis receptores quinasa del tipo legumbre-lectina (LecRKs) que juegan un papel crucial durante el desarrollo y en la respuesta de adaptación a diversos estímulos. Son consideradas como candidatas ideales para la integridad de la pared celular. Se vieron cuatro receptores quinasa del tipo extensina ricos en prolina (PERK) que son un grupo heterogéneo de serina/ treonina proteína

quinasas que no tienen un compuesto de activación y su especificidad no ha sido analizada hasta la fecha. Hubo tres Calmodulinas (CAM) y una de unión a calcio con dominio de mano EF (CAM-like) sobreexpresadas. También sobreexpresadas hubo tres proteínas quinasa dependientes de calcio (CDPK) implicadas en la fosforilación de fenilalanina amonio liasa (PAL), una enzima clave en la defensa frente a patógenos y en la producción de compuestos fenólicos y flavonoides. Una peroxigenasa dependiente de calcio o caleosin relacionada con estrés abiótico y control estomático. Y una ATPasa transportadora de calcio de membrana plasmática. Por otro lado se encontraron únicamente reprimidas, dos proteínas con dominio IQ y que se cree que son un nuevo tipo de calmodulinas implicadas en la regulación de la expresión génica por señalización de calcio.

Como parte de la organización citoesquelética de la célula se observaron tres transcritos sobreexpresados codificantes para la cadena beta de tubulina.

Se distinguieron varios transcritos para transporte de azúcares. Hubo sobreexpresión de un co-transportador de sacarosa e hidrógeno, de un transportador de azúcares tipo polioles lineales (monosacáridos de tres a seis carbonos) y un transportador de nucleótido-azúcares. En contraste, se reprimieron dos transcritos transportadores cloroplásticos de fosfoenolpiruvato y fosfato. También se reprimieron dos transportadores mitocondriales de sustrato/soluto. Se identificaron sobreexpresados dos transportadores ABC que catalizan la transferencia a través de membrana de auxinas en la célula, dos transcritos para el flujo de auxina y dos transportadores transmembrana de medicamentos tipo MATE, así como un transportador xantina-uracilo-ascorbato (vitamina c). Además se encontró reprimido un transcrito anotado como proteína pleiotrópica de resistencia a medicamentos 2 (pleiotropic drug resistance protein 2). Dentro del transporte de iones se identificó un transportador lento de aniones (SLAH3) que se sobreexpresó, y se reprimió un transportador de iones metálicos tipo NRAMP2, posiblemente implicado en homeostasis de hierro.

3.2.8.3.2 Respuesta de G132 ante el CO₂

El mutante mostró represión de todos los transcritos expresados diferencialmente en CO₂ elevado (Apendice A.1.3). Así pues, asociados significativamente al CO₂

elevado se encontraron tres citoquinina glicosiltransferasas además de una acetil y otra glucosil transferasa, dos transcritos para un receptor serina/treonina fitosulfoquina, y una dehidrina (proteína de shock por frío).

3.2.9. Abundancia de ARNm

En el segundo experimento de cámara de crecimiento se analizó mediante PCR cuantitativa la abundancia de los transcritos descritos en el apartado 3.1.9.1. Esto se llevó a cabo en plantas expuestas al CO₂ elevado durante más tiempo que las analizadas con el microarray en el primer experimento. Los datos mostraron grandes semejanzas con los obtenidos de los experimentos de invernadero para hojas de la misma edad (Tabla 3.8) y los datos transcriptómicos del microarray (ver apdo. 3.2.8). Así pues, en G132 comparado con Graphic se encontró mayor cantidad de un transcrito del complejo de captación de la luz (aunque otro mostró menor abundancia) y de las proteínas psbP y psbR del PSII, así como para las proteínas psaA y psaB del PSI, y la subunidad pequeña (rbcS) de Rubisco (Tabla 3.19); la mayor abundancia de transcrito para la subunidad grande (rbcL) de Rubisco no alcanzó significación estadística. Por otro lado, los genes para la proteína psbQ y la protoclorofilida reductasa A se reprimieron en el mutante, el último significativamente en CO₂ elevado, pero no en ambiente. Un transcrito de la síntesis (1-SST) de fructanos y el de la oxidasa alternativa 1A mitocondrial disminuyeron en G132 respecto a Graphic y también lo hicieron transcritos implicados en la modificación de la pared celular (xiloglucano endotransglicosilasa) y la degradación de lípidos (glicerofosfodiéster fosfodiesterasa); de estos cuatro transcritos, los tres primeros disminuyeron en el mutante en mayor medida en CO₂ elevado que en CO₂ ambiente. Hubo sobreexpresión de los transcritos para la subunidad alfa de la ARN polimerasa plastídica y para las proteínas ribosómicas S3 y L6 (subunidades 30S y 50Ss, respectivamente) del cloroplasto. Por el contrario, los niveles de transcritos relacionados con el mantenimiento de la estructura de la cromatina disminuyeron fuertemente en G132. Por último, se identificó una gran represión de la nitrato reductasa y del canal iónico SLAH3, implicado en la respuesta estomática.

Por otro lado, se obtuvieron datos relevantes al analizar la abundancia relativa de transcritos en CO₂ elevado con respecto a CO₂ ambiente. Se observó una disminución de los transcritos del complejo de captación de luz y la proteína psbP del PSII, y de la subunidad pequeña de la enzima Rubisco, mientras que la disminución para su subunidad grande no fue estadísticamente significativa. Del mismo modo, el CO₂ elevado disminuyó la expresión génica para xiloglucano endotransglicosilasa (solo en G132), para glicerofosfodiéster fosfodiésterasa y para una proteína de transferencia de lípidos a través de membrana. En contraste, el CO₂ elevado indujo un aumento de transcrito de la síntesis de fructanos (1-SST), solo en Graphic, y un aumento de la nitrato reductasa significativamente mayor en G132 que en Graphic. Condujo también a una represión de los transcritos para la subunidad alfa de la ARN polimerasa plastídica y para las proteínas ribosómicas S3 y L6 (subunidades 30S y 50Ss, respectivamente) del cloroplasto, solamente en G132. La abundancia de transcrito para una proteína rica en leucina, implicada en degradación de proteínas, disminuyó en G132 y tendió a aumentar en Graphic con el crecimiento en CO₂ elevado. Este factor disminuyó en el mutante, pero no en el genotipo silvestre, la cantidad de transcrito para una treonina-proteína quinasa similar a HT1, involucrada en la ruta de señalización del CO₂ en las células oclusivas de los estomas.

Tabla 3.19. Nivel de expresión génica en CO₂ ambiente y elevado. La hoja más joven completamente extendida de la cebada Graphic y su mutante G132, cuando la hoja era la 3 (G132)- 4 (Graphic) (fase 13-14 Zadoks), estando Graphic más avanzado en el crecimiento. Con un mapa de calor, los números indican el cambio de expresión (razón de logaritmos en base 2) entre condiciones de cultivo (CO₂ ambiente como referencia), entre genotipos (Graphic como referencia) y en la interacción genotipo x CO₂ (cultivo en CO₂ ambiente de Graphic como referencia). Las categorías funcionales se anotaron con Mercator. P, probabilidad en el análisis de la varianza para los efectos del genotipo, el CO₂ y la interacción de ambos; los números en negrita representan efectos significativos (n=3; P<0.05).



Nombre	Descripción	Genotipo		CO ₂		Interacción		P		
		G132/ GRA	E/A	AG132/ AGRA	AGRA/ AGRA	EG132/ AGRA	EGRA/ AGR	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
PS.lightreaction.photosystem II LHC-II	LHCII	-1.09	-0.65	-0.79	0.00	-2.01	-0.40	<.001	0.006	0.621
PS.lightreaction.photosystem II LHC-II	LHCII	1.45	-0.54	1.67	0.00	0.98	-0.16	<.001	0.029	0.061
PS.lightreaction.photosystem II PSII polypeptide	psbR	1.58	-0.19	2.00	0.00	1.60	0.43	<.001	0.578	0.25
PS.lightreaction.photosystem II PSII polypeptide	psbQ	-1.41	0.25	-0.99	0.00	-1.34	0.48	<.001	0.308	0.087
PS.lightreaction.photosystem II PSII polypeptide	psbP	0.98	-0.37	0.74	0.00	0.56	-0.75	<.001	<.001	0.13
PS.lightreaction.photosystem I PSI polypeptide	psaA	1.91	0.23	1.57	0.00	1.94	-0.32	<.001	0.477	0.267
PS.lightreaction.photosystem I PSI polypeptide	psaB	2.07	0.26	1.73	0.00	2.12	-0.29	0.001	0.546	0.393
PS.calvin cycle.rubisco large subunit	rbcL	0.46	-0.17	0.31	0.00	0.28	-0.36	0.199	0.624	0.704
PS.calvin cycle.rubisco small subunit	rbcS	0.36	-0.25	0.44	0.00	0.11	-0.15	0.01	0.052	0.321
major CHO metabolism	FEH	-0.42	0.44	-0.51	0.00	0.00	0.37	0.389	0.377	0.991
major CHO metabolism	6-SFT	-0.13	-0.06	-0.17	0.00	-0.18	-0.10	0.672	0.839	0.87
major CHO metabolism	1-SST	-4.73	2.26	-3.54	0.00	-2.81	2.33	<.001	0.008	0.01
mitochondrial electron transport	Alternative oxidase 1A	-2.79	1.83	-0.79	0.00	-1.65	2.39	0.018	0.063	0.039
cell wall.modification	Xyloglucan endotransglycosylase	-1.31	-0.68	-0.65	0.00	-2.96	-0.16	<.001	0.005	0.044



Nombre	Descripción	Genotipo		CO ₂				Interacción			P		
		G132/ GRA	E/A	AG132/ AGRA	AGRA/ AGRA	EG132/ AGRA	EGRA/ AGR	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂			
lipid degradation.lysophospholipases	glycerophosphodiester phosphodiesterase	-1.52	-0.57	-1.24	0.00	-2.38	-0.38	<.001	<.001	0.994			
N-metabolism.nitrate metabolism.NR	Nitrate reductase [NADH]	-6.74	1.77	-7.83	0.00	-4.77	1.76	<.001	<.001	0.001			
tetrapyrrole synthesis	Protochlorophyllide reductase A	-0.63	0.12	-0.22	0.00	-0.60	0.44	0.004	0.523	0.035			
misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	cell wall constituent	-0.19	-2.79	-0.34	0.00	-2.58	-3.44	0.536	<.001	0.186			
RNA.transcription	plastid RNA polymerase alpha subunit	2.06	-0.57	2.46	0.00	1.70	0.15	<.001	0.047	0.031			
DNA.synthesis/chromatin structure	DNA-dependent ATPase	-1.80	0.23	-1.91	0.00	-1.53	0.19	<.001	0.478	0.854			
DNA.synthesis/chromatin structure.histone	histone H3	-2.67	-0.10	-2.28	0.00	-3.20	0.02	<.001	0.741	0.664			
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit	ribosomal protein S3 (chloroplast)	1.91	-0.57	2.29	0.00	1.53	0.11	<.001	0.041	0.031			
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.50S subunit	ribosomal protein L16 (chloroplast)	2.36	-0.57	2.68	0.00	1.99	0.01	<.001	0.01	0.01			
protein.postranslational modification	threonine-protein kinase ht1-like	0.32	-0.61	0.60	0.00	-0.33	-0.22	0.06	0.002	0.022			
protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	leucine-rich repeat family protein	0.04	-0.15	0.46	0.00	-0.13	0.30	0.766	0.26	0.004			
transport.metabolite transporters	SLAH3 C4-dicarboxylate transporter	-3.11	0.01	-2.69	0.00	-3.54	0.11	<.001	0.961	0.477			

3.2.10. Anatomía foliar y crecimiento

En el segundo experimento en cámaras de crecimiento, la superficie verde, el volumen, el grosor, el peso fresco y el peso seco de la última hoja completamente extendida fueron menores en G132 que en Graphic (Tabla 3.20). Por el contrario, el contenido hídrico (% en peso fresco) de G132 fue mayor que el de Graphic. El CO₂ elevado disminuyó ligeramente el área y el contenido hídrico de la hoja, pero el efecto sobre el área no alcanzó significación estadística. También los pesos fresco y seco por unidad de superficie y de volumen fueron menores en G132. Esto indicó que sus hojas tuvieron menos densidad. La cantidad de agua por unidad de superficie fue menor en G132 que en Graphic, pero por unidad de volumen no hubo diferencias en la cantidad de agua entre genotipos, debido al menor grosor de las hojas de G132. Los pesos fresco y seco por unidad de superficie, el peso seco por unidad de volumen y la cantidad de agua por unidad de superficie fueron mayores en plantas crecidas en CO₂ elevado que en CO₂ ambiente en los dos genotipos.

Tabla 3.20. Parámetros de la anatomía foliar en CO₂ ambiente y elevado. Medidas de la tercera hoja de la cebada Graphic y su mutante G132 cultivados en CO₂ ambiente (390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en el segundo experimento en cámaras de crecimiento. Se muestran el área verde ($\text{cm}^2 \text{ hoja}^{-1}$), volumen ($\text{cm}^3 \text{ hoja}^{-1}$), grosor (mm hoja^{-1}), peso fresco (PF; g hoja^{-1}), peso seco (PS; mg hoja^{-1}), contenido hídrico (% de agua en el peso fresco), peso fresco por área (mg cm^{-2}), peso seco por área (mg cm^{-2}), peso seco por área de los compuestos no determinados mediante análisis ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$), contenido hídrico por área (mg cm^{-2}), peso fresco por volumen (g cm^{-3}), peso seco por volumen (g cm^{-3}) y contenido hídrico por volumen (g cm^{-3}). mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan diferencias significativas ($n=5$; $P<0.05$).

Base de expresión	Parámetro	CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Hoja	Area verde	13.0	21.4	12.6	19.0	1.49	1.49	2.11
	Volumen	0.43	0.81	0.45	0.76	0.056	0.056	0.079
	Grosor	0.34	0.38	0.36	0.40	0.030	0.030	0.042
	PF	0.34	0.66	0.36	0.65	0.046	0.046	0.065
	PS	29.2	81.4	33.5	86.7	0.072	0.072	0.101
	Cont. hídrico	91.3	87.6	90.8	86.6	0.47	0.47	0.66
Área	PF	25.9	30.8	28.7	34.0	1.61	1.61	2.27
	PS	2.26	3.81	2.65	4.55	0.229	0.229	0.324
	PS otros compuestos	1.59	2.02	1.72	2.11	0.006	0.419	0.888
	Cont. hídrico	23.7	27.0	26.1	29.4	1.44	1.44	2.03

Resultados

Base de expresión	Parámetro	CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Volumen	PF	0.77	0.82	0.80	0.85	0.040	0.040	0.056
	PS	0.067	0.101	0.074	0.114	0.0064	0.0064	0.0090
	Cont. hídrico	0.71	0.72	0.72	0.74	0.035	0.035	0.049

A excepción del porcentaje de agua en diferentes fracciones de la planta, que fue mayor en el mutante, G132 mostró valores menores que Graphic en área, peso fresco y peso seco (Tabla 3.21). El CO₂ elevado de crecimiento aumentó el área verde del mutante G132, excepto la hoja recientemente extendida (tercera hoja) que no cambió. En el caso de Graphic el área disminuyó para la tercera hoja y para el tallo principal, mientras que para el resto de la planta y para el sumatorio de las partes no hubo cambios significativos. El peso fresco en G132 aumentó significativamente con el CO₂ elevado, mientras que en Graphic se mantuvo con valores similares, excepto el de la tercera hoja que tendió a disminuir. En el caso del peso seco, el CO₂ influyó positivamente en todas las partes de la planta cuantificadas. El mutante G132 no mostro cambios con el CO₂ elevado en su porcentaje de agua, a excepción de la tercera hoja, en la que fue menor con este CO₂. Graphic disminuyó su contenido hídrico con el CO₂ elevado en la tercera hoja, el tallo principal, así como de forma global.

Tabla 3.21. Parámetros de crecimiento en CO₂ ambiente y elevado. Parametros de la hoja recientemente extendida (tercera hoja), el tallo principal, el resto de la planta excluyendo las dospartes anteriores y el sumatorio de estas tres partes de la cebada Graphic y su mutante G132 cultivados en CO₂ ambiente (390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) en el segundo experimento en cámaras de crecimiento. Se muestran el área verde ($\text{cm}^2 \cdot \text{planta}^{-1}$), peso fresco ($\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$), peso seco ($\text{mg} \cdot \text{planta}^{-1}$) y contenido hídrico (% de agua en el peso fresco). mds, mínima diferencia significativa. Los números en negrita representan diferencias significativas ($n=5$; $P < 0.05$).

		CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Area verde	Hoja 3	12.9	20.4	12.6	17.7	0.81	0.81	1.15
	Tallo ppal.	33.7	62.2	40.9	55.2	2.46	2.46	3.47
	Resto planta	7.5	49.3	19.8	50.1	6.66	6.66	9.42
	Total	54.1	131.9	73.3	123.1	8.99	8.99	12.72
Peso fresco	Hoja 3	0.33	0.64	0.37	0.62	0.023	0.023	0.032
	Tallo ppal.	0.67	1.63	1.00	1.68	0.082	0.082	0.116
	Resto planta	0.24	1.82	0.69	2.04	0.235	0.235	0.333
	Total	1.24	4.09	2.06	4.33	0.296	0.296	0.419

		CO ₂ Ambiente		CO ₂ Elevado		mds		
		G132	Graphic	G132	Graphic	Gtpo	CO ₂	G x CO ₂
Peso seco	Hoja 3	29.5	86.1	35.5	90.9	3.25	3.25	4.60
	Tallo ppal.	59.1	180.1	86.9	204.6	7.79	7.79	11.01
	Resto planta	19.3	183.0	55.6	216.1	23.25	23.25	32.89
	Total	107.9	449.3	177.9	511.6	29.31	29.31	41.45
Cont. Hídrico	Hoja 3	91.0	86.6	90.5	85.3	0.31	0.31	0.43
	Tallo ppal.	91.2	88.9	91.3	87.8	0.32	0.32	0.45
	Resto planta	91.8	89.9	91.9	89.4	0.67	0.67	0.94
	Total	91.3	89.0	91.4	88.2	0.37	0.37	0.53

4. DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del mutante G132

4.1.1. Eficiencia cuántica del mutante G132

La fuerte disminución de la fotosíntesis en el mutante G132 comparado con Graphic se asoció con inhibición de la eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica del PSII (Tablas 3.2 y 3.11). Esta inhibición estuvo acompañada de valores notablemente altos de F_o y contenidos disminuidos de clorofila (Figs. 3.8 y 3.19), especialmente en las hojas más jóvenes. Un F_o alto puede deberse simplemente al contenido reducido de clorofila (Barbagallo *et al.*, 2003), pero también a centros del PSII inactivos (Ifuku *et al.*, 2005). El análisis de la abundancia de transcritos mostró la represión de la expresión génica para un importador de protoclorofilida reductasa A al cloroplasto en la primera hoja (Apéndice A.1.1) y una represión para protoclorofilida reductasa A (Tablas 3.8, 3.9 y 3.19) en las siguientes fases. Su deficiencia podría limitar la síntesis de clorofila (Papenbrock and Grimm, 2001) directamente, o indirectamente al inhibir la formación de aminolevulinato a través de una acumulación de protoclorofilida (La Rocca *et al.*, 2001). La baja razón clorofila a: clorofila b en plantas jóvenes de G132 (fase de crecimiento 13-14) podría deberse a un aumento de la razón PSII: PSI (Rott *et al.*, 2011), aunque también podría mostrar un agotamiento de los centros de reacción del PSII con relación a los complejos de captura de la luz (Habash *et al.*, 1995). La mayor abundancia en G132 de transcritos para LHCII (Tablas 3.8, 3.9, 3.19 y supplemental data), junto con una disminución respecto al genotipo silvestre notablemente mayor de la proteína D1 que de la LHCII (Tabla 3.18), podría sustentar la segunda posibilidad. La estimulación de la expresión génica para LHCII contrasta con el hallazgo de que la acumulación de protoclorofilida inhibe la transcripción de genes nucleares como LHCB2 y RBCS (Khandal *et al.*, 2009). La comparación entre hojas y fases de crecimiento de la planta indica que la deficiencia de G132 en clorofila, y posiblemente también en centros de reacción del PSII (razón clorofila a: clorofila b), se atenuó con el progreso del desarrollo, a pesar de lo cual F_v/F_m continuó siendo inferior con respecto a Graphic.

En la fase 12 los resultados del microarray mostraron en G132 mayor abundancia de transcritos para *psbR*, que se ha mostrado que juega un papel en el ensamblaje en el núcleo del PSII de las proteínas *psbP* y *psbQ* del complejo de liberación de O_2 (Suorsa *et al.*, 2006). Lo mismo ocurrió en la fase 13-14 de plantas cultivadas en cámara de crecimiento (Tabla 3.19) y en la fase 15-17 de plantas en invernadero (Tabla 3.9). En contraste, la expresión génica para *psbR* disminuyó en G132 respecto a Graphic en la fase 13-14 de las plantas que crecieron en invernadero (Tabla 3.8). Además, se encontró un aumento de la abundancia de transcritos para la proteína *psbQ* y *psbP* en G132 con respecto a Graphic en la fase 12. Por el contrario, los resultados de la qPCR en las dos fases de crecimiento siguientes mostraron que la abundancia de transcrito para la proteína *psbQ* disminuyó en G132. *In vitro*, las proteínas *psbP* y *psbQ* parecen modular el requerimiento de calcio y cloruro para una producción eficiente de oxígeno (Yi *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque *psbQ* se requiere en condiciones de luz baja (Yi *et al.*, 2006), se ha encontrado que no es esencial para la regulación y estabilización del PSII en condiciones normales de crecimiento (Ifuku *et al.*, 2005). Por otra parte, *psbQ* puede desempeñar un papel en el apilamiento de los grana (Dekker and Boekema, 2005) y su deficiencia, junto con el menor contenido de proteínas de membrana en G132 (Tablas 3.6 y 3.17), puede indicar menor abundancia y organización alterada de las membranas tilacoidales en plantas de más edad. Estos cambios pueden contribuir a la disminución de F_v/F_m en el mutante.

Bajo iluminación, la inferior F_q'/F_m' de G132 (Tablas 3.2 y 3.11) no se debió generalmente a reducción de la fracción de centros abiertos del PSII (q_L), sino a menor eficiencia cuántica máxima en la luz (Φ_{qL}) y disipación incrementada de energía de excitación mediante procesos no fotoquímicos, como indica el aumento de Φ_{NPQ} (Baker *et al.*, 2007; Murchie *et al.*, 2009). La reducción de la eficiencia cuántica en la luz se relacionó con los bajos contenidos de componentes del aparato fotosintético (particularmente D1 y *cytb6*; Tabla 3.18) encontrados en G132. En la fase 13-14 de crecimiento, el aumento de F_q'/F_m' en hojas de más edad respecto a la más joven de G132 se asoció también con disminuciones de Φ_{NPQ} . En contraste, en la fase 15-17 de crecimiento no hubo mejoras de asimilación de CO_2 y F_q'/F_m' ni tampoco disminución de Φ_{NPQ} desde

la hoja más joven a las más viejas de ningún genotipo. El envejecimiento foliar disminuyó la fracción de centros abiertos del PSII (qL decreciente) mientras que Fq'/Fm' y Φ_{NPQ} permanecieron casi constantes, implicando que aumentó la eficiencia cuántica de los centros abiertos (Φ_{qL}), de acuerdo con observaciones anteriores (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 1997). Posiblemente, el PSII se reorganiza, aumentando la razón complejo de captura de luz/centro de reacción (Giardi *et al.*, 1996). Globalmente, las diferencias entre genotipos y hojas sucesivas en Fq'/Fm' y Φ_{NPQ} parecieron asociadas con cambios en el uso de productos del transporte fotosintético de electrones en la asimilación de CO_2 . En contraste, en otros estudios los cambios en la capacidad de utilización de los productos del transporte de electrones afectaron al estado redox de Q_A , y por tanto a qL , más que a la eficiencia cuántica de los centros oxidados del PSII, que depende de Φ_{NPQ} (Baker *et al.*, 2007; Habash *et al.*, 1995; Hymus *et al.*, 1999).

4.1.2. Capacidad de carboxilación y contenidos de compuestos

nitrogenados del mutante G132

El hecho de que la Rubisco limitara la fotosíntesis en G132 hasta concentraciones muy altas de CO_2 en el aire (apdo. 3.1.3 y Figs. 3.13 y 3.14) indica que la capacidad de carboxilación, más que la capacidad de transporte fotosintético de electrones, restringió fuertemente la asimilación de CO_2 . Las reducciones en G132 respecto a Graphic de V_{cmax} (Tablas 3.3 y 3.12) y de la actividad Rubisco *in vitro* (Figuras 3.11 y 3.22) se debieron al descenso de la cantidad de proteína Rubisco (Tablas 3.6 y 3.17). La inspección de las disminuciones respecto a Graphic de las diferentes proteínas analizadas (Tablas 3.6 y 3.17) indica que, dentro de las proteínas solubles, el descenso de Rubisco fue selectivo. Las estimaciones directas de las velocidades de síntesis y degradación de Rubisco no estaban en el punto de mira de este trabajo. No obstante, se sabe que la síntesis de Rubisco termina alrededor del tiempo de máxima expansión foliar, mientras que la degradación continúa durante la senescencia (Suzuki *et al.*, 2001). O la disponibilidad de nitrógeno (Imai *et al.*, 2008; Imai *et al.*, 2005), o la regulación de la transcripción (Irving and Robinson, 2006; Suzuki *et al.*, 2001) pueden ser el principal determinante de la velocidad de biosíntesis de Rubisco.

El similar o mayor contenido de nitrato, pero menor contenido de aminoácidos en G132 que Graphic (Fig. 3.9, Tabla 3.16) podría sugerir una inhibición de la asimilación de nitrógeno y la síntesis de proteína en el paso de reducción de nitrato. De hecho, G132 tuvo menos actividad Nitrato Reductasa que Graphic en la fase de crecimiento 13-14 (Figs. 3.12 y 3.23) y, en cultivo en cámara de crecimiento, menos abundancia de transcrito para la enzima. Sin embargo, ocurrió lo contrario en la fase 15-17, cuando el nivel de transcrito para Nitrato Reductasa aumentó también fuertemente en el mutante. Más aún, una actividad Nitrato Reductasa limitada no explicaría la disminución preferencial de Rubisco, que se debería por tanto a alguna otra causa. De acuerdo con esta proposición, en mutantes de tabaco con un número reducido de copias funcionales de genes para Nitrato Reductasa, la actividad de esta enzima disminuyó, pero la actividad Rubisco no fue significativamente diferente de la del tipo silvestre (Scheible *et al.*, 1997). Notablemente, y con mayor o menor significación dependiendo del experimento y fase de crecimiento, la abundancia de transcritos para las subunidades de Rubisco fue mayor en G132 que en Graphic (Tabla 3.8, 3.9 y 3.19), lo que implica que el bajo contenido de esta enzima no es atribuible a reducciones de su expresión génica. Además, en la fase 12 se observaron varios transcritos necesarios para la acumulación de Rubisco, tipo NARA5 (Ogawa *et al.*, 2009), sobreexpresados en G132, y también transcritos correspondientes a las proteínas ribosomales del cloroplasto del tipo 30S (S3, S11, S30A) y 50S (L2, L12, L16, L22, L28), mientras que las proteínas ribosomales (no procarióticas) del tipo 40S (S8, S9, S19, S26, S27, S3A) y 60S (L9, L24, L28, L34, L13A, L37A) se reprimieron. La mejora en G132 de la expresión génica para Rubisco fue acompañada de niveles de transcritos ribosómicos plastidiales (proteínas S3 y L16) mayores en la fase de crecimiento 13-14, pero menores en la fase 15-17 (Tablas 3.8, 3.9 y 3.19). Paralelamente, los niveles de transcritos implicados en la estructura de la cromatina (ATPasa dependiente de ADN e histona H3) fueron menores en G132. La síntesis de proteína en el cloroplasto puede variar notablemente mientras que los niveles de ARNm permanecen estables, indicando que el procesado, edición y estabilidad del ARNm y la iniciación de la traducción juegan un papel principal en la regulación (Yamaguchi and Subramanian, 2003) Así, aunque el bajo contenido de Rubisco en G132 podría depender, al menos en

parte, de su síntesis, claramente no estuvo relacionado con restricciones en la expresión génica.

Significativamente, G132 tuvo mayor contenido que Graphic de un fragmento de 33 kDa que reaccionó con el anticuerpo contra la subunidad grande de Rubisco (Figs. 3.10 y 3.20). Se han descrito fragmentos de diferentes tamaños de esta subunidad, entre los que se encuentra un polipéptido de 36 o 37 kDa (Ishida *et al.*, 1997; Kokubun *et al.*, 2002), que son productos de degradación de la enzima. Las condiciones oxidantes estimulan la degradación de Rubisco, en la que está involucrada la oxidación de residuos cisteína (Marcus *et al.*, 2003), cisteína proteasas (Prins *et al.*, 2008) y peptidasas (Feller *et al.*, 2008). La mayor abundancia de transcritos de cisteína proteasas y la represión de un inhibidor de estas proteasas en la primera hoja de G132 (Apéndice A.1.1), podrían estimular la degradación de Rubisco. Los resultados indican que un aumento de la degradación de la proteína explica en buena medida el bajo contenido de Rubisco de G132. Con el progreso del desarrollo foliar aumentó el contenido de Rubisco de G132 en la fase 13-14 (compárese la hoja b con la hoja a, Tabla 3.6), y no en la 15-17, pero en ningún caso alcanzó el mutante el contenido de Rubisco de Graphic. Las diferencias entre hojas de G132 en contenido de Rubisco en la fase 13-14 no se debieron a variaciones en la abundancia del fragmento de degradación de Rubisco, ni de transcritos para sus dos subunidades. En contraste, el descenso con la edad de la hoja en el contenido de Rubisco de Graphic en ambas fases de crecimiento se relacionó con disminución de transcritos, especialmente de la subunidad pequeña de Rubisco en la fase 15-17, y con un contenido creciente del polipéptido de 33 kDa. Este resultado es coherente con los de Suzuki *et al.* (2001), que concluyeron que la degradación de Rubisco en el arroz es el determinante principal de la cantidad de Rubisco en hojas senescentes. En la fase 15-17, los contenidos de Rubisco y otras proteínas fueron similares en hojas de diferente edad de G132, lo que contrastó con la disminución de esos contenidos en las hojas de más edad de Graphic. Esta diferencia entre genotipos sugiere un retraso de la senescencia en el mutante.

4.1.3. Movimientos estomáticos del mutante G132

La elevada conductancia estomática de G132 (Tablas 3.3 y 3.12) implica que la fotosíntesis no estuvo restringida por la difusión del CO₂ al interior de las hojas. La baja fotosíntesis de G132 comparada con Graphic se asoció con incrementos en C_i (Figs. 3.5 y 3.17), que debieran producir un descenso de g_s (Mott, 1988). El mayor g_s del mutante (Figs. 3.6 y 3.18) contradujo esta suposición. La igual o mayor conductancia normalizada a la densidad estomática en el mutante respecto a Graphic, descarta la posibilidad de que g_s fuera mayor en G132 debido a un mayor número de estomas (Figs. 3.3 y 3.15) con menor apertura. Con CO₂ de crecimiento ambiental, más que elevado (von Caemmerer *et al.*, 2004), y con las intensidades de luz propias de experimentos de invernadero y cámaras de ambiente controlado, en lugar de luz tenue (Baroli *et al.*, 2008), las hojas de G132 en diferentes estadios de desarrollo de la planta tuvieron menor magnitud y velocidad de cierre estomático en respuesta al incremento de CO₂ atmosférico que el genotipo silvestre (Figs. 3.6 y 3.18). De estos resultados se puede concluir que el mutante G132, con fotosíntesis reducida, tuvo una menor sensibilidad al CO₂ alto. La velocidad de la respuesta estomática a señales ambientales es importante para identificar mecanismos reguladores (Merilo *et al.*, 2013) y maximizar la toma de CO₂ (Lawson and Blatt, 2014). Se ha valorado la respuesta temporal de g_s al CO₂ mediante la selección y comparación estadística de curvas con mejor ajuste, y se han derivado las velocidades para cada genotipo desde el comienzo del cambio en el CO₂ hasta el estado estable final. Este procedimiento puede ser preferible a determinar solo las velocidades máximas (Merilo *et al.*, 2013) o la velocidad de respuesta lineal tras una primera fase (von Caemmerer *et al.*, 2004).

Algunos estudios previos sugieren que la respuesta a los cambios ambientales es más rápida en estomas pequeños que en estomas grandes (Drake *et al.*, 2013; Lawson and Blatt, 2014). Lo contrario sucedió con G132, que con estomas más pequeños que Graphic, muestra que los factores funcionales pueden tener una mayor influencia en los movimientos de las células oclusivas que las características anatómicas. Como los estomas de G132, los de las plantas transgénicas con deficiencias en varios de los pasos del proceso fotosintético

mantienen una conductancia normal, en vez de reducida (Baroli *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 2008; Quick *et al.*, 1991). Sin embargo, la magnitud y la tasa de apertura estomática en respuesta a luz roja – que tiene un espectro de acción similar al de la fotosíntesis y al espectro de absorción de la clorofila (Mott, 2009) – no se afectó en plantas con reducciones antisentido del complejo citocromo b_6f y Rubisco (Baroli *et al.*, 2008). Estos resultados llevaron a la conclusión de que g_s no está determinada directamente por la capacidad fotosintética o el transporte cloroplástico de electrones en las células oclusivas o el mesófilo. Por otro lado, la reducida sensibilidad estomática al incremento de CO_2 observada en G132 también se ha encontrado, aunque en pequeña medida, en mutantes de tabaco antisentido para sedoheptulosa bisfosfatasa (SBPasa), que podrían tener niveles altos de productos de transporte cloroplástico de electrones tales como ATP (Lawson *et al.*, 2008). El alto rendimiento de la extinción no fotoquímica en el mutante (Tablas 3.2 y 3.11) pudo deberse a un incremento del gradiente de protones en los tilacoides, causado por un bajo consumo de los productos del transporte electrónico por una baja tasa de asimilación de carbono. Esto conduciría a una acumulación de ATP y NADPH. Nuestros resultados experimentales indican que la concentración de ATP en las hojas iluminadas completas, y muy probablemente en los cloroplastos (Stitt *et al.*, 1982), fue mayor en G132 que en Graphic (Tabla 3.16). Además, la respuesta fotosíntesis- C_i de G132 (apdo. 3.1.3 y Figs. 3.13 y 3.14) estuvo limitada por la Rubisco hasta muy altas concentraciones de CO_2 , al igual que en las plantas transgénicas de tabaco antisentido para la subunidad pequeña de Rubisco (Hudson *et al.*, 1992). Este resultado muestra claramente un mayor balance entre las capacidades de transporte electrónico y de fijación de carbono. Por lo tanto, la respuesta de g_s al CO_2 del mutante G132 es coherente con el modelo de funcionamiento de los estomas de Farquhar y Wong (1984). Dicho modelo relaciona la mayor conductancia y menor sensibilidad al CO_2 de los estomas con el balance entre producción y consumo de los productos utilizados en la asimilación de carbono, como el ATP (Buckley *et al.*, 2003; Farquhar and Wong, 1984; Jarvis and Davies, 1998; Messinger *et al.*, 2006). Esta respuesta es también coherente con el papel positivo en g_s de la reducción de la plastoquinona y de los transportadores de electrones aguas arriba (Busch, 2014). Unos niveles altos de productos del transporte fotosintético de electrónico, como el ATP, podrían promover la

apertura estomática (Tominaga *et al.*, 2001). Alternativamente, un incremento en estos productos, o una reducción de la cadena de transporte de electrones, podría desencadenar un mecanismo de señalización, lo que podría modificar los niveles de un ion gaseoso producido en el mesófilo que podría llegar a las células oclusivas (Mott *et al.*, 2014). Aunque las respuestas a corto plazo (curvas estándar de fotosíntesis- CO_2) de g_s a disminuciones de CO_2 también parecieron generalmente menores en G132 que en Graphic (Figs. 3.4 y 3.16), no hubo prácticamente ninguna respuesta de apertura estomática a largo plazo con bajas concentraciones de CO_2 en nuestros experimentos (datos no mostrados). Los modelos y los datos experimentales (Buckley *et al.*, 2003; Farquhar and Wong, 1984; Messinger *et al.*, 2006) demuestran que cuando la carboxilación está limitada por Rubisco y hay exceso en la capacidad de transporte electrónico, como se produce con bajas concentraciones de CO_2 y alta irradiancia, g_s es casi insensible al CO_2 .

Otra línea de evidencia que muestra que la fotosíntesis media en la respuesta estomática al CO_2 , es el descenso de g_s tras el envenenamiento con DCMU (Fig. 3.7), que está de acuerdo con estudios previos (Messinger *et al.*, 2006; Roelfsema *et al.*, 2006; Sharkey and Raschke, 1981; Tominaga *et al.*, 2001). En nuestros experimentos, el DCMU fue suministrado a C_i constante, descartando la participación de los mecanismos de cierre estomático que responden directamente al aumento de la concentración de CO_2 . La disminución gradual de asimilación de CO_2 con DCMU fue probablemente debida a la propagación progresiva del inhibidor a lo largo de la hoja, y no a un declive uniforme de la fotosíntesis en la hoja entera, en concordancia con Messinger *et al.* (2006). En desacuerdo con estos autores, sin embargo, en nuestro estudio g_s no disminuyó a la vez que la fotosíntesis, sino que tuvo una respuesta retrasada al DCMU. O bien se requiere más tiempo para que el DCMU llegue a las células oclusivas de los estomas que a otros tipos celulares de la hoja, o el estímulo de la fotosíntesis sobre g_s se desplaza en una distancia mayor, por lo que la percepción de su supresión se retrasa. Estudios previos apoyan el hecho de que la respuesta de los estomas al CO_2 es causada por una señal generada en el mesófilo (Fujita *et al.*, 2013; Mott, 2009; Mott *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 1985), lo que podría explicar la respuesta diferida de g_s al inhibidor. El efecto del DCMU sobre g_s tuvo mayor

prontitud y grado (tasa y magnitud) en G132 que en el genotipo silvestre. La diferencia pudo deberse principalmente a la desaparición con el inhibidor del exceso de capacidad de transporte electrónico respecto a la asimilación de carbono en el mutante. En menor medida, también pudo deberse a la C_i moderadamente mayor (24%) en G132 que en Graphic, lo que podría tener un efecto independiente de la fotosíntesis sobre el cierre de los estomas.

El efecto del CO_2 en los estomas de hojas tratadas con DCMU (Fig. 3.7) muestra claramente otro mecanismo de control de los movimientos de los estomas que es independiente de la fotosíntesis, de acuerdo con Messinger *et al.* (2006) y Kim *et al.* (2010), y que está probablemente relacionado con la señalización de CO_2 en las células oclusivas (Fujita *et al.*, 2013). En contraste con los resultados reportados por Fujita *et al.* (2013), los estomas de las hojas tratadas con DCMU respondieron al CO_2 bajo luz roja, siendo las razones de esta discrepancia poco claras. En las hojas envenenadas con DCMU, el grado de cierre de los estomas en respuesta a un aumento en la concentración de CO_2 fue algo mayor en G132 que en Graphic, aunque la respuesta estomática en unidades absolutas fue más pequeña, y la tasa de cierre de los estomas más lenta en el primero (Fig. 3.7). La expresión génica mostró una disminución en G132, en comparación con el genotipo silvestre, de la abundancia de transcritos para el canal lento de aniones SLAH3 (datos suplementarios y Tablas 3.8, 3.9 y 3.19). La salida de aniones osmoreguladores desde las células oclusivas a través de SLAC1 (Laanemets *et al.*, 2013a) y SLAH3 (Geiger *et al.*, 2011; Laanemets *et al.*, 2013a) inicia el cierre estomático (Kollist *et al.*, 2014), y afecta a la sensibilidad al Ca^{2+} citosólico libre de los canales de entrada de K^+ (Laanemets *et al.*, 2013a). El mutante de *Arabidopsis* *slac1-7*, con una sustitución Ser-120 por Phe, tiene una conductancia estomática similar a la de Graphic, aunque un ritmo más lento de cierre estomático en respuesta al CO_2 (Merilo *et al.*, 2013). En contraste, el mutante *slac1-3*, con pérdida de función en SLAC1, tuvo g_s significativamente más alta que el genotipo silvestre, además de sensibilidad reducida a niveles elevados de CO_2 (Merilo *et al.*, 2013). Al igual que en mutantes del canal de aniones SLAC1 (Laanemets *et al.*, 2013b; Wang *et al.*, 2012), la disminución de la abundancia de SLAH3 puede dar cuenta de la tasa disminuida de cierre estomático en hojas de G132 tratadas con DCMU, en respuesta a aumentos en la

concentración de CO₂ (Fig. 3.7). Con las reducciones en SLAH3 cabría esperar un retraso en la apertura estomática en G132 cuando C_a se redujo a 50 μmol mol⁻¹, debido a la disminución de la entrada de K⁺ tras el aumento de concentración de Ca²⁺ citosólico (Laanemets *et al.*, 2013b; Wang *et al.*, 2012). La concentración de Ca²⁺ en G132 pudo no haber aumentado lo suficiente como para afectar al aumento de g_s en respuesta a bajas concentraciones de CO₂.

4.1.4. Contenidos de carbohidratos en G132

La baja velocidad de fotosíntesis de G132 se relacionó con un menor contenido de carbohidratos no estructurales (Tablas 3.5 y 3.15) con respecto a Graphic, que fue particularmente tangible para el almidón. Un flujo reducido a través del ciclo de Calvin-Benson puede resultar en niveles bajos de 3-fosfoglicerato, que afectan negativamente a la actividad ADP-glucosa pirofosforilasa (Preiss, 1988) y la síntesis de almidón. La represión de la expresión génica para almidón fosforilasa y la sobreexpresión de la trehalosa-6-P sintasa, observadas en G132 en la fase 12 (Apéndice A.1.1), podrían haber favorecido la acumulación de almidón por inhibir su degradación (Martins *et al.*, 2013), pero este efecto no se observó. La reducción preferencial de la acumulación de almidón muestra que el carbono asimilado se dirigió a mantener la síntesis de sacarosa, que pudo emplearse para la exportación y el crecimiento (Harrison *et al.*, 1997; Paul *et al.*, 1995). La mayor abundancia de transcritos en G132 correspondientes a sacarosa sintasa (SUSY) durante la fase 12 no pareció reducir el balance entre la síntesis de sacarosa y la de almidón. El fuerte descenso en G132 del contenido de fructanos, especialmente en la fase 13-14 de crecimiento, no es atribuible a mayor nivel de nitrato (Tablas 3.9 y 3.15), un nutriente que se ha mostrado que actúa como señal negativa para la síntesis de fructanos (Morcuende *et al.*, 2004). La disminución del contenido de sacarosa, que es sustrato y también efector para la inducción de la actividad fructosiltransferasa (Pollock and Cairns, 1991; Wagner *et al.*, 1986) podría limitar la acumulación de fructanos en G132. De hecho, la expresión de genes para la síntesis de fructanos (Tablas 3.8 y 3.19) se reprimió en G132 en la fase 13-14 de crecimiento y se estimuló en la fase 15-17 (Tabla 3.9). Junto con el descenso en el contenido de nitrato, el aumento del contenido de sacarosa en la fase 15-17 pudo favorecer la síntesis de fructanos. Es probable, por tanto, que el

contenido de almidón de G132 descendiera como consecuencia de regulación metabólica de la actividad enzimática, mientras que el contenido de fructanos disminuía debido a regulación metabólica de la expresión génica. Como en el caso del contenido de proteína, los contenidos de almidón, sacarosa y fructanos en la fase 15-17 decrecieron con la edad de la hoja en Graphic y no en G132, lo que sugiere nuevamente una senescencia retrasada en el mutante.

4.1.5. Respiración en G132

A nivel transcriptómico, los análisis de la primera hoja revelaron que aquellos genes que codificaban para las vías metabólicas de la glucólisis, de la oxidación de pentosas fosfato, ciclo de ácidos tricarboxílicos y del transporte electrónico mitocondrial estaban reprimidos en G132. Y en términos generales observamos una represión de la síntesis de aminoácidos (Apéndice A.1.1). La glucólisis es el proceso de conversión de glucosa en piruvato con la generación de pequeñas cantidades de ATP y NADH. Es una vía central que produce importantes metabolitos precursores, como glucosa-6P, fructosa-6P y compuestos de tres carbonos como gliceraldehído-3P, glicerato-3P, fosfoenolpiruvato, y piruvato. La vía de las pentosas fosfato es la principal productora de NADPH y el ciclo de Krebs cumple dos funciones elementales; la síntesis de NADH y la formación de precursores de la síntesis de aminoácidos. Mediante el transporte electrónico mitocondrial se consigue el gradiente protónico que daría lugar a la síntesis de ATP. En cualquier caso, es importante reconocer que el conjunto de las vías metabólicas respiratorias tienen lugar de forma simultánea con una interacción fisiológica, ya que dichas vías comparten sustratos y productos (Hoefnagel *et al.*, 1998).

La inhibición del complejo I mediante rotenona en cultivos celulares de *Arabidopsis* demuestra que se induce una remodelación significativa de las vías metabólicas que se dan en la mitocondria y otros compartimentos (Garmier *et al.*, 2008). Aunque en este estudio no se indujo estrés oxidativo, el análisis integrado de la expresión génica y del proteoma mitocondrial indicó cambios en el metabolismo primario y se observó una alteración de las actividades glucolíticas asociados con la membrana externa mitocondrial y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. También fueron modificados por el tratamiento con rotenona los aminoácidos y el conjunto de ácidos orgánicos. En otro estudio (Umbach *et al.*, 2012), con el uso de dos inhibidores mitocondriales con distintos sitios de acción, la antimicina A (AA), inhibidor de la respiración de

citocromo, y monofluoroacetato (MFA), que inhibe el ciclo de Krebs, las similitudes en las respuestas del transcriptoma se dieron en la señalización (la señalización de calcio y factores de transcripción con dominio WRKY y NAC) y estrés biótico. Pero en ambos estudios la categoría funcional con una generalizada represión significativa de transcritos tras la inhibición mitocondrial (rotenona, AA, MFA) fue para las reacciones luminosas de la fotosíntesis. Este resultado pone de relieve la estrecha relación entre la señalización de las vías metabólicas del cloroplasto y la mitocondria (Noctor et al., 2004; Padmasree et al., 2002; Raghavendra and Padmasree, 2003). Otros autores trabajando con mutantes del complejo II mitocondrial no mostraron diferencias significativas para la respiración, la tasa de transporte cloroplástico de electrones, la absorción de CO₂ en concentraciones saturantes, o parámetros bioquímicos, como las tasas máximas de carboxilación por Rubisco y de transporte fotosintético de electrones (Fuentes et al., 2011). Y es que en última instancia la biomasa está determinada por la razón entre asimilación fotosintética y respiración del CO₂, y la represión generalizada de transcritos y de las tasas de respiración del carbono asimilado en G132 (Tablas 3.3 y 3.12), condujeron a una menor cantidad de carbohidratos y menor respiración, lo que pudo influir claramente en la concentración de carbohidratos en hoja, además de la menor biomasa y desarrollo más lento en las fases iniciales (Tabla 3.10, 3.20 y 3.21).

Así como Li et al. (2013) observaron bajo alto CO₂ de crecimiento en plantas de tomate, el aumento de la capacidad respiratoria vino dado por una mayor abundancia de transcritos que participan en las vías del metabolismo de carbohidratos como la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y el metabolismo energético de transporte electrónico mitocondrial.

4.1.6. Crecimiento y producción en G132

La inhibición de la asimilación fotosintética de carbono en G132 condujo a disminuciones de la superficie verde y el peso seco de la planta en la fase 13-14 del crecimiento (Tabla 3.20) y del peso seco en la fase 15-17 (Tabla 3.10). De acuerdo con lo observado en plantas con Rubisco antisentido (Miller et al., 2000; Tsai et al., 1997), G132 mostró desarrollo lento (Tabla 3.10) y, como se ha indicado, senescencia retrasada. Además, la morfología de la tercera hoja fue diferente, mostrando el mutante menor peso, área, volumen, grosor y densidad (Tabla 3.20); como consecuencia de las reducciones en grosor, el peso de agua

por unidad de superficie fue también inferior, pero el porcentaje de agua en el peso fresco de la hoja fue mayor (Tablas 3.20 y 3.21). Los cambios de peso y densidad de G132 respecto a Graphic fueron atribuibles a compuestos estructurales (Tabla 3.20) y no solo a los carbohidratos y compuestos de nitrógeno analizados, Ya en la fase 12 se detectaron diferencias entre ambos genotipos en transcritos implicados en la composición de la pared celular. Se sabe que una gran cantidad de la biomasa de la pared celular deriva del precursor UDP-glucuronato (UDP-GlcA) a través de la interconversión de nucleótido azúcares (Seifert, 2004) y a su vez, aquel se convierte en gran número de azúcares, incluyendo UDP-galacturonato, UDP-xilosa y UDP-arabinosa. Roberts (1971) sugirió que la producción de UDP-GlcA a través de mio-inositol podría ser la vía predominante en plántulas jóvenes de cebada. De esta forma, en la primera hoja, encontramos reprimidos en G132 una serie de transcritos como oxigenasas y quinasas de mio-inositol que convierten el mio-inositol en UDP-GlcA. Además encontramos reprimidos de forma muy generalizada y más acusados al crecer en CO₂ elevado, transcritos del tipo epimerasas, deshidrogenasas y decarboxilasas para la formación de xilosa, arabinosa y galactosa. Y existió una represión de transcritos implicados en la formación de celulosa (UDP-glucosa deshidrogenasa, celulosa sintasa), en la síntesis de hemicelulosa y en la adhesión celular (Apéndice A.1.1). G132 mostró también en las fases 12 y 13-14 disminuciones (Apéndice A.1.1 y Tabla 3.19), o tendencias decrecientes (aunque no significativas, Tabla 3.8), de la expresión de xiloglucano endotransglicosilasa. Estas alteraciones en la composición de la pared celular, a través de los cambios en la expresión de la biosíntesis de la pared celular o de las enzimas hidrolíticas, pueden relacionarse con el menor peso por unidad de superficie foliar y conducir a defectos drásticos en el desarrollo (Carpita and McCann, 2015; Cosgrove, 2005). En plantas antisentido para enzimas del ciclo de Calvin-Benson, las reducciones de la fotosíntesis y de los contenidos de sacarosa y almidón se correlacionan con disminuciones del peso por unidad de superficie foliar (Fichtner et al. 1993; Raines and Paul 2006), lo cual se confirmó en G132. Se ha señalado que un peso por unidad de superficie foliar menor puede compensar una disminución de la capacidad fotosintética a nivel de planta entera (Raines and Paul, 2006). El retraso de la senescencia y un menor peso por unidad de superficie foliar podrían explicar que fuera pequeña la diferencia con Graphic

en materia seca de la planta, tamaño y forma del grano y producción del mismo en la madurez (Tabla 3.10).

El desarrollo de las plantas es un proceso coordinado e integrado a través de un gran número de señales, entre las que se encuentran las hormonas. Sin embargo no hay pruebas de la participación directa de las hormonas en procesos celulares específicos. Durante la misma fase de crecimiento, en la primera hoja, comprobamos que existió también una alteración significativa en los niveles de transcritos del metabolismo hormonal de la planta, tanto a nivel de síntesis como de respuesta a hormonas, lo que repercutiría en el anormal crecimiento de G132 (Vanstraelen and Benkova, 2012). Principalmente hubo una represión de la expresión de transcritos involucrados en la producción de ácido jasmonico, que tiene un papel activo en la resistencia contra gran diversidad de estrés bióticos y abióticos (Santino *et al.*, 2013), como varias lipoxigenasas y aleno oxido ciclasas. Por otro lado, con la presencia de ácido jasmónico se sabe que se estimula la expresión de algunas serin endopeptidasas del tipo subtilisina (Golldack *et al.*, 2003). Y en los resultados del microarray una serie de transcritos para estas proteasas, cuya función esta probablemente relacionada con la modificación de la pared celular (Rautengarten *et al.*, 2008), se encontró muy reprimida. Plantas de *Arabidopsis* mutadas en la ALE1 subtilasa son deficientes en el desarrollo de la epidermis de la hoja y forman una cutícula rudimentaria en embriones y plantas (Tanaka *et al.*, 2001). Otra serie de transcritos involucrados directa e indirectamente con los brasinoesteroides también se alteró en la primera hoja entre ambos genotipos. Los brasinoesteroides participan en la elongación y la división celular, afectan a las relaciones de fuente-sumidero, al bombeo de protones y a la polarización de las membranas, la fotosíntesis, la respuesta al estrés y la senescencia (Bishop and Koncz, 2002). Transcritos asociados con la señalización de brasinoesteroides tipo BAK1, que controla de alguna forma el desarrollo y la expresión de genes asociados con la inmunidad innata de la planta (Postel *et al.*, 2010), se reprimieron en G132. Ciertos mutantes de BAK1 muestran un fenotipo en el que el desarrollo es más lento, la senescencia está retrasada y padecen enanismo (Friedrichsen *et al.*, 2000; Noguchi *et al.*, 1999), lo cual podría explicar en parte el fenotipo del mutante. Además de estos efectos, los brasinoesteroides pueden promover la reorientación de los microtúbulos

(Mayumi and Shibaoka, 1995), y en concordancia se reprimieron transcritos implicados directamente en la organización de microtúbulos, y también otros similares a la actina y la tubulina. Dicha organización de microtúbulos cuya rotación, más que cualquier hipotético mecanismo para el auto-ensamblaje de la pared celular, tiene un papel esencial en el desarrollo de las capas entrecruzadas de la pared celular (Chan *et al.*, 2010) lo que pudo nuevamente influir en la represión generalizada del desarrollo y formación de pared celular. Otros transcritos de genes identificados como exordium (EXO), también regulados por brasinosteroides, se encontraron fuertemente reprimidos en G132 y algunos datos sugieren que forman parte de una vía de regulación que controla el crecimiento y el desarrollo cuando el C y el suministro de energía es pobre (Schroder *et al.*, 2012).

4.2. Efecto del CO₂ elevado

4.2.1 Condiciones de cultivo

Guiados por las previsiones del IPCC (2013) detalladas en la introducción, sobre el aumento de las concentraciones atmosféricas de CO₂ para finales de este siglo, la mayor parte de los estudios realizados han empleado concentraciones de CO₂ de entre 550 y 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. En este trabajo se ha estudiado el efecto de 1200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ atmosférico en plantas mutantes de cebada. Se estableció esta concentración para mantener la utilizada en el proceso de selección de mutantes en una atmósfera enriquecida en CO₂. Otros estudios del efecto del CO₂ elevado sobre las plantas han empleado también concentraciones de este orden (Aranjuelo *et al.*, 2014; Hubbart *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014), que se encuentran dentro de los límites previstos para el año 2100. Esta parte del estudio se ha llevado a cabo en cámaras de crecimiento de plantas (ver apdo. 2.1.2), que permiten un control riguroso de las variables ambientales, aunque la experimentación en el campo con cámaras abiertas (open top chambers; Dore *et al.*, 2003), cámaras de gradiente de temperatura (Gutiérrez *et al.*, 2013) y dispositivos de enriquecimiento en CO₂ a cielo abierto (FACE; Ainsworth and Long, 2005) se

aproximen más a las condiciones naturales. De esta forma las únicas variables de estudio fueron el CO₂ y el genotipo de cebada.

4.2.2. Efecto del CO₂ sobre la fijación del dióxido de carbono en ambos genotipos

El crecimiento a largo plazo en CO₂ elevado aumentó A, como es evidente al comparar las plantas desarrolladas y medidas con 1200 μmol mol⁻¹ de CO₂ con las desarrolladas y medidas con 390 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Tabla 3.12). El análisis de la respuesta directa de A al enriquecimiento en CO₂ del aire (Tabla 3.13) mostró incrementos del 46 al 94 % en el genotipo silvestre, dependiendo del experimento. Es bien conocido que un aumento instantáneo de la concentración de CO₂ tiene como efectos principales una estimulación de la fotosíntesis y una reducción de la conductancia estomática (Long *et al.*, 2004). La primera se debe al aumento de sustrato para la carboxilación catalizada por la enzima Rubisco, que no está saturada por el CO₂ con las concentraciones atmosféricas actuales, y a la inhibición competitiva de la oxigenación (Habash *et al.*, 1995). Sin embargo, las respuestas netas de A al CO₂ elevado (aumentos del 28 al 84 % en Graphic) fueron menores que las respuestas directas. La causa de esta diferencia fue el efecto de aclimatación causado por el crecimiento prolongado en CO₂ elevado, con disminuciones de A entre el 5 y el 12 %. Estas disminuciones se observaron también en medidas de la fotosíntesis con una misma concentración de CO₂ en las plantas desarrolladas en CO₂ ambiente y elevado (Tabla 3.12). La aclimatación consiste en una disminución de la capacidad fotosintética y se ha observado en numerosos estudios precedentes (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 1995b; Sage, 1994; Stitt, 1991), aunque algunas veces la estimulación inicial de A se mantiene después de una exposición prolongada al CO₂ elevado (Alonso *et al.*, 2009; Gunderson *et al.*, 1993; Habash *et al.*, 1995). De hecho, la magnitud de la aclimatación en este estudio, comparada con la observada en otras investigaciones (Bunce, 2001; Del Pozo *et al.*, 2007), fue moderada. Conforme con otros resultados (Del Pozo *et al.*, 2007; Drake *et al.*, 1997; Nie *et al.*, 1995b; Pérez *et al.*, 2005; Rogers and Humphries, 2000; Sicher and Bunce, 1997; Van Oosten *et al.*, 1994), en nuestros experimentos la aclimatación de la fotosíntesis

en el genotipo silvestre se debió a una tendencia general decreciente de V_{cmax} (Tabla 3.12), actividad Rubisco *in vitro* (Fig. 3.22) y proteína Rubisco (Tabla 3.17). El mayor efecto directo y el efecto de aclimatación más atenuado en el mutante G132 tuvo como resultado una respuesta neta al CO_2 elevado notablemente más positiva (aumento de 90 a 190 %, dependiendo del experimento) que en Graphic. Este mejor efecto del enriquecimiento en CO_2 se observó también en medidas de la fotosíntesis de G132 y Graphic con concentración común de CO_2 (Tabla 3.12). El modelo de la fotosíntesis de Farquhar *et al.* (1980) permite predecir una respuesta más positiva al aumento instantáneo en la concentración de CO_2 (respuesta directa) cuando la velocidad máxima de carboxilación catalizada por Rubisco es menor, como se encontró en G132 (Tabla 3.12). Y más aún cuando, con $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , la fotosíntesis estuvo limitada por la Rubisco en G132 y por la regeneración de RuBP en Graphic (Figs. 3.13 y 3.14). Algunos estudios con mutantes y transformantes con actividad Rubisco reducida (Melkonian *et al.*, 2005; Sicher *et al.*, 1994) también han mostrado mayor respuesta de la fotosíntesis al aumento instantáneo de CO_2 que en los genotipos silvestres. En experimentos en FACE, los grupos funcionales de plantas con fotosíntesis limitada por Rubisco en CO_2 elevado tuvieron mayor potencial para el aumento de la fotosíntesis que aquellos en los que la fotosíntesis estaba limitada por RuBP en CO_2 elevado (Ainsworth and Rogers, 2007). G132 mostró también una diferencia con Graphic en la respuesta a largo plazo o de aclimatación al CO_2 , para la que no es adecuada la explicación ofrecida para la respuesta a corto plazo o directa. Los efectos del aumento de CO_2 en V_{cmax} (Tabla 3.12), la actividad (Fig. 3.22) y la proteína (Tabla 3.17) Rubisco, opuestos o más positivos en G132 que en Graphic, indican que el mutante no sufrió aclimatación, o esta fue escasa, porque no experimentó disminuciones de Rubisco, o fueron disminuciones moderadas. Además, el incremento o escasa disminución del contenido de Rubisco en el mutante compensó con creces un aumento de su degradación en CO_2 elevado (Fig. 3.20). Tanto la predicción basada en modelos antes expuesta, como la confirmación experimental, sugieren que la fotosíntesis de las plantas con contenidos bajos de Rubisco podría mostrar mayores aumentos con el ascenso de la concentración de CO_2 en la atmósfera.

4.2.3. La eficiencia cuántica en CO₂ alto

El crecimiento en CO₂ elevado influyó también de modo diferente en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de los dos genotipos, aumentándola en el mutante y no cambiándola en el genotipo silvestre (Tabla 3.11). Entre los efectos del aumento del CO₂ en la actividad fotoquímica de las plantas se incluyen cambios de pequeña magnitud (Tezara *et al.*, 2002), o disminuciones solo en fases tardías del desarrollo (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005), a pesar de la disminución en el contenido de Rubisco; ausencia de cambios en Fv/Fm (Habash *et al.*, 1995; Hymus *et al.*, 1999); y aumentos en la eficiencia cuántica acompañando a una estimulación (Zhang and Dang, 2006) o un descenso (Gutierrez *et al.*, 2009) de la capacidad de carboxilación. El CO₂ elevado modificó los contenidos de algunos componentes de la cadena de transporte fotosintético de electrones, tales como D1, LHCII y citocromo b6 (Tabla 3.18). En Graphic desarrollado en CO₂ elevado, la disminución de estas proteínas y del transcrito para LHCII (Tabla 3.19) fue coherente con los descensos observados en la abundancia de transcritos para proteínas enlazadas a clorofila en tomate (Van Oosten *et al.*, 1994), y para dichas proteínas y D1 en *Populus* (Cseke *et al.*, 2009). Además, el aumento de la razón clorofila a/clorofila b y la disminución del contenido de clorofila b (Fig. 3.19), podrían indicar que descendió la proporción de antena por centro de reacción del PSII, en contraste con la constancia de esta razón encontrada por Habash *et al.* (1995). Sin embargo, disminuciones del 23 % (D1) al 33 % (LHCII) de las proteínas fotosintéticas fueron insuficientes para limitar Fv/Fm en Graphic. Descensos en el contenido de citocromo b6 como los encontrados en este genotipo con CO₂ elevado (61 %) reducen fuertemente el transporte fotosintético de electrones (Yamori *et al.*, 2011), pero puede esperarse que no modifiquen la eficiencia cuántica del PSII de las hojas adaptadas a la oscuridad. A diferencia con estos cambios en Graphic, los grandes aumentos con el CO₂ de los contenidos de D1 (56 %) y LHCII (85 %), a pesar de la disminución de transcrito para esta última, así como de clorofila (23 %), se asociaron con un incremento de la eficiencia cuántica máxima en G132. El aumento considerable del contenido de citocromo b6 (144 %) podría estimular la eficiencia cuántica en la luz. Nuestros resultados indican que el enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera no afectó solo a la Rubisco y a los

movimientos de los estomas, como indicaron Long *et al.* (2004), sino también al aparato fotoquímico y, en el mutante, a su eficiencia cuántica máxima.

En hojas iluminadas, el efecto del CO₂ elevado en la eficiencia cuántica operativa (Fq'/Fm') y la velocidad de transporte de electrones (ETR, Tabla 3.11) también fue diferente en el mutante y el genotipo silvestre, con aumentos solo en el primero. Con mayor concentración de CO₂, el transporte fotosintético de electrones destinado a la asimilación de C aumenta proporcionalmente, mientras que el flujo hasta el O₂ disminuye; el resultado neto de estos cambios determina si el flujo total de electrones aumenta (Hymus *et al.*, 2001). En Graphic, la ausencia de estimulación de Fq'/Fm' en CO₂ elevado se relacionó con las disminuciones de Rubisco y citocromo b6, que restringieron el aumento del flujo total de electrones. En G132, en cambio, el aumento de Fq'/Fm' fue probablemente una consecuencia del aumento o la disminución más moderada de proteína Rubisco y de asimilación de CO₂, así como del aumento de citocromo b6. De acuerdo con Baker *et al.* (2007), la estimulación del consumo de los productos del transporte de electrones con el CO₂ elevado aumentó Fq'/Fm' favoreciendo la apertura de centros del PSII, como indica el incremento de qL. Además, el aumento del consumo de ATP y de la actividad ATPasa disminuiría el gradiente de protones a través de los tilacoides, reduciendo así la disipación de energía de excitación por vías no fotoquímicas, como mostró el descenso de Φ_{NPQ}. En otros estudios donde no se encontró aclimatación de la fotosíntesis, el crecimiento en CO₂ elevado aumentó Fq'/Fm' (Habash *et al.*, 1995; Hogan *et al.*, 1997; Hymus *et al.*, 2001) estimulando la extinción fotoquímica de la fluorescencia (dependiente de qL), con poco efecto en la eficiencia máxima de los centros abiertos del PSII (ΦqL) (Habash *et al.*, 1995; Hymus *et al.*, 1999), o también con aumentos de ésta (Hymus *et al.*, 2001).

4.2.4. Conductancia de los estomas en CO₂ alto

La falta de efectos del CO₂ elevado en la densidad y la frecuencia de estomas en la epidermis foliar (Fig. 3.15) contrasta con observaciones anteriores de una disminución de dicha densidad (Woodward, 1987), que es inducida por mecanismos moleculares elucidados recientemente (Engineer *et al.*, 2014). En

cambio, nuestros resultados coincidieron con un meta-análisis de las respuestas de la densidad de los estomas al CO₂ elevado, que encontró que su disminución no fue significativa (Ainsworth and Rogers, 2007). Las respuestas de g_s (Tabla 3.12) confirmaron, en cambio, que los estomas se cierran con el enriquecimiento en CO₂ (Franks *et al.* (2013) y referencias antiguas aquí citadas), por mecanismos que no se conocen por completo (Kim *et al.*, 2010). Este cierre podría limitar parcialmente la fotosíntesis en medidas a corto plazo con 390 μmol mol⁻¹ de CO₂ en plantas desarrolladas en CO₂ elevado. Sin embargo, la disminución de C_i asociada con el cambio en g_s fue pequeña y probablemente insuficiente para explicar la menor fotosíntesis de las plantas en CO₂ elevado. Similarmente, la conductancia estomática disminuida limitaría de modo despreciable el aumento en la fotosíntesis en CO₂ elevado respecto a las plantas crecidas y medidas con CO₂ ambiente, de acuerdo con Long *et al.* (2004). La disminución de la transpiración que acompañó al cierre de los estomas en plantas crecidas con CO₂ elevado condujo a un aumento de la eficiencia instantánea en el uso del agua (Long *et al.*, 2004).

4.2.5. Rubisco y compuestos nitrogenados en CO₂ alto

El estudio del array no reveló cambios con la concentración de CO₂ en la expresión génica para Rubisco, quizá porque las hojas primarias analizadas estuvieron expuestas poco tiempo al enriquecimiento en CO₂. En contraste, el análisis mediante RT-qPCR en plantas crecidas en CO₂ elevado durante un periodo más prolongado, reveló una represión de la expresión génica para la subunidad pequeña de Rubisco (Tabla 3.19). La disminución del nivel de ARNm para Rubisco en plantas crecidas en CO₂ elevado se ha encontrado en muchos estudios anteriores (Cseke *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 1998; Fukayama *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 1998; Nie *et al.*, 1995a; Van Oosten and Besford, 1995), aunque no en otros (Ainsworth *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2005). Algunos estudios han mostrado que el CO₂ elevado reprime la expresión génica para Rubisco en hojas de más edad, pero no en hojas jóvenes (Nie *et al.*, 1995a; Taylor *et al.*, 2005). Se sabe que la expresión génica para la subunidad pequeña de Rubisco modula la traducción para la subunidad grande en el cloroplasto (Wostrikoff and Stern, 2007), coordinándose así la síntesis de las

dos subunidades (Nivison and Stocking, 1983; Suzuki and Makino, 2012). En nuestros experimentos se encontró en los dos genotipos una represión escasa de la transcripción para la subunidad pequeña de Rubisco en CO₂ elevado, como fue escasa la respuesta de aclimatación de la fotosíntesis. Además, en G132 el contenido de Rubisco apenas disminuyó o incluso aumentó. Más aún, G132 pareció insensible a la disminución con CO₂ elevado de transcritos para proteínas ribosómicas y la subunidad alfa de la ARN polimerasa plástica (Tabla 3.19), que podría restringir la síntesis de proteína en los cloroplastos. Probablemente, un descenso en el transcrito para Rubisco tuvo menor efecto en G132 porque tenía mayor nivel del mismo que Graphic. La disminución de la Rubisco inducida en el genotipo silvestre por el CO₂ elevado podría reflejar una disminución general de proteína foliar, más que una represión de la expresión génica (Stitt and Krapp, 1999). Sin embargo, en estos experimentos no hubo tal disminución, sino una pérdida selectiva de Rubisco (Tabla 3.17), en contraste con resultados anteriores (Del Pozo *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2013). La menor abundancia de transcrito para la Rubisco podría explicar, al menos en parte, el descenso del contenido de Rubisco inducido por el crecimiento en CO₂ elevado.

Los datos muestran que no hubo cambios en la cantidad de proteína total, soluble o de membrana con el CO₂ elevado (Tabla 3.17). Pero en detalle, el CO₂ elevado alteró la fracción de proteína soluble sin Rubisco, además de inducir los cambios en la enzima Rubisco ya discutidos. El efecto fue un aumento de la cantidad de proteínas solubles sin Rubisco con el CO₂ en ambos genotipos y fue significativo en la segunda experimentación, pero en la primera se observó la misma tendencia en G132. Tal vez la pérdida selectiva de la enzima Rubisco en el tipo silvestre propició una utilización de sustratos para la síntesis de otras proteínas. Con concentraciones altas de CO₂ la fotosíntesis está limitada por la regeneración de RuBP y no por la carboxilación catalizada por Rubisco. En consecuencia, la estrategia de aclimatación al CO₂ elevado consistirá en reducir la inversión de recursos en la enzima Rubisco y aumentarla en procesos que sostienen la regeneración de RuBP (Sage, 1994; Zhu *et al.*, 2007). Hubo estudios en los que no se observaron cambios indicativos de una redistribución de recursos (Nakano *et al.*, 1997; Sage, 1994). En contraste, Mitchell *et al.* (2000) obtuvieron evidencia de un efecto del crecimiento en 700 μmol mol⁻¹ de CO₂ por el que la

capacidad de carboxilación se redujo más que la capacidad de regeneración de RuBP, para un contenido de nitrógeno foliar dado. Similarmente, el CO₂ elevado aumentó significativamente la razón entre capacidad de regeneración de RuBP y V_{cmax} en soja no nodulada (Sims *et al.*, 1998). La disminución de la capacidad de carboxilación, junto con un aumento en la eficiencia cuántica y los complejos de antena en el trigo cultivado con CO₂ elevado, sugirió un cambio hacia la adscripción de recursos para la captura de la luz (Gutierrez *et al.*, 2009). Otros autores han encontrado también un aumento con el CO₂ elevado en el balance entre transporte de electrones y Rubisco (Makino *et al.*, 1997; Osborne *et al.*, 1998). En nuestros experimentos, la disminución del contenido de Rubisco en el genotipo silvestre no estuvo acompañada por un aumento del transporte de electrones (Tablas 3.11 y 3.12) o de componentes del aparato fotosintético (Tabla 3.18), como se ha discutido más arriba. Entre el resto de proteínas solubles que aumentaron con el CO₂ elevado podrían estar enzimas del ciclo de Calvin-Benson, como observaron Aranjuelo *et al.* (2013), que contribuirían a la regeneración de RuBP, y para la síntesis de productos fotosintéticos (Sage, 1994), de acuerdo con el aumento de carbohidratos observado en nuestro estudio (Tabla 3.15). Es reseñable que en G132, en el que la Rubisco limitó la fotosíntesis aún con CO₂ elevado (Figs 3.13 y 3.14), esta enzima no disminuyó, o lo hizo en poca medida, mientras que la proteína soluble sin Rubisco aumentó.

Por otro lado, la cantidad de nitrato en hoja disminuyó con el CO₂ elevado de crecimiento (Tabla 3.16), en concordancia con lo descrito previamente en la literatura (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1999), si bien el efecto fue pequeño en G132 en el primer experimento. Una disminución del contenido foliar de nitrato puede ser consecuencia de menor importación o también de mayor metabolización o redistribución a otros órganos. Aunque se ha descrito que la absorción de nitrógeno por las raíces (Taub and Wang, 2008) y su adscripción a hojas jóvenes (Gutiérrez *et al.*, 2013) disminuyen con el CO₂ elevado, solo en el tipo silvestre hubo un descenso del total de compuestos nitrogenados, mientras que el nitrato disminuyó en los dos genotipos. Parece, por tanto, que la disminución del nitrato con el CO₂ elevado podría no estar relacionada invariablemente con reducciones en la absorción de nitrógeno. El aumento del contenido de aminoácidos con el enriquecimiento en CO₂ de la

atmósfera, salvo en Graphic en el segundo experimento, sugiere que se estimuló la reducción del nitrato, disminuyendo así su contenido. El aumento de transcritos para Nitrato reductasa, en el segundo experimento (Tabla 3.19), y de actividad de esta enzima (Fig. 3.23), excepto en Graphic en dicho experimento, pareció confirmar que el CO₂ elevado estimuló dicha reducción. Este resultado contrasta con las disminuciones en la asimilación de nitrato descritas por Bloom *et al.* (2014) y la ausencia de cambios de la misma en las primeras horas del fotoperiodo observada por Geiger *et al.* (1999) y Matt *et al.* (2001), en plantas fertilizadas con nitrato. En el caso del genotipo silvestre en el segundo experimento, la disminución con el CO₂ elevado de la actividad Nitrato Reductasa pareció concordar con el descenso en el contenido de aminoácidos, pero el nitrato disminuyó también. Esta desviación respecto a los otros tratamientos, junto con el declive del total de compuestos nitrogenados antes mencionada, puede indicar que aumentó la exportación a otros órganos con crecimiento activo. La actividad de la NR está regulada tanto a nivel transcripcional como postransduccional (Meyer and Stitt, 2001). La expresión génica para Nitrato Reductasa es inducida por el nitrato (Stitt and Krapp, 1999) y, a bajas concentraciones, por los carbohidratos (Klein *et al.*, 2000). La glutamina, o un metabolito relacionado, parece reprimir la actividad Nitrato Reductasa (Morcuende *et al.*, 1998; Stitt *et al.*, 2002). Los casos en los que no se observa relación entre transcritos y actividad con los compuestos indicados, como en nuestros experimentos, se han atribuido (Stitt *et al.*, 2002) a que el nivel de estos transcritos responde al equilibrio entre importación y reducción del nitrato, probablemente representado por el nitrato citosólico más que el total en la célula. Similarmente, cuando el contenido de aminoácidos aumenta sin que disminuya la actividad Nitrato Reductasa, debe considerarse que entre aquellos solo el glutamato (Fritz *et al.*, 2006) o la glutamina disminuyen esta actividad. Los niveles de glutamina no siempre son un indicador fiable del estado nitrogenado interno, y pueden variar, junto con los de otros intermediarios, con la disminución de la fotorrespiración en CO₂ elevado (Miyazawa *et al.*, 2014; Stitt *et al.*, 2002).

4.2.6. Carbohidratos en CO₂ alto

En ambos genotipos, el aumento de la fotosíntesis con el CO₂ elevado tuvo como resultado un incremento en el contenido de carbohidratos no estructurales, como se ha observado en estudios anteriores (Nie *et al.*, 1995a; Pérez *et al.*, 2005; Stitt, 1991). El mayor porcentaje de aumento fue de carbohidratos no estructurales de reserva como el almidón o los fructanos (Tabla 3.15) (Moore *et al.*, 1998; Poorter *et al.*, 1997; Stitt and Krapp, 1999). Estos últimos mostraron en Graphic, pero no en G132 (razón fructosa/glucosa en los fructanos), un mayor grado de polimerización con el CO₂ elevado de crecimiento, lo que podría indicar un uso de los fructanos en el primero como reserva por la planta (Labhart *et al.*, 1983), o como una fuente de hexosas sin comprometer el crecimiento celular (Livingston *et al.*, 2009). Además del incremento en contenido, hubo un aumento por efecto del CO₂ de abundancia de transcritos de enzimas clave en el metabolismo de fructanos, como 1-SST y FEH, detectados mediante qPCR (Tabla 3.19), y FEH, en los resultados de microarray (Apéndice A.1.2). Otros carbohidratos, como la sacarosa, también se incrementaron, con su posible implicación directa en el aumento en la concentración de fructanos (Pollock *et al.*, 2003).

En el genotipo silvestre, el mayor contenido en carbohidratos en CO₂ elevado pudo estar relacionado con una mayor abundancia de transcritos anotados en la primera hoja como transferasas de hexosas y transportadores de azúcares, alterándose de esta forma el metabolismo de carbohidratos. En el caso de Graphic el aumento de sacarosa pudo producir un flujo de iones de calcio desde la vacuola que pudo influir en la mayor síntesis de fructanos mediante la señalización de cationes de calcio por efecto de proteínas quinasa dependientes de calcio (CDPK) y por la modulación de calmodulinas. Tanto estas quinastas como las calmodulinas se sobreexpresaron con el CO₂ elevado, y las segundas, al activar proteínas de pequeña respuesta positiva a auxina (SAURs), facilitan la síntesis de fructanos inducida por sacarosa (Valluru, 2015).

Se ha encontrado que las oscilaciones diurnas en el nivel de transcritos para Rubisco es antiparalela a la pauta de acumulación de carbohidratos (Nie *et al.*, 1995a) y coincide con contenidos altos de hexosas en las primeras horas de la noche en CO₂ elevado (Cheng *et al.*, 1998), lo que sugiere que hay una relación

entre niveles altos de azúcares y represión de la expresión génica. En cambio, con suministro alto de nitrógeno los carbohidratos aumentaron en CO₂ elevado, pero no se observó aclimatación de la fotosíntesis o disminución de transcritos para enzimas del ciclo de Calvin-Benson (Geiger *et al.*, 1999). Como se ha expuesto, en nuestros experimentos el crecimiento en CO₂ elevado no se asoció, como en otras investigaciones, con disminuciones en la adscripción de nitrógeno a las hojas (Gutiérrez *et al.*, 2013; Seneweera *et al.*, 2011) y en el contenido de proteína (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2005; Poorter *et al.*, 1997). Nuestros resultados son compatibles con una represión de la expresión génica para Rubisco inducida por la acumulación de carbohidratos en CO₂ elevado (Jang and Sheen, 1994; Van Oosten and Besford, 1995). La diferente respuesta del contenido de Rubisco al CO₂ en los dos genotipos se correspondió con menores contenidos de carbohidratos (Tabla 3.15) y mayor abundancia de transcritos para Rubisco (Tabla 3.19) en G132 que en el genotipo silvestre.

4.2.7. Metabolismo secundario en CO₂ alto: compuestos fenolicos

En Graphic también se observó una represión en CO₂ elevado del transportador de fosfoenolpiruvato al cloroplasto, cuya función propuesta en plantas C3 es la provisión de PEP para la ruta del ácido siquímico (Fischer *et al.*, 1997). Como productos finales de la vía del ácido siquímico está la producción de aminoácidos aromáticos (AAA) y una serie de productos derivados, tales como antocianidina, los flavonoides, los anillos aromáticos de plastoquinona o tocoferol, y una gran cantidad de productos secundarios de las plantas, incluyendo la lignina (Maeda and Dudareva, 2012). Los fenoles producidos mediante esta vía derivan del ácido cinámico, biosintetizado de la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La fenilalanina es el principal producto de esta ruta, además de ser considerada un importante punto de regulación entre el metabolismo primario y secundario. Como hemos visto en los resultados del microarray (Apéndice A.1.2), seis transcritos de PAL se sobreexpresaron con el CO₂ elevado en el genotipo silvestre. Los tratamientos deficitarios en nitrógeno conducen a un aumento de los niveles transcripcionales de PAL; dichos niveles se correlacionan positivamente con la actividad de la enzima (Olsen *et al.*, 2008). Y en alto CO₂ se produjo un aumento de fenilpropanoides acompañado por un aumento de la

actividad PAL en hojas, en diferentes regímenes nitrogenados (Matros *et al.*, 2006). En un reciente estudio, Goufo *et al.* (2014) demostraron que el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides aumentó bajo CO₂ elevado en la madurez de los órganos de plantas de arroz, un cambio que coincidió con la aclimatación de la fotosíntesis. Este estudio muestra que la asignación de carbono para la síntesis de compuestos fenólicos en CO₂ elevado depende del desarrollo ontogénico de la planta. Además apunta que si la aclimatación se lleva a cabo y la capacidad fotosintética disminuye (Tabla 3.12), según el modelo de competencia de proteínas (Jones and Hartley, 1999) se predice un aumento en las concentraciones de compuestos fenólicos, en concordancia con los resultados de dicho estudio y otros (Ibrahim and Jaafar, 2012).

4.2.8. Efecto del CO₂ en la anatomía de la hoja y el crecimiento de la planta

Este cambio composicional de la hoja ocurrió junto con un cambio en la morfología de la misma, con un incremento de materia seca por unidad de superficie (LMA; Tabla 3.20 y 3.21). Estos incrementos de LMA pueden ser el resultado de células más grandes, contribuyéndose a una mayor fijación de carbono (Lin *et al.*, 2001; Muralikrishna *et al.*, 2013; Radoglou and Jarvis, 1990). Pero también podría ser el resultado de mayor contenido en fibra y carbohidratos (Roumet *et al.*, 1999; Teng *et al.*, 2006) sin ninguna influencia positiva en la capacidad fotosintética de las plantas, ya que puede producirse un aumento en el grosor y estos cambios pueden provocar un descenso en la luz interceptada por unidad de materia seca (Evans and Poorter, 2001). En nuestro estudio, los aumentos de materia seca por unidad de superficie inducidos por el CO₂ elevado fueron despreciables al descontar la masa de los compuestos analizados (Tabla 3.20). Esto indica que aquellos cambios fueron atribuibles casi enteramente al aumento con el CO₂ del contenido de carbohidratos no estructurales y la menor cantidad de Rubisco y nitrato. El incremento de masa por unidad de superficie con el CO₂ elevado no condujo a aumentos significativos del grosor de la hoja, que serían desfavorable para la fotosíntesis (véase más arriba), sino a mayor densidad (peso seco por unidad de volumen) y un contenido de agua ligera, pero

significativamente menor. En efecto, al no cambiar el grosor de la hoja, un aumento de materia seca debe hacerse a expensas de disminuciones del agua o de los espacios aéreos. La anatomía de la hoja y su tamaño son afectados claramente por el efecto del CO₂ elevado en muchas especies (Pritchard *et al.*, 1999). Según las observaciones de Tsutsumi *et al.* (2014) sobre el desarrollo de la hoja de arroz en CO₂ elevado, hay una disminución en el número de células epidérmicas en el haz mientras que en el envés se reduce la longitud de las células, pero no el número, lo que indica que la elongación celular se reprime. Según este estudio, el CO₂ elevado disminuyó la longitud de la hoja, influyendo tanto en la división como en la elongación celular. Los resultados de nuestros experimentos corroboraron en parte estos resultados, ya que el número de células epidérmicas del haz de G132, pero no del genotipo silvestre (Fig. 3.15), y el área de la hoja de este último experimentaron una disminución con el CO₂, aunque no siempre de forma significativa (Tablas 3.20 y 3.21).

El aumento de la fotosíntesis y la síntesis de carbohidratos y otros compuestos condujo a un incremento de la biomasa de la planta (Ingvordsen *et al.*, 2015) (Long *et al.*, 2006), que se destinó principalmente a tallos axilares o hijos. El mayor aumento relativo con el CO₂ elevado de materia seca en G132 que en el genotipo silvestre es atribuible al aumento en el primero, pero no en el segundo, de la superficie verde. La mayor superficie verde puede aumentar la fotosíntesis, y por tanto la materia seca, por planta (Raines and Paul, 2006). Los resultados indicaron que, a nivel de planta entera, G132 fue más eficiente en el uso del CO₂ atmosférico suplementario. Este fenómeno tan acusado pudo ser también un efecto hormonal provocado por el CO₂ elevado de crecimiento, ya que en el transcriptoma de la primera hoja de G132 se observó una represión significativa de transcritos para citoquinina glicosiltransferasas, cuya interacción con las citoquininas permite la inactivación de las mismas (Sakakibara, 2006). Se sabe que las citoquininas promueven la producción de nuevos tallos o ramas en detrimento de la dominancia apical y retrasan la senescencia foliar (Wingler *et al.*, 1998). Además la aplicación exógena a hojas sombreadas reduce el declive de la capacidad fotosintética en varias especies y también es un factor de regulación en la redistribución de proteínas y otros compuestos de las hojas más viejas del dosel, y por lo tanto de los cambios de LMA (Boonman *et al.*, 2007;

Pons *et al.*, 2001). En términos generales ese mayor aumento de biomasa en ambos genotipos se tradujo en un mayor eficiencia en el uso del agua (Ainsworth and Long, 2005).

5. CONCLUSIONES

- 1) La fotosíntesis de la cebada mutante G132 es muy reducida, principalmente porque el contenido de Rubisco es escaso a pesar de un aumento de sus transcritos, debido a que su degradación aumenta. Su baja eficiencia cuántica se relaciona con disminuciones de transcritos para psbQ y protoclorofilida oxido-reductasa A y de las proteínas D1, LHCII y cyt b6.
- 2) A pesar de la inhibición de la fotosíntesis, los estomas de G132 tienen mayor conductancia y menor sensibilidad al CO₂. Se debe a su mayor balance transporte fotosintético de electrones/ carboxilación y a menos transcritos para el canal lento de aniones SLAH3. Se evidencia que hay mecanismos dependientes e independientes de la fotosíntesis que controlan las respuestas de los estomas al CO₂.
- 3) El mutante G132 tiene menor contenido de carbohidratos no estructurales, como consecuencia de una fotosíntesis reducida y regulación metabólica de la actividad enzimática (almidón) o de la expresión génica para enzimas de síntesis (fructanos). La escasez de carbohidratos y la represión génica para la glucólisis, la oxidación de pentosas fosfato, el ciclo de ácidos tricarbóxicos y el transporte electrónico mitocondrial se asocian con tasas de respiración bajas.
- 4) El crecimiento de G132 en etapas iniciales es reducido a causa de la escasa fotosíntesis y la subexpresión de genes para la formación de la pared celular y el metabolismo hormonal. Pero debido al menor peso por unidad de superficie foliar y al retraso de la senescencia, la materia seca total y la producción de grano en la madurez son similares a las de Graphic.
- 5) La fotosíntesis de G132 responde al crecimiento en CO₂ elevado más positivamente que el genotipo silvestre.
 - a) Primero, la eficiencia cuántica del Fotosistema II aumenta en el primero y no en el segundo, en asociación con aumentos y disminuciones, respectivamente, de las proteínas D1, LHCII y cyt b6.
 - b) Segundo y más importante, la expresión génica para la subunidad pequeña de Rubisco, que es mayor en el mutante, se reprime en ambos genotipos. Pero G132 no experimenta, como Graphic, disminuciones del contenido de Rubisco, o estas son moderadas.
- 6) El CO₂ elevado estimula la acumulación de carbohidratos no estructurales y de transcritos para el metabolismo de fructanos. En el genotipo silvestre este último

- puede estimularse también por efecto de la sobreexpresión de proteína quinasas dependientes de calcio (CDPK), calmodulinas y proteínas de pequeña respuesta positiva a auxina (SAURs).
- 7) El enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera estimula la expresión génica para Nitrato Reductasa, la actividad de esta enzima y el contenido de aminoácidos. La excepción con el genotipo silvestre en un experimento puede asociarse con aumentos de la exportación de compuestos nitrogenados a otros órganos con crecimiento activo.
 - 8) El descenso de Rubisco con CO₂ alto en el genotipo silvestre es selectivo, pues no hay una disminución general de la proteína foliar. Hay una readscripción de recursos a otras proteínas solubles que puede mejorar la adaptación al CO₂ elevado.
 - 9) La disminución de Rubisco en CO₂ elevado es compatible con una represión de la expresión génica para Rubisco inducida por la acumulación de carbohidratos. El bajo contenido de carbohidratos y la abundancia de transcritos para Rubisco explican la respuesta más positiva del mutante al aumento de concentración de CO₂.
 - 10) El CO₂ elevado induce más cambios transcriptómicos en el genotipo silvestre que en el mutante G132. En el primero estimula la expresión de genes para la síntesis de flavonoides, fenilpropanoides y lignina.
 - 11) Se evidencia que el CO₂ elevado no disminuye la densidad de estomas en las hojas y que disminuye la conductancia de los mismos, mejorando así la eficiencia instantánea en el uso del agua.
 - 12) El CO₂ elevado estimula la producción de biomasa, principalmente con más tallos axilares o hijos. G132 es más eficiente que el genotipo silvestre en el uso del CO₂ suplementario para producir biomasa, debido a que en el primero aumenta la superficie verde y disminuyen los transcritos para citoquinina glicosiltransferasas, favoreciendo la acción de la hormona en la producción de nuevos tallos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Acanda Y, Martinez O, Prado MJ, Gonzalez MV, Rey M. 2014. EMS mutagenesis and qPCR-HRM prescreening for point mutations in an embryogenic cell suspension of grapevine. *Plant Cell Rep* **33**, 471-481.

Ainsworth EA, Long SP. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol* **165**, 351-372.

Ainsworth EA, Rogers A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environ* **30**, 258-270.

Ainsworth EA, Rogers A, Nelson R, Long SP. 2004. Testing the "source-sink" hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitutions in *Glycine max.* *Agr Forest Meteorol* **122**, 85-94.

Ainsworth EA, Rogers A, Vodkin LO, Walter A, Schurr U. 2006. The Effects of Elevated CO₂ Concentration on Soybean Gene Expression. An Analysis of Growing and Mature Leaves. *Plant Physiol* **142**, 135-147.

Akar T, Avci M, Dusunceli F. 2004. BARLEY: Post-Harvest Operations. In: Crop TCRIFF, ed. Ankara, Turkey: FAO.

Alonso A, Perez P, Martinez-Carrasco R. 2009. Growth in elevated CO₂ enhances temperature response of photosynthesis in wheat. *Physiol Plant* **135**, 109-120.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.

Allen DJ, Ort DR. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci* **6**, 36-42.

Allen JF, de Paula WB, Puthiyaveetil S, Nield J. 2011. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci* **16**, 645-655.

Anderson PM, Oelke EA, Simmons SR. 2013. Growth and development guide for spring barley. Minnesota, USA: University of Minnesota.

Andres Z, Perez-Hormaeche J, Leidi EO, Schlucking K, Steinhorst L, McLachlan DH, Schumacher K, Hetherington AM, Kudla J, Cubero B, Pardo JM. 2014. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1806-1814.

Ap Rees T, Fuller WA, Wright BW. 1977. Measurements of glycolytic intermediates during the onset of thermogenesis in the spadix of *Arum maculatum*. *BBA - Bioenergetics* **461**, 274-282.

Aranjuelo I, Cabrera-Bosquet L, Morcuende R, Avice JC, Nogues S, Araus JL, Martinez-Carrasco R, Perez P. 2011. Does ear C sink strength contribute to overcoming photosynthetic acclimation of wheat plants exposed to elevated CO₂? *J Exp Bot* **62**, 3957-3969.

Aranjuelo I, Cabrerizo PM, Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C. 2014. Unravelling the mechanisms that improve photosynthetic performance of N₂-fixing pea plants exposed to elevated [CO₂]. *Environ Exp Bot* **99**, 167-174.

Aranjuelo I, Sanz-Sáez Á, Jauregui I, Irigoyen JJ, Araus JL, Sánchez-Díaz M, Erice G. 2013. Harvest index, a parameter conditioning responsiveness of wheat plants to elevated CO₂. *J Exp Bot* **64**, 1879-1892.

Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1-15.

Assmann SM. 1999. The cellular basis of guard cell sensing of rising CO₂. *Plant Cell Environ* **22**, 629-637.

- Aubry S, Brown NJ, Hibberd JM.** 2011. The role of proteins in C3 plants prior to their recruitment into the C4 pathway. *J Exp Bot* **62**, 3049-3059.
- Auerbach C, Robson JM.** 1946. Chemical production of mutations. *Nature* **157**, 302.
- Badr A, Muller K, Schafer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F.** 2000. On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol Biol Evol* **17**, 499-510.
- Baker NR, Harbinson J, Kramer DM.** 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant Cell Environ* **30**, 1107-1125.
- Bamforth CW.** 2003. Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review. *MBAA* **40**, 89-97.
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE, Baker NR.** 2003. Rapid, Noninvasive Screening for Perturbations of Metabolism and Plant Growth Using Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Plant Physiol* **132**, 485-493.
- Baroli I, Price GD, Badger MR, von Caemmerer S.** 2008. The contribution of photosynthesis to the red light response of stomatal conductance. *Plant Physiol* **146**, 737-747.
- Bellucci E, Bitocchi E, Rau D, Nanni L, Ferradini N, Giardini A, Rodriguez M, Attene G, Papa R.** 2013. Population Structure of Barley Landrace Populations and Gene-Flow with Modern Varieties. *PLoS ONE* **8**, e83891.
- Benjamini Y.** 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple testing. *J R Statist Soc B.* **57**, 289-300.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW.** 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res* **41**, D36-42.
- Bishop GJ, Koncz C.** 2002. Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling. *Plant Cell* **14**, S97-S110.
- Björkman O, Demmig B.** 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504.
- Bloom AJ, Asensio JS, Randall L, Rachmilevitch S, Cousins AB, Carlisle EA.** 2012. CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C3 but not C4 plants and slows growth under nitrate in C3 plants. *Ecology* **93**, 355-367.
- Bloom AJ, Burger M, A. Kimball B, J. Pinter JP.** 2014. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. *Nature Clim. Change* **4**, 477-480.
- Bloom AJ, Burger M, Rubio Asensio JS, Cousins AB.** 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* **328**, 899-903.
- Bonan GB.** 2008. Forests and Climate Change: Forcings, Feedbacks, and the Climate Benefits of Forests. *Science* **320**, 1444-1449.
- Boonman A, Prinsen E, Gilmer F, Schurr U, Peeters AJM, Voeselek LACJ, Pons TL.** 2007. Cytokinin Import Rate as a Signal for Photosynthetic Acclimation to Canopy Light Gradients. *Plant Physiol* **143**, 1841-1852.
- Bothmer RV, Seberg OLE, Jacobsen N.** 1992. Genetic resources in the Triticeae. *Hereditas* **116**, 141-150.
- Bouchez D.** 1998. Functional Genomics in Plants. *Plant Physiol* **118**, 725-732.
- Box A.** 2008. The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). In: *Government Office of the Gene Technology Regulator. Department of Health. Australian Government*, ed, 44.
- Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD.** 1997. CO₂ and Water Vapor Exchange across Leaf Cuticle (Epidermis) at Various Water Potentials. *Plant Physiol* **114**, 185-191.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH.** 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* **4**, 14.
- Buckley TN, Mott KA, Farquhar GD.** 2003. A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant Cell Environ* **26**, 1767-1785.

Bunce JA. 2001. Direct and acclimatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field. *Glob Change Biol* **7**, 323-331.

Busch FA. 2014. Opinion: the red-light response of stomatal movement is sensed by the redox state of the photosynthetic electron transport chain. *Photosynth Res* **119**, 131-140.

Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R. 2004. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* **40**, 143-150.

Carpita NC, McCann MC. 2015. Characterizing visible and invisible cell wall mutant phenotypes. *J Exp Bot.*

Cawse PA. 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* **92**, 311-315.

Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N, Ramsay L, Druka A, Stein N, Svensson JT, Wanamaker S, Bozdog S, Roose ML, Moscou MJ, Chao S, Varshney RK, Szucs P, Sato K, Hayes PM, Matthews DE, Kleinhofs A, Muehlbauer GJ, DeYoung J, Marshall DF, Madishetty K, Fenton RD, Condamine P, Graner A, Waugh R. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* **10**, 582.

Comadran J, Kilian B, Russell J, Ramsay L, Stein N, Ganai M, Shaw P, Bayer M, Thomas W, Marshall D, Hedley P, Tondelli A, Pecchioni N, Francia E, Korzun V, Walther A, Waugh R. 2012. Natural variation in a homolog of *Antirrhinum* *CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat Genet* **44**, 1388-1392.

Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674-3676.

Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 850-861.

Cramer W, Bondeau A, Woodward FI, Prentice IC, Betts RA, Brovkin V, Cox PM, Fisher V, Foley JA, Friend AD, Kucharik C, Lomas MR, Ramankutty N, Sitch S, Smith B, White A, Young-Molling C. 2001. Global response of terrestrial ecosystem structure and function to CO₂ and climate change: results from six dynamic global vegetation models. *Glob Change Biol* **7**, 357-373.

Cseke LJ, Tsai CJ, Rogers A, Nelsen MP, White HL, Karnosky DF, Podila GK. 2009. Transcriptomic comparison in the leaves of two aspen genotypes having similar carbon assimilation rates but different partitioning patterns under elevated [CO₂]. *New Phytol* **182**, 891-911.

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**, 5-17.

Chahal GS, Gosal SS. 2002. *Principles and Procedures of Plant Breeding. Biotechnological and Conventional Approaches*. Harrow, U.K.: Alpha science International Ltd.

Chan J, Crowell E, Eder M, Calder G, Bunnewell S, Findlay K, Vernhettes S, Höfte H, Lloyd C. 2010. The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule dependent and influences the texture of epidermal cell walls in *Arabidopsis* hypocotyls. *J Cell Sci* **123**, 3490-3495.

Cheng SH, Moore B, Seemann JR. 1998. Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* **116**, 715-723.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

Dahleen LS, Vander Wal LJ, Franckowiak JD. 2005. Characterization and Molecular Mapping of Genes Determining Semidwarfism in Barley. *J Hered* **96**, 654-662.

Dekker JP, Boekema EJ. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* **1706**, 12-39.

- Del Pozo A, Pérez P, Gutiérrez D, Alonso A, Morcuende R, Martínez-Carrasco R.** 2007. Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. *Environ Exp Bot* **59**, 371-380.
- Dore S, Hymus GJ, Johnson DP, Hinkle CR, Valentini R, Drake BG.** 2003. Cross validation of open-top chamber and eddy covariance measurements of ecosystem CO₂ exchange in a Florida scrub-oak ecosystem. *Glob Change Biol* **9**, 84-95.
- Drake BG, Gonzalez-Meler MA, Long SP.** 1997. MORE EFFICIENT PLANTS: A Consequence of Rising Atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 609-639.
- Drake PL, Froend RH, Franks PJ.** 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J Exp Bot* **64**, 495-505.
- Driever SM, Kromdijk J.** 2013. Will C3 crops enhanced with the C4 CO₂-concentrating mechanism live up to their full potential (yield)? *J Exp Bot* **64**, 3925-3935.
- Driever SM, Lawson T, Andralojc PJ, Raines CA, Parry MAJ.** 2014. Natural variation in photosynthetic capacity, growth, and yield in 64 field-grown wheat genotypes. *J Exp Bot* **65**, 4959-4973.
- Druka A, Franckowiak J, Lundqvist U, Bonar N, Alexander J, Houston K, Radovic S, Shahinnia F, Vendramin V, Morgante M, Stein N, Waugh R.** 2011. Genetic Dissection of Barley Morphology and Development. *Plant Physiol* **155**, 617-627.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM.** 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**, 10-14.
- Eckardt NA.** 2008. Grass Genome Evolution. *Plant Cell* **20**, 3-4.
- Edwards GE, Walker DA.** 1983. *C3 C4: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Engineer CB, Ghassemian M, Anderson JC, Peck SC, Hu H, Schroeder JI.** 2014. Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development. *Nature* **513**, 246-250.
- Ensminger ME, Ensminger AH.** 1993. *Foods and Nutrition Encyclopedia*: CRC Press.
- Ethier GJ, Livingston NJ.** 2004. On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar–von Caemmerer–Berry leaf photosynthesis model. *Plant Cell Environ* **27**, 137-153.
- Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I.** 2009. Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *J Exp Bot* **60**, 2235-2248.
- Evans JR, Poorter H.** 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ* **24**, 755-767.
- FAO.** 2009. *Agribusiness Handbook: Barley Malt Beer*. Rome, Italy.
- FAOSTAT.** 2015. Food and agriculture organization of the United Nations statistics division. Rome, Italy: FAO.
- Farage PK, McKee IF, Long SP.** 1998. Does a Low Nitrogen Supply Necessarily Lead to Acclimation of Photosynthesis to Elevated CO₂? *Plant Physiol* **118**, 573-580.
- Farquhar G, Wong S.** 1984. An Empirical Model of Stomatal Conductance. *Funct Plant Biol* **11**, 191-210.
- Farquhar GD, Von Caemmerer SV, Berry JA.** 1980. A biochemical-model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. *Planta* **149**, 78-90.
- Feller U, Anders I, Mae T.** 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J Exp Bot* **59**, 1615-1624.
- Ferrario-Méry S, Thibaud M-C, Betsche T, Valadier M-H, Foyer CH.** 1997. Modulation of carbon and nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in untransformed and transformed *Nicotiana plumbaginifolia* during CO₂ enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. *Planta* **202**, 510-521.

- Fischer K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbinger B, Weber A, Häusler RE, Flügge UI.** 1997. A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **9**, 453-462.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmes J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M.** 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell Environ* **30**, 1284-1298.
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Galmes J, Medrano H.** 2008. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* **31**, 602-621.
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R.** 2006. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant J* **48**, 427-439.
- Foyer CH, Noctor G, Hodges M.** 2011. Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *J Exp Bot* **62**, 1467-1482.
- Franks PJ, Adams MA, Amthor JS, Barbour MM, Berry JA, Ellsworth DS, Farquhar GD, Ghannoum O, Lloyd J, McDowell N, Norby RJ, Tissue DT, von Caemmerer S.** 2013. Sensitivity of plants to changing atmospheric CO₂ concentration: from the geological past to the next century. *New Phytol* **197**, 1077-1094.
- Friedrichsen DM, Joazeiro CAP, Li J, Hunter T, Chory J.** 2000. Brassinosteroid-Insensitive-1 Is a Ubiquitously Expressed Leucine-Rich Repeat Receptor Serine/Threonine Kinase. *Plant Physiol* **123**, 1247-1256.
- Fritz C, Mueller C, Matt P, Feil R, Stitt M.** 2006. Impact of the C-N status on the amino acid profile in tobacco source leaves. *Plant Cell Environ* **29**, 2055-2076.
- Fuentes D, Meneses M, Nunes-Nesi A, Araujo WL, Tapia R, Gomez I, Holuigue L, Gutierrez RA, Fernie AR, Jordana X.** 2011. A deficiency in the flavoprotein of Arabidopsis mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions. *Plant Physiol* **157**, 1114-1127.
- Fujita T, Noguchi K, Terashima I.** 2013. Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytol* **199**, 395-406.
- Fukayama H, Sugino M, Fukuda T, Masumoto C, Taniguchi Y, Okada M, Sameshima R, Hatanaka T, Misoo S, Hasegawa T, Miyao M.** 2011. Gene expression profiling of rice grown in free air CO₂ enrichment (FACE) and elevated soil temperature. *Field Crop Res* **121**, 195-199.
- Garcia-Segura JM, Orozco MM, Fominaya JM, Gavilanes JG.** 1986. Purification, molecular and enzymic characterization of an acid RNase from the insect *Ceratitis capitata*. *Eur J Biochem* **158**, 367-372.
- Garmier M, Carroll AJ, Delannoy E, Vallet C, Day DA, Small ID, Millar AH.** 2008. Complex I dysfunction redirects cellular and mitochondrial metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148**, 1324-1341.
- Gatford K, Basri Z, Edlington J, Lloyd J, Qureshi J, Brettell R, Fincher G.** 2006. Gene flow from transgenic wheat and barley under field conditions. *Euphytica* **151**, 383-391.
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R.** 2011. Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**, ra32.
- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M.** 1999. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ* **22**, 1177-1199.
- Giardi MT, Cona A, Geiken B, Kučera T, Masojídek J, Mattoo AK.** 1996. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta* **199**, 118-125.
- Golldack D, Vera P, Dietz KJ.** 2003. Expression of subtilisin-like serine proteases in Arabidopsis thaliana is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol Plant* **118**, 64-73.

- Goufo P, Pereira J, Moutinho-Pereira J, Correia CM, Figueiredo N, Carranca C, Rosa EAS, Trindade H.** 2014. Rice (*Oryza sativa* L.) phenolic compounds under elevated carbon dioxide (CO_2) concentration. *Environ Exp Bot* **99**, 28-37.
- Graner A, Kilian A, Kleinhofs A.** 2010. Barley Genome Organization, Mapping, and Synteny. *Barley*: Wiley-Blackwell, 63-84.
- Gu L, Baldocchi DD, Wofsy SC, Munger JW, Michalsky JJ, Urbanski SP, Boden TA.** 2003. Response of a Deciduous Forest to the Mount Pinatubo Eruption: Enhanced Photosynthesis. *Science* **299**, 2035-2038.
- Gu L, Pallardy SG, Tu K, Law BE, Wullschleger SD.** 2010. Reliable estimation of biochemical parameters from C_3 leaf photosynthesis-intercellular carbon dioxide response curves. *Plant Cell Environ* **33**, 1852-1874.
- Gunderson CA, Norby RJ, Wullschleger SD.** 1993. Foliar gas exchange responses of two deciduous hardwoods during 3 years of growth in elevated CO_2 : no loss of photosynthetic enhancement. *Plant Cell Environ* **16**, 797-807.
- Gutierrez D, Gutierrez E, Perez P, Morcuende R, Verdejo AL, Martinez-Carrasco R.** 2009. Acclimation to future atmospheric CO_2 levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiol Plant* **137**, 86-100.
- Gutiérrez D, Morcuende R, Del Pozo A, Martínez-Carrasco R, Pérez P.** 2013. Involvement of nitrogen and cytokinins in photosynthetic acclimation to elevated CO_2 of spring wheat. *J Plant Physiol* **170**, 1337-1343.
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre J-F, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guérineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O.** 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* **6**, 609-618.
- Haake V, Zrenner R, Sonnewald U, Stitt M.** 1998. A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J* **14**, 147-157.
- Habash D, Paul M, Parry MJ, Keys A, Lawlor D.** 1995. Increased capacity for photosynthesis in wheat grown at elevated CO_2 : the relationship between electron transport and carbon metabolism. *Planta* **197**, 482-489.
- Hare PE.** 1977. Subnanomole-range amino acid analysis. *Methods Enzymol* **47**, 3-18.
- Harrison EP, Willingham NM, Lloyd JC, Raines CA.** 1997. Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta* **204**, 27-36.
- Harwood WA.** 2011. Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *J Exp Bot*.
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K.** 2006. Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO_2 . *Nat Cell Biol* **8**, 391-397.
- Heneen WK.** 2010. Cytogenetics and Molecular Cytogenetics of Barley: A Model Cereal Crop with a Large Genome. *Barley*: Wiley-Blackwell, 112-121.
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M.** 2001. A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**, 535-551.
- Hikosaka K, Terashima I.** 1995. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C_3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant Cell Environ* **18**, 605-618.
- Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing Y-i, Eun MY, Han C-d, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H.** 2004. Rice Mutant Resources for Gene Discovery. *Plant Mol Biol* **54**, 325-334.
- Hoefnagel MHN, Atkin OK, Wiskich JT.** 1998. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *BBA - Bioenergetics* **1366**, 235-255.

- Hogan KP, Fleck I, Bungard R, Cheeseman JM, Whitehead D.** 1997. Effect of elevated CO₂ on the utilization of light energy in *Nothofagus fusca* and *Pinus radiata*. *J Exp Bot* **48**, 1289-1297.
- Horton P, Johnson MP, Perez-Bueno ML, Kiss AZ, Ruban AV.** 2008. Photosynthetic acclimation: does the dynamic structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *Febs j* **275**, 1069-1079.
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, Bohmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI.** 2010. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* **12**, 87-93; sup pp 81-18.
- Hubbart S, Bird S, Lake JA, Murchie EH.** 2013. Does growth under elevated CO₂ moderate photoacclimation in rice? *Physiol Plant* **148**, 297-306.
- Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG.** 1992. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **296**, 58-65.
- Hudson GS, Evans JR, von Caemmerer S, Arvidsson YB, Andrews TJ.** 1992. Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **98**, 294-302.
- Hymus GJ, Baker NR, Long SP.** 2001. Growth in Elevated CO₂ Can Both Increase and Decrease Photochemistry and Photoinhibition of Photosynthesis in a Predictable Manner. *Dactylis glomerata* Grown in Two Levels of Nitrogen Nutrition. *Plant Physiol* **127**, 1204-1211.
- Hymus GJ, Ellsworth DS, Baker NR, Long SP.** 1999. Does Free-Air Carbon Dioxide Enrichment Affect Photochemical Energy Use by Evergreen Trees in Different Seasons? A Chlorophyll Fluorescence Study of Mature Loblolly Pine. *Plant Physiol* **120**, 1183-1192.
- Ibrahim MH, Jaafar HZ.** 2012. Impact of elevated carbon dioxide on primary, secondary metabolites and antioxidant responses of *Eleais guineensis* Jacq. (oil palm) seedlings. *Molecules* **17**, 5195-5211.
- IBSC.** 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* **491**, 711-716.
- Ifuku K, Yamamoto Y, Ono T-a, Ishihara S, Sato F.** 2005. PsbP Protein, But Not PsbQ Protein, Is Essential for the Regulation and Stabilization of Photosystem II in Higher Plants. *Plant Physiol* **139**, 1175-1184.
- Imai K, Suzuki Y, Mae T, Makino A.** 2008. Changes in the Synthesis of Rubisco in Rice Leaves in Relation to Senescence and N Influx. *Ann Bot-London* **101**, 135-144.
- Imai K, Suzuki Y, Makino A, Mae T.** 2005. Effects of nitrogen nutrition on the relationships between the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs and the amount of ribulose 1·5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesized in the eighth leaves of rice from emergence through senescence. *Plant Cell Environ* **28**, 1589-1600.
- Ingvordsen CH, Backes G, Lyngkjær MF, Peltonen-Sainio P, Jensen JD, Jalli M, Jahoor A, Rasmussen M, Mikkelsen TN, Stockmarr A, Bagger Jørgensen R.** 2015. Significant decrease in yield under future climate conditions: Stability and production of 138 spring barley accessions. *Eur J Agron* **63**, 105-113.
- IPCC.** 2013. Climate Change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, eds. New York, USA: Cambridge University Press.
- Irving LJ, Robinson D.** 2006. A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. *New Phytol* **169**, 493-504.
- Ishida H, Nishimori Y, Sugisawa M, Makino A, Mae T.** 1997. The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* **38**, 471-479.

- Jakob SS, Rödder D, Engler JO, Shaaf S, Özkan H, Blattner FR, Kilian B.** 2014. Evolutionary History of Wild Barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) Analyzed Using Multilocus Sequence Data and Paleodistribution Modeling. *Genome Biol Evol* **6**, 685-702.
- Jang JC, Sheen J.** 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**, 1665-1679.
- Jarvis AJ, Davies WJ.** 1998. The coupled response of stomatal conductance to photosynthesis and transpiration. *J Exp Bot* **49**, 399-406.
- Jones CG, Hartley SE.** 1999. A Protein Competition Model of Phenolic Allocation. *Oikos* **86**, 27-44.
- Jones MGK, Outlaw WH, H. LO.** 1977. Enzymic assay of 10^{-7} to 10^{-14} moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol* **60**, 379-383.
- Kaiser WM, Kandlbinder A, Stoimenova M, Glaab J.** 2000. Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: What limits nitrate reduction in situ? *Planta* **210**, 801-807.
- Khandal D, Samol I, Buhr F, Pollmann S, Schmidt H, Clemens S, Reinbothe S, Reinbothe C.** 2009. Singlet oxygen-dependent translational control in the tigrina-d.12 mutant of barley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13112-13117.
- Kim S-H, Sicher RC, Bae H, Gitz DC, Baker JT, Timlin DJ, Reddy VR.** 2006. Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. *Glob Change Biol* **12**, 588-600.
- Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI.** 2010. Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 561-591.
- Klein D, Morcuende R, Stitt M, Krapp A.** 2000. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. *Plant Cell Environ* **23**, 863-871.
- Kokubun N, Ishida H, Makino A, Mae T.** 2002. The degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase into the 44-kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant Cell Physiol* **43**, 1390-1395.
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MR.** 2014. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* **203**, 44-62.
- Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Yano M.** 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1424-1429.
- Konzak CF, Wickham IM, Dekok MJ.** 1973. *Advances in methods of mutagen treatment*. Vienna: FAO/IAEA.
- Koßmann J, Sonnewald U, Willmitzer L.** 1994. Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J* **6**, 637-650.
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE.** 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* **79**, 209-218.
- La Rocca N, Rascio N, Oster U, Rudiger W.** 2001. Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of Lhc and RbcS genes. *Planta* **213**, 101-108.
- Laanemets K, Brandt B, Li J, Merilo E, Wang YF, Keshwani MM, Taylor SS, Kollist H, Schroeder JI.** 2013a. Calcium-dependent and -independent stomatal signaling network and compensatory feedback control of stomatal opening via Ca²⁺ sensitivity priming. *Plant Physiol* **163**, 504-513.
- Laanemets K, Wang YF, Lindgren O, Wu J, Nishimura N, Lee S, Caddell D, Merilo E, Brosche M, Kilk K, Soomets U, Kangasjarvi J, Schroeder JI, Kollist H.** 2013b. Mutations in the SLAC1 anion channel slow stomatal opening and severely reduce K⁺ uptake channel activity via

enhanced cytosolic $[Ca^{2+}]$ and increased Ca^{2+} sensitivity of K^+ uptake channels. *New Phytol* **197**, 88-98.

Labhart C, Nösberger J, Nelson CJ. 1983. Photosynthesis and Degree of Polymerization of Fructan during Reproductive Growth of Meadow Fescue at two Temperatures and two Photon Flux Densities. *J Exp Bot* **34**, 1037-1046.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI. 2001. Plant development. Signals from mature to new leaves. *Nature* **411**, 154.

Lawson T, Blatt MR. 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* **164**, 1556-1570.

Lawson T, Lefebvre S, Baker NR, Morison JI, Raines CA. 2008. Reductions in mesophyll and guard cell photosynthesis impact on the control of stomatal responses to light and CO_2 . *J Exp Bot* **59**, 3609-3619.

Leakey AB, Ainsworth E, Bernacchi C, Zhu X, Long S, Ort D. 2012. Photosynthesis in a CO_2 -Rich Atmosphere. In: Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD, eds. *Photosynthesis*, Vol. 34: Springer Netherlands, 733-768.

Leakey AD, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR. 2009. Elevated CO_2 effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *J Exp Bot* **60**, 2859-2876.

Lee M, Choi Y, Burla B, Kim YY, Jeon B, Maeshima M, Yoo JY, Martinoia E, Lee Y. 2008. The ABC transporter AtABC14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO_2 . *Nat Cell Biol* **10**, 1217-1223.

Lefebvre S, Lawson T, Zakhleniuk OV, Lloyd JC, Raines CA, Fryer M. 2005. Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol* **138**, 451-460.

Li P, Sioson A, Mane SP, Ulanov A, Grothaus G, Heath LS, Murali TM, Bohnert HJ, Grene R. 2006. Response diversity of Arabidopsis thaliana ecotypes in elevated $[CO_2]$ in the field. *Plant Mol Biol* **62**, 593-609.

Li X, Zhang G, Sun B, Zhang S, Zhang Y, Liao Y, Zhou Y, Xia X, Shi K, Yu J. 2013. Stimulated leaf dark respiration in tomato in an elevated carbon dioxide atmosphere. *Sci Rep* **3**, 3433.

Lilley RM, Walker DA. 1974. An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase. *Biochim Biophys Acta* **358**, 226-229.

Lin J, Jach ME, Ceulemans R. 2001. Stomatal Density and Needle Anatomy of Scots Pine (*Pinus sylvestris*) Are Affected by Elevated CO_2 . *New Phytol* **150**, 665-674.

Liu H, McNicol J, Bayer M, Morris JA, Cardle L, Marshall DF, Schulte D, Stein N, Shi BJ, Taudien S, Waugh R, Hedley PE. 2011. Highly parallel gene-to-BAC addressing using microarrays. *Biotechniques* **50**, 165-174.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402-408.

Livingston DP, 3rd, Hinch DK, Heyer AG. 2009. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2007-2023.

Loewus FA, Murthy PPN. 2000. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci* **150**, 1-19.

Logemann J, Schell J, Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant-tissues. *Anal Biochem* **163**, 16-20.

Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Fernie AR, Lunn JE, Stitt M, Usadel B. 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res* **40**, W622-W627.

Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, Tohge T, Fernie AR, Stitt M, Usadel B. 2014. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ* **37**, 1250-1258.

- Lohse M, Nunes-Nesi A, Krüger P, Nagel A, Hannemann J, Giorgi FM, Childs L, Osorio S, Walther D, Selbig J, Sreenivasulu N, Stitt M, Fernie AR, Usadel B.** 2010. Robin: An Intuitive Wizard Application for R-Based Expression Microarray Quality Assessment and Analysis. *Plant Physiol* **153**, 642-651.
- Long SP, Ainsworth EA, Leakey ADB, Nösberger J, Ort DR.** 2006. Food for Thought: Lower-Than-Expected Crop Yield Stimulation with Rising CO₂ Concentrations. *Science* **312**, 1918-1921.
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR.** 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 591-628.
- Long SP, Bernacchi CJ.** 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* **54**, 2393-2401.
- Long SP, Hällgren JE.** 1993. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. In: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC, Long SP, eds. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*: Springer Netherlands, 129-167.
- Lowry OH, Passonneau JV.** 1972. CHAPTER 9 - A COLLECTION OF METABOLITE ASSAYS. In: Passonneau OHLV, ed. *A Flexible System of Enzymatic Analysis*: Academic Press, 146-218.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lundqvist U.** 2014. Scandinavian mutation research in barley - a historical review. *Hereditas* **151**, 123-131.
- Mackintosh C.** 1992. Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *BBA - Mol Cell Res* **1137**, 121-126.
- Mackintosh C, Douglas P, Lillo C.** 1995. Identification of a Protein That Inhibits the Phosphorylated Form of Nitrate Reductase from Spinach (*Spinacia oleracea*) Leaves. *Plant Physiol* **107**, 451-457.
- Maeda H, Dudareva N.** 2012. The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 73-105.
- Makino A, Mae T.** 1999. Photosynthesis and Plant Growth at Elevated Levels of CO₂. *Plant Cell Physiol* **40**, 999-1006.
- Makino A, Shimada T, Takumi S, Kaneko K, Matsuoka M, Shimamoto K, Nakano H, Miyao-Tokutomi M, Mae T, Yamamoto N.** 1997. Does Decrease in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase by Antisense RbcS Lead to a Higher N-Use Efficiency of Photosynthesis under Conditions of Saturating CO₂ and Light in Rice Plants? *Plant Physiol* **114**, 483-491.
- Maniatis T.** 1982. *Molecular cloning : a laboratory manual* / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marcus Y, Altman-Gueta H, Finkler A, Gurevitz M.** 2003. Dual role of cysteine 172 in redox regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and degradation. *J Bacteriol* **185**, 1509-1517.
- Martínez-Carrasco R, Pérez P, Morcuende R.** 2005. Interactive effects of elevated CO₂, temperature and nitrogen on photosynthesis of wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ Exp Bot* **54**, 49-59.
- Martins MC, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav UP, Piques M, Metzner D, Stitt M, Lunn JE.** 2013. Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol* **163**, 1142-1163.
- Mascher M, Jost M, Kuon JE, Himmelbach A, Assfalg A, Beier S, Scholz U, Graner A, Stein N.** 2014. Mapping-by-sequencing accelerates forward genetics in barley. *Genome Biol* **15**, R78.
- Mascher M, Richmond TA, Gerhardt DJ, Himmelbach A, Clissold L, Sampath D, Ayling S, Steuernagel B, Pfeifer M, D'Ascenzo M, Akhunov ED, Hedley PE, Gonzales AM, Morrell PL, Kilian B, Blattner FR, Scholz U, Mayer KF, Flavell AJ, Muehlbauer GJ, Waugh R, Jeddloh JA, Stein N.** 2013. Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *Plant J* **76**, 494-505.

Mathews CK, van Holde KE. 1995. *Biochemistry, Second edition*. California, USA: The Benjamin/Cummings.

Matros A, Amme S, Kettig B, Buck-Sorlin GH, Sonnewald UWE, Mock H-P. 2006. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. *Plant Cell Environ* **29**, 126-137.

Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T, Sato K. 2011. Comprehensive Sequence Analysis of 24,783 Barley Full-Length cDNAs Derived from 12 Clone Libraries. *Plant Physiol* **156**, 20-28.

Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M. 2001. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant Cell Environ* **24**, 177-190.

Mayumi K, Shibaoka H. 1995. A Possible Double Role for Brassinolide in the Reorientation of Cortical Microtubules in the Epidermal Cells of Azuki Bean Epicotyls. *Plant Cell Physiol* **36**, 173-181.

Melkonian J, Wolfe DW, Owens TG. 2005. Effects of elevated carbon dioxide on gas exchange and photochemical and nonphotochemical quenching at low temperature in tobacco plants varying in Rubisco activity. *Photosynth Res* **83**, 63-74.

Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosche M, Kollist H. 2013. PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO₂-induced stomatal regulation. *Plant Physiol* **162**, 1652-1668.

Messinger SM, Buckley TN, Mott KA. 2006. Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. *Plant Physiol* **140**, 771-778.

Meyer C, Stitt M. 2001. Nitrate Reduction and signalling. In: Lea P, Morot-Gaudry J-F, eds. *Plant Nitrogen*: Springer Berlin Heidelberg, 37-59.

Miyazawa S-I, Hayashi K, Nakamura H, Hasegawa T, Miyao M. 2014. Elevated CO₂ Decreases the Photorespiratory NH₃ Production but Does not Decrease the NH₃ Compensation Point in Rice Leaves. *Plant Cell Physiol* **55**, 1582-1591.

Moeder W, Del Pozo O, Navarre DA, Martin GB, Klessig DF. 2007. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Mol Biol* **63**, 273-287.

Molina Cano JL, García del Moral LF, Ramos JM, Benasayag H, Brufau J. 1989. *La cebada. Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales*. Madrid: MAPA, Publicaciones de Extensión Agraria.

Moore BD, Cheng SH, Rice J, Seemann JR. 1998. Sucrose cycling, Rubisco expression, and prediction of photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ* **21**, 905-915.

Moore FC, Lobell DB. 2015. The fingerprint of climate trends on European crop yields. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 2670-2675.

Moragues M, Comadran J, Waugh R, Milne I, Flavell AJ, Russell JR. 2010. Effects of ascertainment bias and marker number on estimations of barley diversity from high-throughput SNP genotype data. *Theor Appl Genet* **120**, 1525-1534.

Morcuende R, Kostadinova S, Pérez P, Del Molino IMM, Martínez-Carrasco R. 2004. Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the fructosyltransferase-inducing trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. *New Phytol* **161**, 749-759.

Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M. 1998. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* **206**, 394-409.

- Morison JIL.** 1998. Stomatal response to increased CO₂ concentration. *J Exp Bot* **49**, 443-452.
- Mott KA.** 1988. Do Stomata Respond to CO₂ Concentrations Other than Intercellular? *Plant Physiol* **86**, 200-203.
- Mott KA.** 2009. Opinion: stomatal responses to light and CO₂ depend on the mesophyll. *Plant Cell Environ* **32**, 1479-1486.
- Mott KA, Berg DG, Hunt SM, Peak D.** 2014. Is the signal from the mesophyll to the guard cells a vapour-phase ion? *Plant Cell Environ* **37**, 1184-1191.
- Mott KA, Sibbersen ED, Shope JC.** 2008. The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant Cell Environ* **31**, 1299-1306.
- Muller HJ.** 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* **66**, 84-87.
- Muralikrishna KS, Kumar SN, Sunoj VSJ.** 2013. Elevated CO₂ and Temperature Affect Leaf Anatomical Characteristics in Coconut (*Cocos nucifera* L.). In: Sundaresan J, Sreekesh S, Ramanathan AL, Sonnenschein L, Boojh R, eds. *Climate Change and Island and Coastal Vulnerability*: Springer Netherlands, 141-153.
- Murata Y, Mori IC, Munemasa S.** 2015. Diverse Stomatal Signaling and the Signal Integration Mechanism. *Annu Rev Plant Biol* **66**, 369-392.
- Murchie EH, Pinto M, Horton P.** 2009. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytol* **181**, 532-552.
- Muschak M, Willmitzer L, Fisahn J.** 1999. Gas-exchange analysis of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase antisense potatoes at different air humidities and at elevated CO₂. *Planta* **209**, 104-111.
- Nair SK, Wang N, Turuspekov Y, Pourkheirandish M, Sinsuwongwat S, Chen G, Sameri M, Tagiri A, Honda I, Watanabe Y, Kanamori H, Wicker T, Stein N, Nagamura Y, Matsumoto T, Komatsuda T.** 2010. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided HvAP2 mRNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 490-495.
- Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K.** 2001. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J Biol Chem* **276**, 25797-25803.
- Nakano H, Makino A, Mae T.** 1997. The Effect of Elevated Partial Pressures of CO₂ on the Relationship between Photosynthetic Capacity and N Content in Rice Leaves. *Plant Physiol* **115**, 191-198.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K.** 2008. CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**, 483-486.
- Nie G, Hendrix DL, Webber AN, Kimball BA, Long SP.** 1995a. Increased Accumulation of Carbohydrates and Decreased Photosynthetic Gene Transcript Levels in Wheat Grown at an Elevated CO₂ Concentration in the Field. *Plant Physiol* **108**, 975-983.
- Nie GY, Long SP, Garcia RL, Kimball BA, Lamorte RL, Pinter PJ, Wall GW, Webber AN.** 1995b. Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant Cell Environ* **18**, 855-864.
- Nilan RA, Pearson OW.** 1975. Lack of chromosome breakage by azide in embryogenic shoots and microspores of barley. In: Newsletter BG, ed, Vol. 5, 33-35.
- Nilan RA, Sideris EG, Kleinhofs A, Sander C, Konzak CF.** 1973. Azide — a potent mutagen. *Mutat Res* **17**, 142-144.
- Nivison HT, Stocking CR.** 1983. Ribulose bisphosphate carboxylase synthesis in barley leaves: a developmental approach to the question of coordinated subunit synthesis. *Plant Physiol* **73**, 906-911.
- Noctor G, Dutilleul C, De Paepe R, Foyer CH.** 2004. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *J Exp Bot* **55**, 49-57.

- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE.** 1999. Brassinosteroid-Insensitive Dwarf Mutants of Arabidopsis Accumulate Brassinosteroids. *Plant Physiol* **121**, 743-752.
- Norby RJ, Zak DR.** 2011. Ecological Lessons from Free-Air CO₂ Enrichment (FACE) Experiments. *Annu Rev Ecol Evol S* **42**, 181-203.
- Ogawa T, Nishimura K, Aoki T, Takase H, Tomizawa K, Ashida H, Yokota A.** 2009. A phosphofructokinase B-type carbohydrate kinase family protein, NARA5, for massive expressions of plastid-encoded photosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**, 114-128.
- Olsen KM, Lea US, Slimestad R, Verheul M, Lillo C.** 2008. Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *J Plant Physiol* **165**, 1491-1499.
- Olsen O, Wang X, von Wettstein D.** 1993. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A.T-->G.C transitions in the barley Ant18 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8043-8047.
- Osborne CP, Roche JL, Garcia RL, Kimball BA, Wall GW, Pinter PJ, Morte RLL, Hendrey GR, Long SP.** 1998. Does Leaf Position within a Canopy Affect Acclimation of Photosynthesis to Elevated CO₂? : Analysis of a Wheat Crop under Free-Air CO₂ Enrichment. *Plant Physiol* **117**, 1037-1045.
- Outlaw JWH.** 2003. Integration of Cellular and Physiological Functions of Guard Cells. *Crc Cr Rev Plant Sci* **22**, 503-529.
- Ozturk ZN, Talamé V, Deyholos M, Michalowski C, Galbraith D, Gozukirmizi N, Tuberosa R, Bohnert H.** 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol* **48**, 551-573.
- Padmasree K, Padmavathi L, Raghavendra AS.** 2002. Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**, 71-119.
- Papenbrock J, Grimm B.** 2001. Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* **213**, 667-681.
- Parry MA, Keys AJ, Madgwick PJ, Carmo-Silva AE, Andralojc PJ.** 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J Exp Bot* **59**, 1569-1580.
- Parry MAJ, Reynolds M, Salvucci ME, Raines C, Andralojc PJ, Zhu X-G, Price GD, Condon AG, Furbank RT.** 2010. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *J Exp Bot*.
- Paul MJ, Knight JS, Habash D, Parry MAJ, Lawlor DW, Barnes SA, Loynes A, Gray JC.** 1995. Reduction in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO₂ assimilation and growth in low irradiance. *Plant J* **7**, 535-542.
- Pérez P, Alonso A, Zita G, Morcuende R, Martínez-Carrasco R.** 2011a. Down-regulation of Rubisco activity under combined increases of CO₂ and temperature minimized by changes in Rubisco kcat in wheat. *Plant Growth Regul* **65**, 439-447.
- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R.** 2005. Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ Exp Bot* **53**, 13-27.
- Pérez P, Rabnecz G, Laufer Z, Gutiérrez D, Tuba Z, Martínez-Carrasco R.** 2011b. Restoration of photosystem II photochemistry and carbon assimilation and related changes in chlorophyll and protein contents during the rehydration of desiccated Xerophyta scabrada leaves. *J Exp Bot* **62**, 895.
- Pollock C, Farrar J, Tomos D, Gallagher J, Lu C, Koroleva O.** 2003. Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *J Exp Bot* **54**, 489-494.

- Pollock CJ, Cairns AJ.** 1991. Fructan Metabolism in Grasses and Cereals. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 77-101.
- Pons TL, Jordi W, Kuiper D.** 2001. Acclimation of plants to light gradients in leaf canopies: evidence for a possible role for cytokinins transported in the transpiration stream. *J Exp Bot* **52**, 1563-1574.
- Poorter H, Van Berkel R, Baxter J, Den Hertog P, Dijkstra RM, Gifford KL, Griffin C, Roumet J, Roy SC, Wong.** 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C3 species. *Plant Cell Environ* **20**, 472-482.
- Portis AR, Jr., Li C, Wang D, Salvucci ME.** 2008. Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J Exp Bot* **59**, 1597-1604.
- Postel S, Kufner I, Beuter C, Mazzotta S, Schwedt A, Borlotti A, Halter T, Kemmerling B, Nurnberger T.** 2010. The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *Eur J Cell Biol* **89**, 169-174.
- Pourkheirandish M, Komatsuda T.** 2007. The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Ann Bot* **100**, 999-1008.
- Preiss J.** 1988. Biosynthesis of Starch and Its Regulation. In: Preiss J, ed. *The Biochemistry of Plants*. San Diego: Academic Press, 181-254.
- Prentice IC, Harrison SP, Bartlein PJ.** 2011. Global vegetation and terrestrial carbon cycle changes after the last ice age. *New Phytol* **189**, 988-998.
- Price GD, Caemmerer Sv, Evans JR, Siebke K, Anderson JM, Badger MR.** 1998. Photosynthesis is strongly reduced by antisense suppression of chloroplastic cytochrome b/f complex in transgenic tobacco. *Funct Plant Biol* **25**, 445-452.
- Price GD, Evans JR, von Caemmerer S, Yu JW, Badger MR.** 1995. Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta* **195**, 369-378.
- Prins A, van Heerden PD, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH.** 2008. Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *J Exp Bot* **59**, 1935-1950.
- Pritchard SG, Rogers HH, Prior SA, Peterson CM.** 1999. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Glob Change Biol* **5**, 807-837.
- Quick WP, Schurr U, Scheibe R, Schulze ED, Rodermel SR, Bogorad L, Stitt M.** 1991. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" rbcS : I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta* **183**, 542-554.
- Radchuk VV, Borisjuk L, Sreenivasulu N, Merx K, Mock H-P, Rolletschek H, Wobus U, Weschke W.** 2009. Spatiotemporal Profiling of Starch Biosynthesis and Degradation in the Developing Barley Grain. *Plant Physiol* **150**, 190-204.
- Radoglou KM, Jarvis PG.** 1990. Effects of CO₂ Enrichment on Four Poplar Clones. I. Growth and Leaf Anatomy. *Ann Bot-London* **65**, 617-626.
- Raghavendra AS, Padmasree K.** 2003. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci* **8**, 546-553.
- Raines CA.** 2006. Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C3 carbon fixation cycle. *Plant Cell Environ* **29**, 331-339.
- Raines CA, Harrison EP, Ölçer H, Lloyd JC.** 2000. Investigating the role of the thiol-regulated enzyme sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in the control of photosynthesis. *Physiol Plant* **110**, 303-308.
- Raines CA, Paul MJ.** 2006. Products of leaf primary carbon metabolism modulate the developmental programme determining plant morphology. *J Exp Bot* **57**, 1857-1862.
- Raschke K.** 1975. Stomatal Action. *Annual review of plant physiology* **26**, 309-340.

- Rautengarten C, Usadel B, Neumetzler L, Hartmann J, Bussis D, Altmann T.** 2008. A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from Arabidopsis seed coats. *Plant J* **54**, 466-480.
- Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA.** 2013. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE* **8**, e66428.
- Reid DA.** 1985. Morphology and Anatomy of the Barley Plant. In: Rasmusson DC, ed. *Barley*. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 73-101.
- Riddle OC, Suneson CA.** 1944. Crossing Studies with Male-Sterile Barley. *Agron J* **36**, 62-65.
- Riviere-Rolland H, Contard P, Betsche T.** 1996. Adaptation of pea to elevated atmospheric CO₂: Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. *Plant Cell Environ* **19**, 109-117.
- Roberts RM.** 1971. The formation of uridine diphosphate-glucuronic acid in plants. Uridine diphosphate-glucuronic acid pyrophosphorylase from barley seedlings. *J Biol Chem* **246**, 4995-5002.
- Robertson LD, Stark JC.** 1992. *Idaho Spring Barley Production Guide*. Idaho, USA: Agricultural Experiment Station.
- Rodríguez MV, Margineda M, González-Martín JF, Insausti P, Benech-Arnold RL.** 2001. Predicting Preharvest Sprouting Susceptibility in Barley. *Agron J* **93**, 1071-1079.
- Roelfsema MR, Konrad KR, Marten H, Psaras GK, Hartung W, Hedrich R.** 2006. Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid. *Plant Cell Environ* **29**, 1595-1605.
- Rogers A, Fischer BU, Bryant J, Frehner M, Blum H, Raines CA, Long SP.** 1998. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilization. Perennial ryegrass under free-Air CO₂ enrichment. *Plant Physiol* **118**, 683-689.
- Rogers A, Humphries SW.** 2000. A mechanistic evaluation of photosynthetic acclimation at elevated CO₂. *Glob Change Biol* **6**, 1005-1011.
- Rosenthal DM, Locke AM, Khozaei M, Raines CA, Long SP, Ort DR.** 2011. Over-expressing the C₃ photosynthesis cycle enzyme Sedoheptulose-1-7 Bisphosphatase improves photosynthetic carbon gain and yield under fully open air CO₂ fumigation (FACE). *BMC Plant Biol* **11**, 123.
- Rott M, Martins NF, Thiele W, Lein W, Bock R, Kramer DM, Schottler MA.** 2011. ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO₂ assimilation, and plant growth by overacidification of the thylakoid lumen. *Plant Cell* **23**, 304-321.
- Roumet C, Laurent G, Roy J.** 1999. Leaf structure and chemical composition as affected by elevated CO₂: genotypic responses of two perennial grasses. *New Phytol* **143**, 73-81.
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M.** 1999. Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci* **4**, 136-141.
- Ryan GD, Rasmussen S, Xue H, Parsons AJ, Newman JA.** 2014. Metabolite analysis of the effects of elevated CO₂ and nitrogen fertilization on the association between tall fescue (*Schedonorus arundinaceus*) and its fungal symbiont *Neotyphodium coenophialum*. *Plant Cell Environ* **37**, 204-212.
- Sabelli PA, Larkins BA.** 2009. The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiol* **149**, 14-26.
- Sage RF.** 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynth Res* **39**, 351-368.
- Sakakibara H.** 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 431-449.
- Sánchez-Rodríguez J, Martínez-Carrasco R, Pérez P.** 1997. Photosynthetic electron transport and carbon-reduction-cycle enzyme activities under long-term drought stress in *Casuarina equisetifolia* Forst. & Forst. *Photosynth Res* **52**, 255-262.

- Sano T, Kutsuna N, Hasezawa S, Tanaka Y.** 2008. Membrane trafficking in guard cells during stomatal movement: Application of an image processing technique. *Plant Signal Behav* **3**, 233-235.
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V.** 2013. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep* **32**, 1085-1098.
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M.** 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* **9**, 783-798.
- Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108.
- Scholl RL, Harper JE, Hageman RH.** 1974. Improvements of the nitrite color development in assays of nitrate reductase by phenazine methosulfate and zinc acetate. *Plant Physiol* **53**, 825-828.
- Schroder F, Lisso J, Mussig C.** 2012. Expression pattern and putative function of EXL1 and homologous genes in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **7**, 22-27.
- Schroeder JI, Hagiwara S.** 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**, 427-430.
- Schulte D, Ariyadasa R, Shi B, Fleury D, Saski C, Atkins M, deJong P, Wu CC, Graner A, Langridge P, Stein N.** 2011. BAC library resources for map-based cloning and physical map construction in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genomics* **12**, 247.
- Seifert GJ.** 2004. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 277-284.
- Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y.** 2011. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO_2 : The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environ Exp Bot* **71**, 128-136.
- Serrato AJ, de Dios Barajas-Lopez J, Chueca A, Sahrawy M.** 2009. Changing sugar partitioning in FBPAse-manipulated plants. *J Exp Bot* **60**, 2923-2931.
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singaas EL.** 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ* **30**, 1035-1040.
- Sharkey TD, Raschke K.** 1981. Separation and measurement of direct and indirect effects of light on stomata. *Plant Physiol* **68**, 33-40.
- Sharkey TD, Savitch LV, Butz ND.** 1991. Photometric method for routine determination of K_{cat} and carbamylation of Rubisco. *Photosynth Res* **28**, 41-48.
- Sicher R, Bunce J.** 1997. Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynth Res* **52**, 27-38.
- Sicher RC, Kremer DF, Rodermeil SR.** 1994. Photosynthetic Acclimation to Elevated CO_2 Occurs in Transformed Tobacco with Decreased Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Content. *Plant Physiol* **104**, 409-415.
- Sims DA, Luo Y, Seemann JR.** 1998. Comparison of photosynthetic acclimation to elevated CO_2 and limited nitrogen supply in soybean. *Plant Cell Environ* **21**, 945-952.
- Stadler LJ.** 1928. Mutations in barley induced by x-rays and radium. *Science* **68**, 186-187.
- Stitt M.** 1991. Rising CO_2 levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ* **14**, 741-762.
- Stitt M.** 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 178-186.
- Stitt M, Krapp A.** 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* **22**, 583-621.
- Stitt M, Lilley RM, Heldt HW.** 1982. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol* **70**, 971-977.
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A.** 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* **53**, 959-970.

- Stitt M, Quick WP, Schurr U, Schulze ED, Rodermeel SR, Bogorad L.** 1991. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS : II. Flux-control coefficients for photosynthesis in varying light, CO₂, and air humidity. *Planta* **183**, 555-566.
- Sun J, Gibson KM, Kiirats O, Okita TW, Edwards GE.** 2002. Interactions of nitrate and CO₂ enrichment on growth, carbohydrates, and rubisco in Arabidopsis starch mutants. Significance of starch and hexose. *Plant Physiol* **130**, 1573-1583.
- Suorsa M, Sirpio S, Allahverdiyeva Y, Paakkanen V, Mamedov F, Styring S, Aro EM.** 2006. PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II. *J Biol Chem* **281**, 145-150.
- Suzuki Y, Makino A.** 2012. Availability of Rubisco small subunit up-regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. *Plant Physiol* **160**, 533-540.
- Suzuki Y, Makino A, Mae T.** 2001. Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNAs of rbcL and rbcS in rice leaves from emergence to senescence. *Plant Cell Environ* **24**, 1353-1360.
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y.** 2001. A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Development* **128**, 4681-4689.
- Tanaka Y, Kutsuna N, Kanazawa Y, Kondo N, Hasezawa S, Sano T.** 2007. Intra-vacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant Cell Physiol* **48**, 1159-1169.
- Taub D, Wang X.** 2008. Why are Nitrogen Concentrations in Plant Tissues Lower under Elevated CO₂? A Critical Examination of the Hypotheses. *J Integr Plant Biol* **50**, 1365-1374.
- Taylor G, Street NR, Tricker PJ, Sjodin A, Graham L, Skogstrom O, Calfapietra C, Scarascia-Mugnozza G, Jansson S.** 2005. The transcriptome of Populus in elevated CO₂. *New Phytol* **167**, 143-154.
- Teng N, Wang J, Chen T, Wu X, Wang Y, Lin J.** 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of Arabidopsis thaliana. *New Phytol* **172**, 92-103.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor DW.** 2002. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J Exp Bot* **53**, 1781-1791.
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M.** 2004. MapMan: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**, 914-939.
- Thomé OW.** 1885. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Gera-Untermhaus, Deutschland: Kurt Stüber (1999).
- Tikkanen M, Mekala NR, Aro EM.** 2014. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 210-215.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL.** 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20260-20264.
- Tominaga M, Kinoshita T, Shimazaki K.** 2001. Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H(+) pumping in the plasma membrane and stomatal opening. *Plant Cell Physiol* **42**, 795-802.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tsutsumi K, Konno M, Miyazawa S, Miyao M.** 2014. Sites of action of elevated CO₂ on leaf development in rice: discrimination between the effects of elevated CO₂ and nitrogen deficiency. *Plant Cell Physiol* **55**, 258-268.
- Umbach AL, Zarkovic J, Yu J, Ruckle ME, McIntosh L, Hock JJ, Bingham S, White SJ, George RM, Subbaiah CC, Rhoads DM.** 2012. Comparison of Intact Arabidopsis thaliana Leaf Transcript

Profiles during Treatment with Inhibitors of Mitochondrial Electron Transport and TCA Cycle. *PLoS ONE* **7**, e44339.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**, W71-74.

Usadel B, Nagel A, Steinhauser D, Gibon Y, Blasing OE, Redestig H, Sreenivasulu N, Krall L, Hannah MA, Poree F, Fernie AR, Stitt M. 2006. PageMan: an interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics* **7**, 535.

Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J. 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**, 487-491.

Valluru R. 2015. Fructan and hormone connections. *Front Plant Sci* **6**.

Van Oosten JJ, Besford RT. 1995. Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant Cell Environ* **18**, 1253-1266.

Van Oosten JJ, Wilkins D, Besford RT. 1994. Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO₂ is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂? *Plant Cell Environ* **17**, 913-923.

Vanstraelen M, Benkova E. 2012. Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 463-487.

Veleminsky J, Rosichan JL, Juricek M, Kleinhofs A, Nilan RA, Gichner T. 1987. Interaction of the mutagenic metabolite of sodium azide, synthesized in vitro, with DNA of barley embryos. *Mutat Res* **181**, 73-79.

von Caemmerer S. 2013. Steady-state models of photosynthesis. *Plant Cell Environ* **36**, 1617-1630.

von Caemmerer S, Lawson T, Oxborough K, Baker NR, Andrews TJ, Raines CA. 2004. Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. *J Exp Bot* **55**, 1157-1166.

Wagner W, Wiemken A, Matile P. 1986. Regulation of Fructan Metabolism in Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiol* **81**, 444-447.

Walker DA. 1987. *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis*. Sheffield, UK: Oxgraphics Ltd.

Walters RG, Shephard F, Rogers JJ, Rolfe SA, Horton P. 2003. Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiol* **131**, 472-481.

Wang Y, Papanatsiou M, Eisenach C, Karnik R, Williams M, Hills A, Lew VL, Blatt MR. 2012. Systems dynamic modeling of a guard cell Cl⁻ channel mutant uncovers an emergent homeostatic network regulating stomatal transpiration. *Plant Physiol* **160**, 1956-1967.

Weiss E, Zohary D. 2011. The Neolithic Southwest Asian Founder Crops: Their Biology and Archaeobotany. *Curr Anthropol* **52**, S237-S254.

Whitehouse RNH. 1979. Barley. Review of D. E. Briggs. *Exp Agr* **15**, 2.

Wiebe GA, Reid DA. 1961. *Classification of barley varieties grown in the United States and Canada in 1958*. Washington: U.S. Dept. of Agriculture.

Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 1517-1529.

Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Paul Quick W. 1998. Regulation of Leaf Senescence by Cytokinin, Sugars, and Light : Effects on NADH-Dependent Hydroxypyruvate Reductase. *Plant Physiol* **116**, 329-335.

Wittwer SH, Robb WM. 1964. Carbon dioxide enrichment of greenhouse atmospheres for food crop production. *Econ Bot* **18**, 34-56.

Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD. 1985. Leaf Conductance in Relation to Rate of CO₂ Assimilation: I. Influence of Nitrogen Nutrition, Phosphorus Nutrition, Photon Flux Density, and Ambient Partial Pressure of CO₂ during Ontogeny. *Plant Physiol* **78**, 821-825.

Woodward FI. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature* **327**, 617-618.

Wostrickoff K, Stern D. 2007. Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6466-6471.

Xue S, Hu H, Ries A, Merilo E, Kollist H, Schroeder JI. 2011. Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *Embo j* **30**, 1645-1658.

Yamaguchi K, Subramanian AR. 2003. Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *Eur J Biochem* **270**, 190-205.

Yamori W, Takahashi S, Makino A, Price GD, Badger MR, von Caemmerer S. 2011. The roles of ATP synthase and the cytochrome b6/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiol* **155**, 956-962.

Yi X, Hargett SR, Frankel LK, Bricker TM. 2006. The PsbQ protein is required in Arabidopsis for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. *J Biol Chem* **281**, 26260-26267.

Yi X, Hargett SR, Frankel LK, Bricker TM. 2008. The effects of simultaneous RNAi suppression of PsbO and PsbP protein expression in photosystem II of Arabidopsis. *Photosynth Res* **98**, 439-448.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.

Zhang S, Dang QL. 2006. Effects of carbon dioxide concentration and nutrition on photosynthetic functions of white birch seedlings. *Tree Physiol* **26**, 1457-1467.

Zhu C, Zhu J, Zeng Q, Liu G, Xie Z, Tang H, Cao J, Zhao X. 2009. Elevated CO₂ accelerates flag leaf senescence in wheat due to ear photosynthesis which causes greater ear nitrogen sink capacity and ear carbon sink limitation. *Funct Plant Biol* **36**, 291-299.

Zhu XG, de Sturler E, Long SP. 2007. Optimizing the distribution of resources between enzymes of carbon metabolism can dramatically increase photosynthetic rate: a numerical simulation using an evolutionary algorithm. *Plant Physiol* **145**, 513-526.

Zhu XG, Long SP, Ort DR. 2008. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr Opin Biotechnol* **19**, 153-159.

Zhu XG, Long SP, Ort DR. 2010. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 235-261.

APÉNDICE

A.1. Resultados del microarray

A.1.1. Resultados de las diferencias entre genotipos

Transcritos diferencialmente expresados del genotipo mutante frente al silvestre en ambas concentraciones de CO₂. Se representa la razón entre los logaritmos de la tasa de cambio (Fold Change); AGRA, Graphic en CO₂ ambiente; AG132, mutante en CO₂ ambiente; EGRA, Graphic en CO₂ elevado; EG132, mutante en CO₂ elevado; BINCODE, códigos de agrupación por rutas metabólicas.

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
FOTOSÍNTESIS				
1.1.1.1	chlorophyll a b-binding protein cab- partial	-2.73	-1.02	contig949_at
1.1.1.1	chlorophyll a-b binding chloroplastic	1.03	2.89	35_395
1.1.1.1	chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like	1.65	2.92	35_28165
1.1.1.1	chlorophyll a-b binding chloroplastic	1.02	2.91	35_521
1.1.1.1	chlorophyll a-b binding chloroplastic	1.64	3.30	35_446
1.1.1.2	photosystem ii 10 kda chloroplastic-like	1.22	1.66	35_15169
1.1.1.2	psbp domain-containing protein chloroplastic-like	1.72	2.39	35_6275
1.1.1.2	psbp domain-containing protein chloroplastic-like	1.83	2.39	contig14611_at
1.1.2.2	photosystem i p700 apoprotein a1	2.54	2.59	35_31646
1.1.2.2	photosystem i p700 apoprotein a2	1.34	1.42	35_31589
1.1.2.2	photosystem i p700 apoprotein a2	2.45	2.61	35_34138
1.1.2.2	photosystem i p700 apoprotein a1	2.80	2.91	hv_cea0013j19f_at
1.1.2.2	photosystem i p700 apoprotein a1	2.48	2.56	hvsme0016d02f_at
1.1.4.1	atp synthase cf1 alpha subunit	1.28	1.35	35_12658
1.1.6	nadh-plastoquinone oxidoreductase subunit 5	1.33	1.52	35_47577
1.1.40	nadh-plastoquinone oxidoreductase subunit 7	1.34	1.40	chlrccontig3_at
1.1.40	chloroplast post-illumination chlorophyll fluorescence increase protein	1.09	1.58	35_1584
1.2.2	peroxisomal -2-hydroxy-acid oxidase glo1-like	-1.17	-1.15	35_3023
1.3.1	ribulose- -biphosphate carboxylase oxygenase large subunit	1.63	1.12	35_38001
CARBOHIDRATOS PRINCIPALES				
2.2.1.1	---NA---	-2.55	-3.37	contig101_at
2.2.1.1	fructokinase 1	-1.64	-3.20	35_472
2.2.1.1	protein kinase	1.26	1.21	contig17600_at
2.2.1.3.2	fructan 6-exohydrolase	-1.44	-1.89	contig6787_at
2.2.1.3.2	gif1	-2.39	-1.99	contig11241_at
2.2.1.3.2	beta- insoluble isoenzyme 2-like	-2.26	-2.00	35_19710
2.2.1.3.2	cell wall invertase	-1.01	-1.88	35_20258
2.2.1.3.2	beta- insoluble isoenzyme 4	-1.02	-1.42	contig9965_at
2.2.1.3.2	fructan 6-exohydrolase	-1.43	-2.09	35_2595
2.2.1.3.2	fructan exohydrolase	-1.01	-1.45	35_4551
2.2.1.3.2	glycosyl hydrolase	3.86	3.29	35_15819
2.2.1.3.2	fructan 6-exohydrolase	3.74	3.28	35_15818
2.2.1.3.3	sucrose:fructan 6-fructosyltransferase	-6.71	-4.87	ha1p12u_s_at
2.2.1.3.3	fructan:fructan 1-fructosyltransferase	-1.36	-1.90	35_15651
2.2.1.3.3	sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase	-4.52	-5.66	35_15653
2.2.1.3.3	sucrose:fructan 6-fructosyltransferase	-6.88	-5.02	35_1175
2.2.1.3.3	sucrose:fructan 6-fructosyltransferase	-6.88	-4.99	35_1173
2.2.1.3.3	beta-fructofuranosidase 1-like	1.37	1.22	35_27820
2.2.1.3.3	beta-fructofuranosidase 1-like	1.38	1.17	contig23526_at
2.2.1.3.3	beta-fructofuranosidase 1	2.06	2.03	35_369
2.2.1.4	hexokinase 1	-1.22	-1.31	35_19343
2.2.1.4	hexokinase 3	-1.35	-2.51	contig14657_at
2.2.1.4	hexokinase 3	-1.39	-2.55	35_5646
2.2.1.5	-	1.22	1.12	contig602_at
2.2.2.2	alpha-glucan h isozyme	-2.08	-1.77	contig6517_at
2.2.2.2	alpha-glucan h isozyme	-2.05	-1.73	35_2506
CARBOHIDRATOS SECUNDARIOS				
3.1.1.2	probable galacturonosyltransferase-like 9-like	-1.15	-1.60	35_17402
3.1.2.2	alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein	-2.01	-1.52	35_7583
3.1.2.2	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1-like	-2.56	-2.36	contig11464_at
3.1.2.2	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1-like	-2.04	-2.06	35_4137
3.2.2	trehalose-phosphate phosphatase	1.07	1.53	35_15232
3.2.2	trehalose-phosphate phosphatase	1.00	1.54	contig2825_at
3.2.3	probable -trehalose-phosphate synthase	2.64	3.05	35_15335
3.2.3	probable -trehalose-phosphate synthase	1.10	1.77	35_1800
3.4.3	myo-inositol-1-phosphate synthase	1.22	1.32	35_40031
3.4.4	probable inositol oxygenase	-1.26	-1.75	contig4011_at
3.4.4	probable inositol oxygenase	-1.34	-1.36	35_15535
3.5	aldo-keto reductase family 4 member c9-like	-2.60	-2.27	35_7268
3.5	aldo-keto reductase family 4 member c9-like	-1.88	-1.55	contig16232_at
3.5	myo-inositol kinase	-1.05	-1.21	35_19306

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
3.5	aldose reductase	-1.14	-1.52	35_2428
3.5	adenosine kinase	1.19	1.50	contig20263_at
3.5	adenosine kinase-like	1.16	1.45	35_10572
3.7	xylulose kinase	1.32	1.91	contig17460_at
3.7	xylulose kinase	1.06	1.10	35_24501
GLICOLÍISIS				
4.1.5	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta 1-like	-1.13	-1.46	contig2561_s_at
4.1.5	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta (eco:0000255	-1.01	-1.51	35_15071
4.1.5	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha-like	-1.06	-2.33	35_1867
4.1.8	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1.31	-1.41	35_76
4.1.13	enolase chloroplastic	-1.86	-1.59	35_8327
4.1.13	enolase chloroplastic	-1.80	-1.88	contig17025_at
4.1.14	pyruvate cytosolic isozyme	-1.17	-1.17	35_15328
4.1.14	pyruvate cytosolic isozyme	-1.21	-1.08	contig3010_s_at
4.1.14	pyruvate cytosolic isozyme	-1.04	-1.16	35_15327
4.1.14	pyruvate cytosolic isozyme-like	-1.05	-1.45	35_15127
4.1.15	phosphoenolpyruvate partial	-1.41	-1.87	contig3250_at
4.1.15	phosphoenolpyruvate carboxylase	-1.12	-1.79	35_1118
4.2.12	phosphoglycerate mutase-like	-2.17	-1.96	35_23347
4.2.12	phosphoglycerate mutase-like	-2.24	-1.79	contig18878_at
4.2.12	---NA---	-1.07	-2.48	35_24445
FERMENTACIÓN				
5.1	aldehyde dehydrogenase family 7 member a1	-2.19	-2.87	35_958
5.1	aldehyde dehydrogenase family 7 member a1	-2.11	-2.66	35_959
5.1	aldehyde dehydrogenase family 2 member c4-like	1.37	1.53	contig14339_at
5.1	aldehyde dehydrogenase family 2 member c4-like	1.41	1.47	35_2644
5.3	alcohol dehydrogenase 3	-1.89	-1.26	35_14210
5.3	alcohol dehydrogenase family-1	-2.04	-2.38	35_14207
5.3	alcohol dehydrogenase 1	-1.14	-2.07	35_42740
GLUCONEOGÉNESIS				
6.5	pyruvate orthophosphate partial	1.14	1.84	35_8200
6.5	pyruvate orthophosphate partial	1.13	1.82	35_7012
6.5	cytosolic orthophosphate dikinase	1.13	1.77	35_2054
OXIDACIÓN DE PENTOSAS FOSFATO				
7.1.1	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase chloroplastic	1.32	1.66	contig25445_at
7.1.3	6-phosphogluconate decarboxylating chloroplastic-like	-1.85	-1.01	35_2965
7.2.2	transaldolase 2	-1.27	-1.61	35_14408
7.2.2	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1	-2.00	-3.22	35_34211
7.2.2	transaldolase 2	-1.28	-1.70	contig4084_at
7.3	ferredoxin--nadp root chloroplastic	-1.89	-1.12	hu08p15u_x_at
7.3	ferredoxin--nadp root chloroplastic	-1.89	-1.12	hu08p15u_s_at
7.3	root r-b1-like	-1.87	-3.32	contig3886_at
7.3	ferredoxin--nadp root chloroplastic	-1.67	-1.05	contig5403_at
7.3	root r-b1-like	-1.14	-1.04	contig5299_at
7.3	ferredoxin--nadp root chloroplastic	-1.42	-1.07	35_2053
7.3	ferredoxin- chloroplastic-like	-1.84	-3.16	35_1296
7.3	root r-b1-like	-1.16	-1.18	35_2159
7.3	root r-b1-like	-1.79	-3.11	35_1295
CICLO DE ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS				
8.1.1.1	pyruvate dehydrogenase e1 component subunit alpha	1.08	1.78	35_37503
8.1.1.3	dihydrolipoyl dehydrogenase chloroplastic-like	-1.11	-1.18	contig5576_at
8.1.1.3	dihydrolipoyl dehydrogenase chloroplastic-like	-1.09	-1.29	35_2202
8.1.3	aconitate cytoplasmic	-1.20	-1.33	35_15074
8.1.3	aconitate cytoplasmic	-1.10	-1.18	35_15073
8.1.9	malate dehydrogenase	-1.08	-1.74	contig613_s_at
8.1.9	malate dehydrogenase	-1.05	-1.73	35_169
8.1.9	malate dehydrogenase	-0.98	-1.20	35_165
8.2.9	malate chloroplastic	-1.50	-1.85	35_15553
8.2.9	malate chloroplastic	-2.39	-2.42	35_15554
8.2.9	malate chloroplastic	-1.13	-1.58	35_15552
8.2.9	malate chloroplastic	-1.23	-1.60	35_29202
CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL Y ATP SÍNTESIS				
9.1.2	nadh dehydrogenase	-1.19	-1.69	35_1557
9.2.1.2	external alternative nad h-ubiquinone oxidoreductase mitochondrial-like	-1.11	-2.45	contig7354_at
9.2.1.2	external alternative nad h-ubiquinone oxidoreductase mitochondrial-like	-1.12	-2.40	35_2573
9.3	electron transfer flavoprotein-ubiquinone mitochondrial-like	1.08	1.51	hv06k05u_s_at
9.4	ubiquinol oxidase mitochondrial-like	-1.62	-2.82	35_21652
9.4	ubiquinol oxidase mitochondrial-like	-1.39	-2.23	contig15936_at
9.4	ubiquinol oxidase mitochondrial-like	-1.19	-1.88	35_7598
9.4	ubiquinol oxidase mitochondrial-like	-1.75	-2.89	contig5887_at
9.5	cytochrome b-c1 complex subunit 7-like	-1.16	-1.36	35_15426
9.6	cytochrome c	-1.27	-1.77	35_14600
9.6	cytochrome c biogenesis protein chloroplastic	1.10	1.21	rbah35p18_s_at
9.8	mitochondrial uncoupling protein 1-like	-1.59	-1.79	contig4193_at
9.8	mitochondrial uncoupling protein 5-like	-1.65	-2.19	contig18326_at
9.8	mitochondrial uncoupling protein 1-like	-1.54	-1.71	35_15852
9.8	mitochondrial uncoupling protein 5-like	-1.67	-2.44	35_4936
9.9	hydrogen-transporting atp rotational mechanism	-1.16	-1.47	35_18535
PARED CELULAR				
10.1.2	udp-glucose 4-epimerase	-2.11	-1.90	35_4412
10.1.3	bifunctional polymyxin resistance arna protein	-1.09	-1.48	35_1378
10.1.3	udp-d-apiose udp-d-xylose synthase 2	-1.53	-2.19	35_1377
10.1.4	udp-glucose 6- expressed	-1.13	-2.78	35_397
10.1.4	udp-glucose 6-dehydrogenase 5-like	-1.11	-2.77	35_517
10.1.5	udp-glucuronic acid decarboxylase 2-like	-1.75	-3.64	35_15131
10.1.7	gdp-mannose dehydratase 1-like	-1.42	-2.63	35_43242
10.1.9	probable udp-arabinose 4-epimerase 1	-1.20	-1.10	35_16818
10.1.10	probable rhamnose biosynthetic enzyme 1	-1.13	-2.58	35_15953
10.2.1	probable cellulose synthase a catalytic subunit 2	-1.92	-2.14	35_7148
10.2.1	truncated cellulose synthase catalytic subunit	-1.97	-2.23	35_17196
10.2.1	cellulose synthase a catalytic subunit 4	1.03	1.97	35_20775
10.2.1	cellulose synthase a catalytic subunit 7	1.26	2.27	35_4496
10.2.2	cobra-like protein 7	-1.11	-3.65	35_2850
10.2	endoglucanase 12-like	-1.15	-2.37	35_2326

Apéndice

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
10.3.2	glycosyltransferase	-1.26	-1.51	35_17824
10.3.2	probable glucuronosyltransferase os05g0123100	-0.99	-2.66	35_3199
10.3	beta- galactosyltransferase 18	-1.25	-3.01	35_7907
10.5.1.1	fasciclin-like arabinogalactan protein 7 precursor	-2.12	-4.76	35_17628
10.5.1.1	fasciclin-like arabinogalactan protein 2-like	-1.20	-1.77	35_15884
10.5.1.1	xyloglucan endotransglycosylase	-1.93	-2.09	35_37436
10.5.1.1	beta-ig-h3 domain-containing expressed	-1.37	-2.59	35_30930
10.5.1.1	fasciclin-like arabinogalactan protein 16	-1.20	-2.61	35_236
10.5.1.1	fasciclin-like protein fla25	-1.08	-2.17	35_471
10.5.1.1	fasciclin-like arabinogalactan protein 11-like	1.12	1.29	35_18313
10.5.3	leucine-rich repeat extensin-like protein 4	-1.21	-1.70	35_3896
10.5.3	tpa: leucine-rich repeat family protein	-1.39	-2.79	35_2175
10.5.5	alpha- -glucan-protein synthase	-1.13	-1.97	35_47605
10.5.5	alpha- -glucan-protein synthase	-1.34	-2.55	35_478
10.5	snf1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1-like	0.99	1.25	35_2196
10.6.1	endoglucanase 24-like	-1.70	-2.26	35_29766
10.6.1	---NA---	-2.43	-3.06	35_9428
10.6.1	endoglucanase 24-like	-2.30	-2.84	35_12558
10.6.1	endo-beta- -glucanase precursor	-1.06	-2.66	35_19424
10.6.1	lysosomal beta glucosidase-like isoform x2	-2.12	-3.72	35_1758
10.6.1	lysosomal beta glucosidase-like	2.58	2.35	35_26812
10.6.2	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 23	-2.36	-3.30	35_21642
10.6.2	probable beta-d-xylosidase 7	-1.62	-2.82	35_25018
10.6.2	alpha-l-fucosidase 1	-1.37	-1.18	35_21312
10.6.2	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 25	-2.05	-2.00	35_31565
10.6.2	probable beta-d-xylosidase 7	-2.35	-4.08	35_6513
10.6.2	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 25	-2.96	-5.31	35_422
10.6.2	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 23	-1.61	-4.41	35_398
10.6.2	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 25	-2.44	-5.93	35_177
10.6.2	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 23	-3.17	-4.96	35_411
10.6.3	floral organ regulator partial	-1.90	-4.24	35_893
10.7	probable xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 27-like	-2.37	-1.22	35_9035
10.7	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 23	-2.59	-5.28	35_499
10.7	expansin-like a1	2.09	3.25	35_19656
10.8.2	protein notum homolog	-2.41	-2.15	35_23602
10.8.2	protein notum homolog	-1.30	-1.12	35_38236
10.8.2	protein notum homolog	-2.43	-3.55	35_2112
METABOLISMO DE LÍPIDOS				
11.1.5	beta-hydroxyacyl- acp dehydratase	-1.19	-1.80	contig9102_at
11.1.5	---NA---	-1.15	-1.83	35_2638
11.1.10	3-ketoacyl- synthase 12-like	1.11	1.08	contig24680_at
11.1.10	3-ketoacyl- synthase 17	1.04	1.02	contig15532_at
11.1.10	3-ketoacyl- synthase 1-like	1.49	1.81	contig6411_at
11.1.10	3-ketoacyl- synthase 19-like	1.26	1.15	35_21462
11.1.10	3-ketoacyl- synthase 1-like	1.37	1.76	35_15183
11.1.12	acyl carrier protein 3	-1.60	-2.22	contig5579_at
11.1.12	acyl carrier protein 3	-1.87	-2.35	35_16349
11.1.31	dihydrolipoamide acetyltransferase	-1.28	-1.59	contig6806_at
11.1.31	dihydrolipoalysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase mitochondrial-like	-1.25	-1.67	35_2293
11.2.2	fatty acid 2-hydroxylase 1-like	-1.03	-3.20	contig6315_s_at
11.2.3	fatty acid desaturase	-1.73	-2.16	contig6725_at
11.2.3	omega-3 fatty acid chloroplastic-like	-1.62	-1.94	35_15047
11.3.5	diacylglycerol kinase 3-like	1.09	1.34	35_934
11.3.6	choline-phosphate cytidylyltransferase 2-like	-1.12	-1.67	35_3141
11.3.7	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.69	1.13	contig12308_at
11.3.7	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.39	1.30	contig9601_s_at
11.3.7	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.31	1.26	35_17567
11.3.7	---NA---	1.63	1.08	35_5583
11.3	phosphoethanolamine n-methyltransferase 1-like	-1.18	-1.41	contig4006_at
11.3	phosphoethanolamine n-methyltransferase 1-like	-1.25	-1.51	35_15913
11.5.2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.01	1.31	contig23957_at
11.5.2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.02	1.41	35_10447
11.6	lipid transfer protein	1.03	1.03	35_287
11.7	acyltransferase-like protein	-1.69	-1.16	35_17588
11.8.1.1	neutral ceramidase	-1.09	-1.11	contig10984_at
11.8.1.1	neutral ceramidase	-1.12	-1.22	35_4630
11.8.10	lecithin-cholesterol acyltransferase-like 4	1.09	1.38	contig8904_at
11.8	flavoprotein wrba	1.68	1.50	contig5217_at
11.8	flavoprotein wrba	1.67	1.51	35_49405
11.9.1	---NA---	-1.36	-2.48	35_26695
11.9.2.1	phospholipase a1-ii 7-like	-1.39	-2.99	35_47874
11.9.2.1	phospholipase a1- chloroplastic-like	-2.54	-1.41	contig6611_at
11.9.2.1	phospholipase a1- chloroplastic-like	-2.54	-1.61	35_17175
11.9.2	gds1 esterase lipase at1g28580-like	-1.63	-1.11	35_17156
11.9.2	phospholipase a1-ii 5	1.03	1.28	35_5060
11.9.2	lipase precursor	1.08	1.31	35_3271
11.9.2	phospholipase a1-ii 5	1.17	1.39	contig14384_at
11.9.2	lipase precursor	1.25	1.41	contig9211_at
11.9.3.2	gibberellin receptor gid112	-1.33	-2.68	35_20809
11.9.3.3	probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1-like	-2.60	-4.51	contig7184_at
11.9.3.3	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1	-1.38	-2.32	35_17079
ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO				
12.1.1	nitrate reductase	-3.70	-2.24	contig13776_at
12.1.1	nitrate reductase	-4.13	-2.35	35_6525
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS				
13.1.1.1.1	glutamate decarboxylase	-1.91	-3.70	35_14142
13.1.1.1.1	glutamate decarboxylase-like	1.03	1.87	35_13143
13.1.1.1.2	aminotransferase y4ub	1.63	2.73	contig25090_at
13.1.1.1.2	aminotransferase y4ub	1.57	2.86	35_27816
13.1.1.2.1	aspartate aminotransferase	-1.17	-1.77	35_15149
13.1.1.2.1	aspartate mitochondrial	-1.05	-1.46	contig2799_at
13.1.1.3.11	alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog mitochondrial-like	-1.40	-2.42	contig7739_at
13.1.1.3.11	alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog mitochondrial-like	-1.31	-2.28	35_2395

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
13.1.2.2.1	---NA---	-3.78	-4.79	contig3814_at
13.1.2.2.1	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	-4.46	-5.59	35_15808
13.1.3.1.1	asparagine synthetase	3.42	2.11	hv11o04r_s_at
13.1.3.1.1	asparagine synthetase	1.07	2.06	contig2562_s_at
13.1.3.1.1	asparagine synthetase	3.20	1.94	35_798
13.1.3.2.1	threonine chloroplastic-like	-1.33	-2.14	contig10838_at
13.1.3.2.1	threonine chloroplastic-like	-1.43	-2.15	35_3202
13.1.3.4.12	methyltransferase-like protein 13 isoform x1	-1.23	-1.43	35_20451
13.1.3.4.12	methyltransferase-like protein 13 isoform x1	-1.18	-1.33	35_20452
13.1.3.4.12	uncharacterized methyltransferase chloroplastic	1.17	1.59	35_18054
13.1.4.1.2	ketol-acid chloroplastic-like	-1.02	-1.22	35_730
13.1.4.5.1	threonine dehydratase chloroplastic-like	-1.33	-1.50	contig11390_at
13.1.4.5.1	threonine dehydratase chloroplastic-like	-1.29	-1.53	35_19453
13.1.5.1.1	d-3-phosphoglycerate chloroplastic-like	-1.53	-2.46	35_16267
13.1.5.1.1	d-3-phosphoglycerate chloroplastic-like	-1.45	-2.53	contig5494_at
13.1.5.1.3	phosphoserine chloroplastic	-1.61	-1.95	35_12762
13.1.5.1.3	phosphoserine chloroplastic	-1.71	-2.06	contig6830_at
13.1.5.3.1	---NA---	-3.10	-2.96	35_14703
13.1.5.3.1	cysteine expressed	1.04	1.96	contig1302_at
13.1.5.3.1	probable s-sulfocysteine chloroplastic isoform x2	1.03	1.04	35_22023
13.1.5.3.1	small nuclear ribonucleoprotein sm d3-like	1.01	1.94	35_14708
13.1.6.1.5	shikimate kinase	-1.30	-2.39	contig9197_at
13.1.6.1.5	shikimate kinase	-1.44	-2.61	35_3492
13.1.6.1.6	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	-1.06	-1.75	35_16652
13.1.6.1.7	embryo defective 1144	-1.12	-1.50	contig5108_s_at
13.1.6.1.7	chorismate synthase	-1.15	-1.76	35_2091
13.1.6.3.1	arogenate dehydratase prephenate dehydratase chloroplastic	-1.29	-1.08	contig6733_at
13.1.6.3.1	arogenate dehydratase prephenate dehydratase chloroplastic	-1.50	-1.07	35_2751
13.1.6.3.1	arogenate dehydratase prephenate dehydratase chloroplastic-like	-1.73	-1.44	35_2750
13.1.6.5.2	anthranilate phosphoribosyltransferase	-1.30	-2.15	35_16371
13.1.6.5.2	anthranilate chloroplastic	-1.02	-1.54	contig5883_s_at
13.1.6.5.4	indole-3-glycerol phosphate chloroplastic-like	-1.24	-2.44	35_17044
13.1.6.5.4	indole-3-glycerol phosphate chloroplastic	-1.22	-2.29	contig6407_s_at
13.2.2.2	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-1.27	-1.44	contig2524_s_at
13.2.2.2	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-1.31	-1.46	35_1160
13.2.2.2	probable aldehyde dehydrogenase isoform x1	-1.33	-1.45	35_1161
13.2.2.2	proline dehydrogenase mitochondrial-like	2.75	2.01	35_18196
13.2.2.2	proline dehydrogenase mitochondrial-like	3.65	2.10	contig68_at
13.2.2.3	urease isoform x2	1.10	1.74	35_45479
13.2.2.3	urease accessory protein g	1.35	2.06	contig25582_at
13.2.2.3	urease accessory protein g	1.33	2.08	35_5034
13.2.3.1.1	probable isoaspartyl peptidase l-asparaginase 2	3.30	2.17	35_19212
13.2.3.1.1	isoaspartyl peptidase l-asparaginase 2	3.79	4.25	contig8739_at
13.2.3.1.1	probable isoaspartyl peptidase l-asparaginase 2	2.12	1.01	35_46501
13.2.3.1.1	probable isoaspartyl peptidase l-asparaginase 2	3.27	2.59	35_19213
13.2.3.1.1	isoaspartyl peptidase l-asparaginase 2	4.08	2.33	contig8740_at
13.2.3.4	adenosylhomocysteinase	-1.24	-1.55	35_14559
13.2.3.4	adenosylhomocysteinase	-1.25	-1.25	contig1794_s_at
13.2.3.4	s-adenosyl-l-homocysteinase hydrolase	-1.20	-1.07	contig1791_x_at
13.2.3.4	s-adenosylhomocystein hydrolase 2	-1.24	-2.28	35_14558
13.2.3.5.1	cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase log1-like	2.07	2.22	35_20261
13.2.3.5	lysine-ketoglutarate reductase saccharopine dehydrogenase1	-1.52	-1.14	35_17195
13.2.3.5	lysine-ketoglutarate reductase saccharopine dehydrogenase1	-1.47	-1.07	contig7064_s_at
13.2.4.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha mitochondrial isoform x1	1.34	1.88	contig4891_at
13.2.4.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha mitochondrial isoform x1	1.40	1.90	35_1675
13.2.5.2	l-allo-threonine aldolase	-1.29	-1.31	35_5474
13.99	act domain containing expressed	1.60	2.42	35_20647
13.99	act domain containing expressed	1.93	2.87	35_6955
ASIMILACIÓN DE AZUFRE				
14.1	atp sulfurylase	1.75	2.68	35_13732
14.1	atp sulfurylase	1.74	2.74	contig2776_at
14.1	atp sulfurylase	1.51	2.25	ht11a06u_s_at
MANEJO DE METALES				
15.1	cytochrome c oxidase copper chaperone	-1.10	-1.37	35_19098
15.1	ferric reduction oxidase chloroplastic-like	1.04	2.24	35_24257
15.2	glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase 1	-1.03	-1.15	35_7385
15.2	ferritin- chloroplastic	-2.11	-3.10	35_15437
15.2	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26-like	1.14	1.74	contig11751_at
15.2	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26-like	1.09	1.80	35_20149
15.2	germin-like protein 5-1	1.24	1.12	35_4241
15.3	vacuolar iron transporter -like	1.37	1.93	35_4258
15	cadmium-induced protein	1.07	1.31	35_44897
15	stem-specific protein tsjt1-like	1.16	1.91	35_14813
15	stem-specific protein tsjt1	1.18	1.84	35_14809
15	selenium-binding protein 1	1.12	2.34	35_894
METABOLISMO SECUNDARIO				
16.1.2.2	hydroxymethylglutaryl- synthase-like	-1.07	-1.26	35_3495
16.1.3.3	2-methyl-6-phytyl- hydroquinone methyltransferase chloroplastic-like	1.07	1.26	35_13815
16.1.4.2	phytoene desaturase	1.41	1.70	35_2352
16.1.4.10	carotenoid (9)-cleavage dioxygenase 1-like	-1.02	-1.76	35_9271
16.1.4	phytoene chloroplastic chromoplastic	1.21	1.47	35_26961
16.1.5	(+)-delta-cadinene synthase isozyme c2	2.20	1.78	35_6186
16.1.5	(+)-delta-cadinene synthase isozyme c2	1.37	1.04	35_6134
16.1.5	(+)-delta-cadinene synthase isozyme c2	1.72	1.11	35_43327
16.1.5	linalool chloroplastic	1.88	2.17	35_19219
16.1.5	linalool chloroplastic	1.18	1.52	35_18750
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	-1.92	-3.10	35_14238
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	-1.19	-2.29	35_14224
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	-1.10	-1.97	35_14228
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	-1.30	-1.53	35_14239
16.2.1.2	trans-cinnamate 4-monoxygenase	-1.15	-1.82	35_865
16.2.1.3	4-coumarate- ligase	-2.08	-3.28	35_5528
16.2.1.3	amp-dependent synthetase and ligase superfamily protein	-1.04	-3.97	35_1744
16.2.1.4	shikimate o-hydroxycinnamoyltransferase-like	-1.45	-2.30	35_16665

Apéndice

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
16.2.1.4	shikimate o-hydroxycinnamoyltransferase-like	1.59	1.23	35_7418
16.2.1.6	caffeoyl- 3-o-methyltransferase 1	-1.07	-2.15	35_14092
16.2.1.7	cinnamoyl reductase	1.29	1.62	35_16543
16.2.1.8	cytochrome p450 71d10	-2.18	-3.61	35_27261
16.2.1.10	cinnamyl alcohol dehydrogenase 5	-1.54	-1.70	35_8324
16.2.1	udp-glycosyltransferase-like protein	-1.64	-1.09	35_21909
16.2	cinnamoyl- reductase 1-like	-1.13	-1.43	35_29795
16.2	uncharacterized acetyltransferase at3g50280-like	2.94	3.23	35_24654
16.2	uncharacterized acetyltransferase at3g50280-like	1.91	1.92	35_13141
16.4.1	aromatic-l-amino-acid decarboxylase	-1.32	-1.64	35_30956
16.4.1	protein yls2-like	-2.40	-3.34	35_15175
16.4.1	aromatic-l-amino-acid decarboxylase	-1.06	-1.41	contig11623_at
16.4.2.1	betaine aldehyde dehydrogenase	-1.63	-1.58	35_15384
16.5.1.1.1.7	cytochrome p450 71c4	-2.18	-3.70	35_7889
16.8.1	flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	-2.39	-2.27	35_20228
16.8.2.1	chalcone synthase	1.05	1.24	35_18204
16.8.2.1	chalcone synthase	1.10	1.27	35_18205
16.8.2	chalcone--flavonone isomerase	-1.84	-1.00	35_2198
16.8.3	anthocyanidin -o-glucosyltransferase-like	-1.41	-1.61	35_12395
16.8.4	protein srg1	2.01	2.30	contig12782_at
16.8.4	flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	1.11	1.84	35_36806
16.8.4	protein srg1	2.05	2.35	35_20573
16.8.5.1	isoflavone reductase homolog irl-like	2.13	3.65	35_1704
HORMONAS				
17.1.1.1.12	probable aldehyde oxidase 2	1.21	1.22	35_16307
17.1.1.1.12	aldehyde oxidase 2	1.32	1.29	contig4920_s_at
17.1.1.2.1	aba 8 -hydroxylase	1.27	1.35	35_5350
17.1.2	protein phosphatase 2c abi2	1.14	1.31	35_9808
17.1.3	protein phosphatase 2c	-1.74	-1.69	35_4627
17.1.3	gem-like protein 4-like	2.90	1.73	contig16985_at
17.2.2	sorting nexin 2b-like	-1.18	-1.17	35_20914
17.2.3	probable aldo-keto reductase 2-like	-1.37	-1.65	35_15540
17.2.3	iaa9 - auxin-responsive aux iaa family member	1.05	1.34	contig16924_at
17.2.3	auxin-repressed kda protein	2.79	2.36	35_30677
17.2.3	auxin-repressed kda protein	4.57	5.15	35_14650
17.2.3	ferric-chelate reductase 1-like	1.09	1.40	35_16640
17.2.3	aux iaa protein	1.29	2.16	contig15125_at
17.2.3	stem-specific protein tsjt1-like	4.07	2.63	35_16112
17.2.3	stem-specific protein tsjt1-like	3.85	2.52	35_16111
17.2.3	saur56 - auxin-responsive saur family member	1.07	1.03	35_18455
17.2.3	auxin-repressed kda	2.26	2.16	contig1762_s_at
17.3.1.1.5	cytochrome p450 734a1-like	1.02	1.60	35_28768
17.3.1.2.99	squalene monooxygenase	-1.05	-1.58	35_16514
17.3.2.99	somatic embryogenesis receptor kinase 1-like	-1.44	-2.62	contig3638_at
17.3.2.99	somatic embryogenesis receptor kinase 2-like isoform x1	-1.72	-3.00	35_15306
17.3.2.99	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 precursor	-1.54	-3.10	35_15510
17.4.1	cyanhydrin beta-glucosyltransferase	-1.56	-1.12	35_22356
17.4.1	cytokinin dehydrogenase	-1.88	-1.63	35_13504
17.4.1	cytokinin dehydrogenase 5-like	1.92	2.09	35_25659
17.4.1	cytokinin dehydrogenase 5-like	1.12	1.09	35_9745
17.5.1.2	l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	-1.00	-1.57	35_573
17.5.1	protein srg1	-1.63	-1.49	35_12578
17.5.2	ethylene-responsive transcription factor 2	1.64	1.59	35_3452
17.5.3	transcription factor bhllh1 13-like	-1.41	-3.49	35_4715
17.5.3	adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein isoform 1	-1.22	-1.44	35_1307
17.6.1.2	syn-pimara- diene synthase	-1.07	-1.77	35_40511
17.6.1.13	gibberellin 2-oxidase	-1.50	-3.54	35_19338
17.7.1.2	lipoxygenase 1	-1.86	-1.54	35_14194
17.7.1.2	partial	-1.44	-3.58	contig1737_at
17.7.1.2	lipoxygenase	-1.47	-3.56	35_14195
17.7.1.2	tpa: tassel seed1	-1.04	-1.60	contig26335_at
17.7.1.2	lipoxidase domain partial	-3.10	-2.10	contig2305_at
17.7.1.2	lipoxygenase chloroplastic	-2.80	-2.08	35_14643
17.7.1.2	lipoxidase domain partial	-3.02	-2.41	contig2306_s_at
17.7.1.2	lipoxygenase chloroplastic	-1.89	-1.72	35_14644
17.7.1.2	lipoxygenase-1	-1.84	-1.59	contig1736_at
17.7.1.2	partial	-1.83	-1.33	contig12574_at
17.7.1.3	allene oxide partial	-3.36	-4.02	35_857
17.7.1.4	allene oxide cyclase 4	-1.98	-2.97	35_1757
17.7.1.4	-	-1.91	-2.87	contig4986_at
17.7.1.10	jasmonate o-methyltransferase	-1.19	-2.77	35_19375
17.7.2	protein tify 10a-like	-1.24	-2.10	35_4009
CO-FACTORES Y VITAMINAS				
18.4.5	pantothenate kinase-like	-1.03	-1.53	35_2139
18.5.2.1	isochorismate synthase chloroplastic-like	1.37	1.98	35_18276
18.5.2.7	-	1.82	2.07	35_3001
ESTRÉS				
20.1.1	respiratory burst oxidase homolog protein b-like	-1.09	-1.04	35_16929
20.1.5	probable gtp diphosphokinase chloroplastic	1.57	1.42	35_18006
20.1.7	pathogenesis-related protein 1	-1.08	-1.65	35_24518
20.1.7	pathogenesis-related protein 5	-1.99	-3.25	35_15377
20.1.7	pathogenesis-related protein 5	-2.03	-3.13	35_38976
20.1.7	thaumatin-like protein	-2.93	-4.47	af016328_at
20.1.7	pathogenesis-related protein 1	-2.11	-3.01	35_703
20.1.7	pathogenesis-related maize seed protein	-2.12	-3.52	35_704
20.1.7	pathogenesis-related maize seed protein	-2.12	-3.02	35_705
20.1.7	pathogenesis-related maize seed protein	-2.19	-3.51	35_702
20.1.7	probable protein pop3-like	1.76	1.44	35_4776
20.1.7	probable protein pop3-like	1.49	1.24	35_4775
20.1.7	probable protein pop3-like	1.74	1.46	35_4777
20.1	disease resistance protein rga2	-1.11	-1.21	35_28032
20.1	chitinase 5-like	-1.33	-2.37	35_15621
20.1.7	thaumatin-like protein 1b	-1.01	-2.40	35_18772
20.1	chitinase 5-like	-1.32	-3.26	35_15622

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
20.1.7	thaumatin-like protein 1b	-1.91	-1.79	35_10341
20.1.7	af355457_1thaumatin-like protein tlp7	-3.23	-4.90	35_14144
20.1.7	pathogenesis-related protein 5	-1.66	-2.64	35_15380
20.1	---NA---	-2.19	-3.35	35_17346
20.1.7	af355457_1thaumatin-like protein tlp7	-3.14	-4.92	contig2790_s_at
20.1	pr17c precursor	-1.49	-2.75	35_210
20.1	barw_horvu ame: full=barwin	-2.15	-3.32	35_773
20.1	chitinase 8	-2.96	-4.24	35_886
20.1	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit dad1-like	-1.12	-1.44	35_1999
20.1	chitinase 8	-3.68	-4.45	35_882
20.1	achain three-dimensional structure in solution of a protein from barley seed	-2.38	-3.75	35_772
20.1.7	pathogenesis-related protein 4	-1.89	-3.18	35_774
20.1	pr17d precursor	-1.34	-3.19	35_414
20.1	vamp protein sec22	-1.10	-1.02	35_4083
20.1	pr17c precursor	-1.70	-2.94	35_249
20.1.7	pathogenesis-related protein prms	-1.92	-2.09	35_4903
20.1	hornerin-like isoform x1	1.41	1.94	35_8052
20.1	isoform 2	1.24	1.70	35_31450
20.2.1	dnaj homolog subfamily b member 4-like	-1.13	-1.80	contig7490_at
20.2.1	dnaj protein erdj3a	-1.45	-1.52	35_10479
20.2.1	dnaj homolog subfamily b member 4-like	-1.04	-1.65	35_17452
20.2.1	endoplasmic homolog	-1.24	-2.61	35_14103
20.2.1	luminal-binding protein	-1.31	-2.92	35_14470
20.2.1	endoplasmic homolog	-1.20	-2.27	35_14098
20.2.1	er molecular chaperone	-1.38	-3.03	35_28100
20.2.1	heat shock 70 kda protein 17	-1.17	-1.95	35_1571
20.2.1	3fe-4s ferredoxin	1.08	2.99	35_4479
20.2.1	kda class v heat shock protein	1.09	1.46	35_5795
20.2.2	peroxidase 1-like	-2.31	-2.32	35_3998
20.2.2	peroxidase 24 precursor	-2.93	-6.69	35_5205
20.2.3	probable methyltransferase pmt26	-1.46	-1.99	35_16067
20.2.3	probable methyltransferase pmt26	-1.44	-2.05	35_16066
20.2.3	probable methyltransferase pmt26	-1.42	-1.94	contig7681_s_at
20.2.3	calcium permeable stress-gated cation channel 1-like	1.07	1.12	35_7605
20.2.99	oxalate oxidase gf-	-1.92	-3.50	contig3017_at
20.2.99	oxalate oxidase gf-	-2.31	-4.00	35_15274
20.2.99	germin-like protein	-2.02	-2.68	35_14823
20.2.99	germin-like protein subfamily 3 member 2	-2.76	-4.32	35_21702
20.2.99	germin-like protein	-1.93	-2.66	35_14822
20.2.99	germin-like protein 3-7	-1.04	-2.58	contig10860_at
20.1.7	af355457_1thaumatin-like protein tlp7	-3.00	-3.96	35_14143
20.1.7	gamma-glutamyltranspeptidase 1-like	-1.34	-2.28	35_21695
20.1.7	pathogenesis-related thaumatin-like protein	-3.22	-5.10	35_15708
20.1.7	thaumatin-like protein	-2.13	-2.31	contig3947_s_at
20.1.7	pathogenesis-related thaumatin-like protein	-3.32	-4.91	contig3667_s_at
20.1.7	thaumatin-like protein	-2.27	-2.31	35_27334
20.2	slt1 protein	1.11	1.53	35_17058
20	cysteine-rich receptor-like protein kinase 20	-1.90	-2.89	35_20518
20	cysteine-rich receptor-like protein kinase 20	-2.53	-2.74	35_10585
20	cysteine-rich receptor-like protein kinase 10-like	-1.31	-2.64	35_22792
20	serine threonine kinase protein	-1.96	-2.50	35_6100
20	cysteine-rich receptor-like protein kinase 10	-1.72	-1.99	35_40035
REDOX				
21.1.1	protein disulfide isomerase	-1.44	-2.68	35_14571
21.1.1	pdi-like protein	-1.16	-2.13	35_675
21.1	ferredoxin-thioredoxin reductase catalytic chloroplastic-like	-1.11	-0.99	35_929
21.1	thioredoxin chloroplastic-like	1.30	2.11	35_18066
21.1	thioredoxin-like 1	2.06	1.75	35_1841
21.1	thioredoxin-like protein chloroplastic	1.26	1.33	35_4882
21.1	thioredoxin-like 1- chloroplastic-like	1.85	1.58	35_1840
21.2.1	l-ascorbate oxidase-like	-1.63	-1.51	35_22942
21.2.1	l-ascorbate oxidase-like	-1.81	-4.74	35_2438
21.2.1	dehydroascorbate reductase	1.07	1.31	35_18329
21.2.1	dehydroascorbate reductase	1.03	1.22	35_18328
21.3	heme-binding-like protein chloroplastic	1.59	2.26	35_12960
21.4	glutaredoxin-c14	-1.16	-1.48	35_39570
21.4	glutaredoxin domain-containing cysteine-rich protein cg12206	1.06	1.43	35_22177
POLIAMINAS				
22.1.3	arginine decarboxylase	-2.47	-5.03	35_16297
22.1.7	spermidine synthase	-1.02	-1.01	35_1500
22.1.7	spermidine synthase	-1.02	-0.99	35_1502
22.2.1	polyamine oxidase	1.54	1.23	35_15497
22.2.1	polyamine oxidase	1.03	1.27	35_15498
METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS				
23.1.1.3	mitochondrial-like isoform x2	-1.04	-1.35	35_7130
23.1.1.10	ctp synthase	1.83	1.66	35_16331
23.1.3	ribose-phosphate pyrophosphokinase 4	-1.54	-1.57	contig11768_at
23.1.3	ribose-phosphate pyrophosphokinase 4-like	-1.52	-1.70	35_5430
23.2.2	ureide permease 2-like	1.52	1.43	35_30827
23.2.2	ureide permease expressed	1.64	1.48	35_2328
23.2.2	ureide permease 2-like	1.03	1.94	35_2809
23.2	cytidine deaminase 1-like	-1.86	-1.84	35_21007
23.2	tpa: apyrase family protein	-1.45	-2.31	35_17092
23.2	pap-specific mitochondrial	1.27	1.86	35_27794
23.2	pap-specific mitochondrial-like	1.25	1.74	35_24291
23.3.3	nudix hydrolase 3	-1.00	-1.19	35_16309
23.3.3	nudix hydrolase 4	1.02	1.16	35_14735
23.3.3	nudix hydrolase 8-like	2.29	3.07	35_4058
23.3	deoxycytidine kinase	1.10	1.23	35_984
23.4.1	adenylate kinase mitochondrial-like	-1.21	-1.61	35_16021
23.4.1	adenylate kinase mitochondrial-like	-1.31	-1.88	35_16019
23.4.10	---NA---	-1.26	-2.11	35_610
23.4.99	soluble inorganic pyrophosphatase	-1.21	-2.95	35_21600
23.5.4	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit-like	-1.62	-1.81	35_2243

Apéndice

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
BIODEGRADACIÓN				
24.2	lactoylglutathione lyase	-1.29	-1.59	35_118
METABOLISMO C1				
25.1	formate mitochondrial	-1.17	-1.43	35_14430
25.4	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase-like protein cog0212	1.20	1.61	35_20048
25.4	methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing	1.07	1.62	35_20047
MISCELÁNEA				
26.1	secologanin synthase	-1.37	-1.94	35_20923
26.1	premnaspirodiene oxygenase-like	-2.89	-1.71	35_20987
26.1	cytochrome p450 71c4	-2.30	-3.78	35_15962
26.1	cytochrome p450 76c2	-3.16	-4.16	35_26516
26.1	endo- -beta-d-glucanase-like	-1.03	-1.26	35_5440
26.1	nitronate monooxygenase	-0.99	-1.55	35_2095
26.1	cytochrome p450 734a6-like	1.19	1.85	35_7512
26.1	cytochrome p450 89a2-like	1.41	2.06	35_21103
26.1	protein	1.08	1.32	35_20495
26.1	cytochrome p450 71d7	1.12	1.57	35_37332
26.1	secologanin synthase	1.22	1.91	35_21707
26.2	udp-glycosyltransferase 87a1-like	-2.20	-2.50	35_8135
26.2	anthocyanidin -o-glucosyltransferase	-1.76	-1.30	35_18634
26.2	anthocyanidin -o-glucosyltransferase	-1.28	-1.09	35_27475
26.2	udp-glycosyltransferase 86a1	-1.13	-1.12	35_18931
26.2	probable galacturonosyltransferase 7	-2.27	-2.35	35_24732
26.2	udp-glycosyltransferase 83a1-like	4.03	3.97	35_6409
26.3.1	alpha-xylosidase 1-like	-1.25	-1.86	35_16772
26.3.1	alpha-glucosidase	-1.33	-1.52	35_16369
26.3.1	alpha-xylosidase family protein	-1.04	-1.07	35_18948
26.3.1	alpha-xylosidase 2	1.24	3.02	35_20999
26.3	protochlorophyllide-dependent translocon component chloroplastic-like	-1.35	-1.28	35_12319
26.3	beta-glucosidase 4	-1.09	-1.55	35_20377
26.3	b chain semi-active e176q mutant of rice a plant - glucosidase	-2.27	-2.63	35_620
26.3	beta-glucosidase isozyme 2 precursor	-1.17	-1.95	35_2767
26.3	2fe-2s ferredoxin-like superfamily protein	1.06	1.38	35_4633
26.4.1	beta- -glucanase	-3.08	-4.44	35_13456
26.4.1	beta- -glucanase precursor	-1.47	-3.65	35_21595
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 8-like	-1.08	-2.51	35_6267
26.4.1	beta glucanase	-5.35	-6.05	35_18544
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase-like	-1.23	-2.79	35_17424
26.4.1	endo-beta- -glucanase	-2.55	-2.68	35_19162
26.4.1	beta- -glucanase	-3.35	-4.86	35_234
26.4.1	beta- -glucanase	-2.30	-2.87	35_426
26.4.1	beta- -glucanase	-3.67	-6.01	35_445
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 8-like	1.41	1.08	35_24527
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 14	1.13	1.97	35_5392
26.4.1	glucan endo- -beta-d-glucosidase	2.92	1.80	35_406
26.4.1	endo- -beta-glucanase	1.07	1.67	35_5748
26.6	caffeic acid 3-o-methyltransferase	-0.86	-2.15	35_1884
26.6	o-methyltransferase zrp4	2.14	1.90	35_17869
26.6	o-methyltransferase zrp4	1.74	1.06	35_1280
26.7	blue copper protein	-1.73	-3.50	35_15288
26.7	proyl 4-hydroxylase subunit alpha-1-like	-1.33	-1.66	35_20383
26.7	chloroplastic quinone-oxidoreductase	-1.61	-4.06	35_21096
26.7	flavin-containing monooxygenase 1	-2.13	-3.66	35_7901
26.7	flavin-containing monooxygenase 1	-1.59	-2.66	35_3562
26.7	probable flavin-containing monooxygenase 1	1.64	2.33	35_12682
26.7	probable flavin-containing monooxygenase 1	1.90	3.76	35_24704
26.8	glutamyl-trna amidotransferase subunit a	1.30	2.27	35_19557
26.8	alpha-n-acetylglucosaminidase-like	1.01	1.31	35_27353
26.9	probable glutathione s-transferase gstu6-like	-1.32	-3.30	35_16367
26.9	glutathione transferase gst 23-like	-1.07	-2.00	35_17226
26.9	glutathione s-transferase	-1.85	-2.97	35_2199
26.9	glutathione s-transferase fl1-like	1.10	2.36	35_16558
26.9	peroxidase 70	1.30	2.47	35_1037
26.9	glutathione transferase	3.09	0.98	35_945
26.12	peroxidase 31-like	-1.56	-1.23	35_13842
26.12	root peroxidase	-1.41	-3.02	35_40512
26.12	cationic peroxidase spc4-like	-2.61	-2.44	35_14346
26.12	peroxidase 4	-1.41	-2.84	35_13767
26.12	peroxidase 16-like	-1.06	-1.37	35_13864
26.12	peroxidase 12	-2.59	-2.35	35_14341
26.13	probable inactive purple acid phosphatase 29-like	-1.09	-1.60	35_21985
26.13	purple acid phosphatase 2	-1.53	-3.12	35_26603
26.13	purple acid phosphatase 2	-1.07	-1.41	35_2953
26.21	14 kda proline-rich	-1.92	-5.64	35_14974
26.21	kda proline-rich protein	-1.61	-1.77	35_43731
26.21	non-specific lipid-transfer protein 2-like	-1.30	-1.19	35_16799
26.21	kda proline-rich protein	-4.32	-5.53	35_1389
26.22	short-chain type dehydrogenase reductase-like	-1.63	-1.10	35_9235
26.22	short-chain dehydrogenase tic chloroplastic-like	1.04	2.31	35_16087
26.22	salutaridine reductase-like	1.05	1.56	35_17057
26.23	rhodanese-like domain-containing protein 10	1.09	1.59	35_5854
26.24	probable acetyltransferase natal1-like	-1.07	-1.14	35_8301
26.24	acyl- n-acyltransferases-like protein	1.19	1.49	35_18325
26.28	gds1 esterase lipase cpd49-like	1.19	1.67	35_19551
26.28	gds1 esterase lipase at2g40250-like	1.33	1.00	35_26156
ARN				
27.1.1	maturase k	2.14	1.84	35_40451
27.1.1	chloroplastic group iia intron splicing facilitator chloroplastic	1.21	1.63	35_22992
27.1.1	maturase partial	1.61	1.38	35_20139
27.1.2	dead-box atp-dependent rna helicase 25-like	1.37	1.48	35_11970
27.1.2	dead-box atp-dependent rna helicase 31-like	1.13	1.04	35_45339
27.1.10.1.1	ribonuclease e g-like chloroplastic isoform x2	1.44	1.27	35_20370
27.1.19	s-like mase	-1.19	-1.03	35_4402
27.1.19	mase s-like protein precursor	-1.71	-2.73	contig5185_at

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
27.1.19	rnase s-like protein precursor	-1.78	-2.68	35_1948
27.1	u6 snrna-associated sm-like protein lsm7	-1.02	-1.07	35_871
27.1	16s rna processing protein isoform 1	1.12	1.02	35_24021
27.2	u3 small nucleolar rna-associated protein 15 homolog	-1.12	-1.46	35_6865
27.2	dna-directed rna polymerase chloroplastic-like	1.57	1.32	35_15569
27.2	rna polymerase beta subunit	1.82	1.74	35_47609
27.2	rna polymerase beta subunit	2.97	2.26	hvsme0012j16f_at
27.2	dna-directed rna polymerase chloroplastic-like	1.16	1.05	35_28821
27.2	rna polymerase alpha subunit	2.42	2.51	contig22529_at
27.2	rna polymerase alpha subunit	2.38	2.50	35_13021
27.3.3	ap2 erf and b3 domain-containing protein os01g0141000-like	1.28	1.22	35_16193
27.3.4	auxin response factor 8-like	-1.07	-1.06	35_7569
27.3.6	tpa: hlh dna-binding domain superfamily protein	1.74	1.05	35_21113
27.3.6	transcription factor pif1-like	1.19	1.60	35_21763
27.3.6	transcription factor fama	1.03	1.03	35_33103
27.3.6	transcription factor une10 isoform x2	1.39	1.63	35_19955
27.3.7	zinc finger protein constans-like 2-like	1.05	1.40	35_16737
27.3.9	gata transcription factor 16-like	-1.05	-1.61	35_4877
27.3.10	protein yabby 2-like	-1.16	-1.16	35_18755
27.3.20	myb dna-binding domain superfamily protein	-1.63	-1.98	35_19470
27.3.20	myb-related protein	1.02	1.32	35_20351
27.3.22	homeobox-leucine zipper protein hox32-like	1.65	1.52	35_9901
27.3.25	transcription factor as1-like	-1.23	-1.41	35_7199
27.3.25	myb-related protein mybas2	-2.11	-1.14	35_17766
27.3.25	protein radialis-like 3	1.19	1.43	35_28815
27.3.25	myb-related protein mybas1-like	1.02	1.43	35_20479
27.3.25	myb-related protein 306-like	1.09	1.28	35_21602
27.3.26	mcb2 protein	2.01	2.87	35_28089
27.3.27	nac domain-containing protein 21 22-like	1.15	3.37	35_544
27.3.27	nac domain-containing protein 100-like	1.62	1.04	35_23540
27.3.27	nac domain-containing protein 18	1.00	1.38	35_16660
27.3.27	nac domain-containing protein 100-like	1.47	1.45	35_18477
27.3.27	nac domain-containing protein 29	1.00	1.21	35_19996
27.3.27	---NA---	1.77	1.76	35_21015
27.3.32	protein wrky1	-1.11	-1.01	35_24053
27.3.32	wrky transcription factor 40	-2.10	-2.63	35_9124
27.3.35	tpa: bzip transcription factor superfamily protein	1.77	2.00	35_17926
27.3.35	regulatory protein opaque-2	1.46	1.31	35_4274
27.3.37	lob domain-containing protein 37-like	-2.64	-2.36	35_2950
27.3.40	auxin-responsive protein iaa16-like	-2.85	-1.55	hvsme0001j13r2_at
27.3.40	iaa14 - auxin-responsive aux iaa family member	1.61	1.66	35_16099
27.3.40	iaa15 - auxin-responsive aux iaa family member	1.26	1.54	35_625
27.3.40	iaa12 - auxin-responsive aux iaa family member	1.30	1.67	35_16102
27.3.40	iaa14 - auxin-responsive aux iaa family member	1.63	1.56	35_16101
27.3.40	iaa15 - auxin-responsive aux iaa family member	1.33	1.71	contig2500_at
27.3.50	transcription factor bt3 homolog 4-like	-1.04	-1.57	35_15306
27.3.50	transcription factor bt3 homolog 4-like	-1.07	-1.52	contig3582_s_at
27.3.50	grf1-interacting factor 3-like	1.41	1.82	35_3703
27.3.62	dna-binding protein mnb1b	-1.43	-2.32	35_583
27.3.64	e3 ubiquitin-protein ligase pub23-like	2.57	2.03	35_24823
27.3.69	ribulose- bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit n- chloroplastic	1.02	1.29	hvsmea0009e14r2_at
27.3.69	histone-lysine n-methyltransferase setd3	1.38	1.83	35_17459
27.3.69	histone-lysine n-methyltransferase setd3	1.03	1.57	35_17460
27.3.73	staphylococcal nuclease domain-containing protein 1-like	-1.01	-1.26	35_616
27.3.85	rna polymerase sigma factor chloroplastic-like	1.26	1.68	contig9041_s_at
27.3.99	protein aspartic protease in guard cell 2-like	-2.89	-2.11	35_16621
27.3.99	probable protein s-acyltransferase 16	-1.18	-1.43	35_27872
27.3.99	diphthamide biosynthesis protein 3	-1.44	-1.80	35_4165
27.3.99	phd finger protein at1g33420-like	1.37	1.03	hvsme00012n05r2_at
27.3.99	protein aspartic protease in guard cell 1-like	1.94	1.58	35_9749
27.3.99	trna (guanine -n)-dimethyltransferase-like	1.52	2.33	35_13470
27.3.99	mterf transcription partial	1.31	1.86	35_21715
27.3.99	remorin-like isoform x1	1.32	1.70	35_1276
27.4	la-related protein 6a	-1.19	-1.22	35_1610
27.4	protein mei2-like 2 isoform x1	1.01	1.37	35_26846
ADN				
28.1.3.2.1	histone	-1.39	-2.05	35_13985
28.1.3.2.1	histone h2ax	-1.48	-2.35	35_13949
28.1.3.2.1	histone	-1.08	-1.42	35_13975
28.1.3.2.1	protein	-1.85	-1.82	35_13927
28.1.3.2.1	histone h2a	-1.85	-1.86	35_13950
28.1.3.2.1	protein	-1.08	-1.57	35_13920
28.1.3.2.1	histone -like	-1.03	-1.32	35_14004
28.1.3.2.1	histone h2ax	-1.43	-2.26	35_13957
28.1.3.2.1	protein	-1.01	-1.51	35_13921
28.1.3.2.1	protein	-1.85	-3.19	35_13909
28.1.3.2.1	histone h2a variant 1	-1.20	-1.04	35_1152
28.1.3.2.1	histone h2a	1.36	1.36	contig412_x_at
28.1.3.2.1	histone -like	1.36	1.98	35_14000
28.1.3.2.3	-	-2.28	-3.03	35_14051
28.1.3.2.3	histone	-1.12	-1.31	35_14040
28.1.3.2.3	histone	-1.79	-1.49	35_14030
28.1.3.2.3	histone	-2.43	-3.24	35_14048
28.1.3.2.3	histone	-2.22	-3.10	35_14029
28.1.3.2.4	histone h4	-1.45	-1.52	35_13885
28.1.3.2.4	histone h4	-1.65	-1.68	contig197_at
28.1.3.2.4	histone h4	1.53	1.92	35_13644
28.1	dna polymerase alpha catalytic subunit	-1.02	-1.16	35_20521
28.1	minichromosome maintenance protein	-1.58	-1.53	35_17023
28.1	dna replication licensing factor mcm2	-1.33	-1.49	35_15515
28.1	mini-chromosome maintenance complex protein family	-2.10	-2.20	35_4240
28.1	dead-box atp-dependent rna helicase 27-like	-1.00	-1.26	35_5375
28.1	flap endonuclease 1-b-like	1.24	1.52	35_20348
28.1	pentatricopeptide repeat-containing protein chloroplastic-like	1.58	1.89	35_6300

Apéndice

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
28.1	dead-box atp-dependent rna helicase 50	1.39	1.70	35_6209
28.1	apurinic endonuclease-redox protein	1.13	1.14	35_9170
28.2	dna glycosylase superfamily protein isoform 1	-1.05	-1.34	35_10422
28.2	protein	-1.43	-2.08	35_18484
28.2	replication protein a 32 kda subunit a-like	-1.94	-1.85	35_19717
28.2	protein	-1.01	-2.20	35_8038
28.2	protein	-1.22	-1.70	35_1684
28.2	late blight resistance protein homolog r1b-19	-1.47	-2.82	35_4809
28.2	dna-damage-repair toleration protein drt102	-1.03	-1.24	35_4663
28.99	protein ultrapetala 1-like	-1.43	-1.51	35_25516
PROTEÍNAS				
29.1.4	leucyl-trna cytoplasmic	-1.02	-1.07	35_2613
29.1.4	leucine--trna mitochondrial	1.03	1.25	35_23150
29.1.7	alanine-trna acid forming aminoacyl-trna and related binding isoform 1	-1.18	-1.84	35_17506
29.1.30	ribosomal large subunit pseudouridine synthase b	1.11	1.10	35_18652
29.1	polyubiquitin	1.11	1.10	35_13807
29.1	polyubiquitin	1.32	1.17	35_13874
29.1	polyubiquitin	2.60	2.89	35_13796
29.2.1.1.1.1.3	ribosomal protein partial	2.58	2.42	35_8551
29.2.1.1.1.1.1	ribosomal protein s11	2.52	2.75	35_47840
29.2.1.1.1.1.530	ribosome-binding factor chloroplastic	1.32	2.16	35_16239
29.2.1.1.1.2.2	ribosomal protein l2	1.81	1.50	35_32704
29.2.1.1.1.2.12	50s ribosomal protein l12- chloroplastic	1.45	1.57	35_20546
29.2.1.1.1.2.16	ribosomal protein s8	2.05	1.89	35_16486
29.2.1.1.1.2.22	ribosomal protein l22	2.54	2.40	35_22408
29.2.1.1.1.2.28	50s ribosomal protein l28	1.13	1.37	35_1655
29.2.1.1.1.2.28	50s ribosomal protein l28	1.16	1.36	35_1656
29.2.1.1.3.1.6	30s ribosomal protein s6	1.12	1.02	35_26353
29.2.1.1.3.2.18	structural constituent of ribosome	1.49	1.88	35_23063
29.2.1.2.1.8	40s ribosomal protein s8	-1.17	-2.08	35_14504
29.2.1.2.1.9	---NA---	-1.08	-1.97	35_14661
29.2.1.2.1.19	40s ribosomal protein s19	-1.10	-2.15	35_14825
29.2.1.2.1.26	40s ribosomal protein s26	-1.24	-1.84	35_746
29.2.1.2.1.27	40s ribosomal protein s27a	-1.10	-1.71	35_13742
29.2.1.2.1.53	40s ribosomal protein s3a	-1.35	-2.39	35_685
29.2.1.2.2.9	60s ribosomal protein l9	-1.24	-1.77	35_14930
29.2.1.2.2.24	60s ribosomal protein l24	-1.13	-1.56	35_15031
29.2.1.2.2.28	60s ribosomal protein l28	-1.04	-1.68	35_14817
29.2.1.2.2.34	60s ribosomal protein l34	-1.13	-1.90	35_1900
29.2.1.2.2.34	60s ribosomal protein l34	-1.13	-1.66	35_1899
29.2.1.2.2.99	ribosome biogenesis	-1.24	-1.33	35_4245
29.2.1.2.2.513	60s ribosomal protein l13a-4	-1.06	-2.20	35_14012
29.2.1.2.2.537	60s ribosomal protein l37a	-1.13	-1.78	contig1547_s_at
29.2.1.2.2.537	60s ribosomal protein l37a	-1.06	-1.86	35_14415
29.2.1.2.2.537	60s ribosomal protein l37a	-1.26	-2.28	35_14410
29.2.2.1	guanine nucleotide-binding 3 homolog	-1.04	-1.07	35_14086
29.2.2.3.1	h aca ribonucleoprotein complex subunit 4-like	-1.23	-1.59	35_2413
29.2.2.3.5	dead-box atp-dependent rna helicase 57	-1.02	-1.25	35_9189
29.2.3	eukaryotic initiation factor 4a-1	-1.11	-1.68	35_663
29.2.3	eukaryotic initiation factor 4a	-1.06	-1.53	35_664
29.2.4	elongation factor 1-alpha	-1.12	-1.61	35_13745
29.2.5	eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-2-like	-1.63	-3.97	35_5444
29.3.3	amino acid selective channel protein	-1.63	-1.70	35_14242
29.3.3	chloroplast processing peptidase-like	1.16	1.17	35_22216
29.3.4.2	protein transport protein sec23-like	-1.17	-1.43	35_20444
29.3.4.3	pentatricopeptide repeat-containing protein at3g46870-like	1.16	1.35	35_26307
29.3.4.4	sec1 family transport protein sly1-like	-1.37	-1.91	35_15214
29.3.4.99	protein transport protein sec61 gamma subunit	-1.02	-1.55	35_15616
29.3.4.99	protein transport protein sec61 gamma subunit	-1.52	-2.51	35_15618
29.3.4.99	signal peptidase complex subunit 3	-1.00	-1.73	35_21105
29.3.4.99	patellin-4-like	-1.71	-4.84	35_22880
29.3.4.99	protein transport protein sec61 gamma subunit	-1.10	-1.96	35_31384
29.3.4.99	protein transport protein sec61 subunit beta-like	-1.20	-1.87	35_2194
29.3.4.99	signal recognition particle 14 kda protein	-1.07	-1.25	35_2456
29.3.4.99	phosphatidylinositol transfer protein pdr17	-1.78	-2.58	35_2462
29.3.4.99	signal recognition particle 54 kda protein 2	1.21	1.52	35_1492
29.4.1.57	probable receptor-like protein kinase at5g47070	-1.97	-3.61	35_7107
29.4.1.57	serine threonine-protein kinase at5g01020-like	-1.39	-2.04	35_30789
29.4	g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase rkl1-like	-3.16	-3.67	35_9403
29.4	serine threonine protein kinase	-1.14	-2.44	35_2599
29.4	cbl-interacting protein kinase 7	-3.80	-3.49	35_9626
29.4	10 kda chaperonin-like	-1.39	-1.79	35_14278
29.4	-	-2.28	-1.72	35_5436
29.4	cenp-e like kinetochore protein isoform x1	-1.38	-1.46	35_3046
29.4	probable protein phosphatase 2c 33	-1.31	-3.09	35_2854
29.4	protein-l-isoaspartate o-methyltransferase	1.03	1.68	35_11352
29.4	serine threonine-protein kinase receptor	1.82	1.33	35_22617
29.4	protein phosphatase 2c containing expressed	1.61	1.65	35_19818
29.4	serine threonine-protein kinase ht1-like	1.27	1.64	35_20431
29.4	serine threonine-protein kinase receptor	1.20	1.08	35_24499
29.4	cbl-interacting protein kinase 6-like	1.47	2.65	35_6174
29.4	peptide methionine sulfoxide reductase b5-like	1.04	1.35	35_2681
29.4	serine threonine kinase receptor precursor-like protein	1.30	1.87	hv12119u_at
29.4	g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase b120-like	1.15	1.09	35_26419
29.4	l-type lectin-domain containing receptor kinase -like	1.32	1.50	35_24798
29.4	lectin receptor kinase	1.55	1.09	35_11084
29.4	raf proto-oncogene serine threonine-protein kinase	1.09	2.73	35_4552
29.4	tpa: protein kinase superfamily protein	1.19	1.27	35_3033
29.4	cbl-interacting protein kinase 23	1.13	1.48	35_1294
29.5.1	subtilisin-like protease	-4.07	-6.95	35_19379
29.5.1	subtilisin-like protease sdd1-like	-2.56	-4.61	35_31483
29.5.1	subtilisin-like protease sdd1-like	-1.58	-3.88	35_44282
29.5.1	subtilisin-like protease	-1.11	-1.11	35_6657
29.5.1	subtilisin-like protease	1.06	1.22	35_18209

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
29.5.3	cysteine proteinase inhibitor	-1.01	-1.06	35_15
29.5.3	cysteine proteinase inhibitor	-1.01	-1.08	35_493
29.5.3	otu domain-containing protein at3g57810-like isoform x2	1.20	1.77	35_28392
29.5.3	thiol protease sen102-like	3.75	6.91	35_15889
29.5.3	otu domain-containing protein at3g57810 isoform x1	1.18	1.62	35_4494
29.5.4	aspartic proteinase asp1	-1.04	-1.11	35_19309
29.5.4	aspartic proteinase nepenthesin-1	-1.07	-1.16	35_4253
29.5.4	basic 7s globulin-like	-1.71	-3.88	35_953
29.5.5	rhomboid family protein	-1.48	-1.38	35_9217
29.5.5	serine carboxypeptidase-like 50	-1.99	-2.14	35_24027
29.5.5	serine carboxypeptidase-like 27	-1.39	-1.90	35_21628
29.5.5	transmembrane protein 115-like	-1.17	-1.63	35_3172
29.5.5	serine carboxypeptidase-like 18	1.04	1.03	35_5310
29.5.5	atp-dependent clp protease proteolytic subunit-related protein chloroplastic	1.07	1.19	35_17200
29.5.5	atp-dependent clp protease proteolytic subunit-related protein chloroplastic	1.07	1.51	35_4265
29.5.5	serine carboxypeptidase-like 18	1.57	1.85	35_5311
29.5.7	metalloendoproteinase 1-like	1.01	1.85	35_9371
29.5.9	mitochondrial chaperone bcs1-like	-1.27	-3.14	35_20191
29.5.9	probable mitochondrial chaperone bcs1-b	-1.56	-2.50	35_31943
29.5.9	mitochondrial chaperone bcs1-like	-1.93	-2.29	35_21571
29.5.9	cell division protein aaa atpase family	-1.36	-2.10	35_16986
29.5.11.1	small ubiquitin-related modifier 1-like	-1.65	-1.73	35_941
29.5.11.1	polyubiquitin	1.29	1.19	35_13838
29.5.11.3	ubiquitin-conjugating enzyme e2 28-like	-1.87	-2.50	35_17404
29.5.11.3	probable ubiquitin-conjugating enzyme e2 24 isoform x1	1.27	1.72	35_7005
29.5.11.3	ubiquitin-conjugating enzyme e2 4-like	1.20	2.04	35_1275
29.5.11.3	ubiquitin-conjugating enzyme e2 28-like	1.04	1.37	35_3731
29.5.11.4.2	ring finger and chy zinc finger domain-containing protein 1	1.52	1.56	35_13324
29.5.11.4.2	zinc c3hc4 type family protein	1.77	2.55	35_1742
29.5.11.4.3.2	transport inhibitor response 1-like protein	-1.26	-1.12	35_174
29.5.11.4.3.2	f-box kelch-repeat protein at2g44130-like	1.40	1.28	35_15290
29.5.11.4.5.2	btb poz and taz domain-containing protein 1-like	-1.63	-2.62	35_7295
29.5.11.4.5.2	btb and taz domain protein	1.70	2.10	35_26188
29.5.11.4.5.2	btb poz and taz domain-containing protein 1-like	1.85	2.59	35_20613
29.5.11.20	proteasome subunit alpha type 3	-1.04	-1.70	35_1041
29.5	probable glutamate carboxypeptidase 2	-1.83	-1.87	35_6459
29.5	tpa: metacaspase family protein	-1.95	-1.57	35_15000
29.5	probable xaa-pro aminopeptidase p	1.01	1.37	35_19864
29.5	probable glutamate carboxypeptidase 2- partial	1.02	2.33	35_22864
29.5	probable glutamate carboxypeptidase 2 isoform x2	1.23	2.90	35_19099
29.5	lon peptidase n-terminal domain and ring finger protein 1	1.23	1.79	35_29002
29.5	uba and ubx domain-containing protein at4g15410-like	1.05	1.27	35_16459
29.5	peptidase m48-like	1.09	1.80	35_18250
29.5	metallopeptidase m24 family protein isoform partial	1.12	1.44	35_23679
29.5	prolyl endopeptidase	2.02	2.49	35_6893
29.5	lon peptidase n-terminal domain and ring finger protein 1	1.55	2.20	35_4647
29.5	tpa: caax amino terminal protease family protein	1.07	1.47	35_5816
29.6	predicted protein	1.02	1.36	35_24774
29.6	predicted protein	1.04	1.24	contig20794_at
29.7	alpha-n-acetylgalactosaminide alpha- -sialyltransferase 1-like	-1.74	-1.50	35_23095
29.8	nifu-like protein chloroplastic	-1.17	-1.36	35_1931
29.8	photosystem i assembly protein ycf4	1.45	1.43	35_47829
29.8	nifu-like protein chloroplastic	1.11	1.53	35_22872
SEÑALIZACIÓN				
30.1	phi-1-like phosphate-induced protein	-2.40	-4.81	contig12147_at
30.1	phi-1-like phosphate-induced protein	-2.53	-4.83	35_19304
30.1	hypothetical protein TRIUR3_17676	2.38	1.83	35_18376
30.2.3	receptor kinase	-1.05	-2.26	35_21203
30.2.3	probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at1g66830	1.80	2.09	35_23601
30.2.6	-	1.73	1.12	contig17992_at
30.2.9	probable receptor protein kinase tmk1	-1.31	-1.07	35_19020
30.2.12	receptor-like protein kinase at3g47110	-2.02	-2.94	35_26520
30.2.12	lrr receptor-like serine threonine-protein kinase	-2.10	-3.21	35_22961
30.2.12	lrr receptor-like serine threonine-protein kinase	2.28	2.36	35_9944
30.2.16	receptor-like protein kinase herk 1	-1.40	-2.83	35_23157
30.2.16	receptor-like protein kinase feronia	-1.47	-3.63	35_1718
30.2.16	receptor-like protein kinase herk 1	-1.03	-2.63	contig10499_at
30.2.16	receptor-like protein kinase feronia	-1.34	-2.09	35_1716
30.2.17	receptor-like protein kinase at4g00960	-1.05	-2.03	contig21770_at
30.2.17	cysteine-rich receptor-like protein kinase 25	1.73	1.18	contig15337_at
30.2.18	protein kinase cdg1-like	-1.59	-1.22	35_34772
30.2.19	receptor like protein kinase -like	2.67	2.53	35_16487
30.2.25	wall-associated receptor kinase 5-like	1.46	1.27	35_39829
30.2.25	wall-associated receptor kinase 5-like	1.59	1.21	35_28171
30.2.26	serine threonine-protein kinase-like protein ccr3	1.28	1.13	35_20791
30.3	calnexin homolog	-1.00	-2.09	35_14270
30.3	protein	-2.04	-2.64	35_14686
30.3	calreticulin precursor	-1.02	-2.03	35_14693
30.3	calcium-dependent protein kinase	-1.52	-2.65	contig5191_at
30.3	calcium-dependent protein kinase 2	-1.14	-3.32	contig16998_at
30.3	calcium-dependent protein kinase 1-like	-1.02	-3.03	35_8408
30.3	calcium-dependent protein isoform expressed	-1.86	-2.89	35_16488
30.3	calcineurin b-like protein 4	1.23	1.36	35_26733
30.3	calcineurin b-like protein 3	1.41	1.04	35_17241
30.3	ef-hand containing protein	1.23	1.13	contig7501_s_at
30.3	protein iq-domain 1-like isoform x1	1.32	1.88	35_19578
30.3	ef-hand containing protein	1.24	1.13	35_2689
30.3	eh domain-containing protein 1-like	1.07	1.40	hw06h20u_at
30.4.1	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 1-like	1.17	2.35	contig5913_s_at
30.4.1	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 1-like	1.22	2.32	35_2006
30.5	gtp-binding protein sar1a	-1.87	-2.32	35_21781
30.5	ras-related protein raba5c-like	-1.04	-1.76	35_12724
30.5	ras-related protein raba5c-like	-1.12	-1.76	contig10901_at
30.5	ras-related protein rab11c-like	-1.15	-2.86	35_15259

Apéndice

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
30.5	prenylated rab receptor 2	-1.38	-2.72	35_4873
30.5	rna-binding protein cabeza	1.59	1.31	35_17294
30.5	probable gtp-binding protein obgc2	1.02	1.21	35_6883
30.5	rna-binding protein cabeza	1.81	1.32	35_17295
30.5	rna-binding protein cabeza	1.78	1.35	35_17296
30.6	pi-plc x domain-containing protein at5g67130-like	-1.20	-1.10	contig12768_at
30.6	pi-plc x domain-containing protein at5g67130-like	-1.08	-1.11	35_19345
30.8	rapid alkalization factor 1 precursor	-2.48	-3.48	35_16720
30.8	rapid alkalization factor 1 precursor	-2.47	-3.37	35_16719
30.8	rapid alkalization factor-like	-1.49	-3.21	35_16076
30.9	polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily protein	1.09	1.52	35_5949
30.11.1	microtubule-associated protein futsch-like	-1.15	-1.47	35_16210
30.11	root phototropism protein 3	-2.21	-1.15	35_10744
30.11	protein	1.60	1.26	contig3423_at
30.11	light-regulated protein	1.41	2.86	contig4772_s_at
30.11	protein	1.43	1.31	35_15413
30.11	light-induced protein 1-like	1.40	2.75	35_16198
30.11	light-induced protein 1-like	1.39	2.72	35_16197
30.11	early light-induced protein	1.56	1.54	35_15414
30.11	early light-induced protein	1.01	1.08	contig3426_at
ORGANIZACIÓN CELULAR				
31.1.1.1.1	actin 11	-1.40	-2.24	35_14175
31.1.1.2.6	65-kda microtubule-associated protein 6-like	-1.52	-2.35	35_22002
31.1.1.2.6	65-kda microtubule-associated protein 3-like	1.50	2.07	35_22901
31.1.1.2	tubulin alpha chain	-1.06	-1.68	35_14085
31.1.1.2	alpha- partial	-1.10	-1.71	35_14074
31.1.1.2	tubulin alpha chain	-1.03	-1.69	35_14083
31.1	actin-related protein 3	-1.25	-1.31	35_22271
31.1	probable protein abil5-like	-1.10	-1.23	35_19995
31.1	annexin p35	-1.28	-2.26	35_15137
31.1	annexin p35	-1.18	-2.19	35_15135
31.1	annexin d4-like	-1.31	-1.85	35_15775
31.1	125 kda kinesin-related protein	-1.56	-2.15	35_38316
31.1	hipl1 protein	1.25	1.17	35_47825
31.2.5	epimerase family protein sdr39u1 isoform x1	1.01	1.53	35_18545
31.2	plastid-dividing ring protein	-1.45	-2.06	35_6128
31.2	cyclin-dependent kinase b1-1	-1.59	-1.93	35_18569
31.2	ultraviolet-b receptor uvr8-like	1.29	1.34	35_17051
31.2	ribosome-recycling chloroplastic	1.28	1.42	35_2069
31.3.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyp23	1.15	1.11	35_6077
31.3	ccd22_orsj ame: full=cyclin-d2-2 ame: full=g1 s-specific cyclin-d2-2 short= 2 2	-1.30	-1.89	35_5503
31.3	cyclin m	0.96	1.16	35_4941
31.3	cyclin-dependent protein kinase	1.45	1.77	35_10246
31.4	coatomer subunit beta-2	-1.05	-1.62	35_15401
31.4	coatomer subunit beta-2	-1.01	-1.29	35_15402
31.4	coatomer subunit beta -1-like isoform x2	1.17	1.27	35_19214
DESARROLLO				
33.1	patatin-like protein 3	-2.51	-2.46	35_6719
33.1	patatin-like phospholipase domain-containing protein 3- partial	1.19	1.11	35_20994
33.3	squamosa promoter-binding-like protein 17	1.15	1.09	35_47260
33.99	embryogenesis-associated protein emb8-like	-1.41	-1.27	35_15227
33.99	lipase plat lh2	-2.18	-1.41	35_17064
33.99	embryogenesis-associated protein emb8-like	-1.05	-1.06	35_16074
33.99	bidirectional sugar transporter sweet17	-2.93	-4.14	35_19190
33.99	wd repeat-containing protein 70	-1.05	-1.93	35_22313
33.99	methyltransferase ddb_g0268948	-1.54	-2.94	35_4187
33.99	protein transparent testa 12	-1.75	-1.52	35_7386
33.99	probable transporter mch1	-1.54	-1.25	35_25386
33.99	3-oxo-delta()-steroid 5-beta-reductase-like	-1.16	-1.70	contig6313_at
33.99	protein transparent testa 12-like	-1.81	-1.63	contig20064_at
33.99	aba-induced protein	-0.91	-1.72	35_3189
33.99	dag chloroplastic-like	1.01	1.31	35_11549
33.99	zinc finger protein constans-like 2-like	1.04	1.44	35_16736
33.99	probable serine incorporator	1.07	2.15	35_28760
33.99	protein sulfur deficiency-induced 2-like	2.08	3.26	35_32045
33.99	ribonuclease j	1.11	1.26	contig13094_s_at
33.99	pentatricopeptide repeat-containing protein at2g41720-like	1.30	1.75	35_5275
33.99	pentatricopeptide repeat-containing protein at4g21190 isoform x1	1.10	1.38	35_3527
TRANSPORTE				
34.1	uracil permease-like	-3.36	-4.77	35_20440
34.1	uracil permease-like	-2.70	-3.96	contig12565_at
34.2	carbohydrate transporter sugar porter transporter	-1.02	-1.04	contig11332_at
34.2	polyol transporter 5-like	-1.17	-2.16	35_16269
34.2	sugar transporter erd6-like 4	-1.27	-1.22	bags16h04_at
34.2	polyol transporter 5-like	-1.13	-1.64	35_21642
34.2	polyol transporter 5-like	-1.82	-1.06	35_5055
34.3	black hull 4	-2.75	-2.95	35_23228
34.3	probable sodium-coupled neutral amino acid transporter 6	-1.06	-1.90	35_24252
34.3	amino acid transport protein	-1.10	-1.63	35_3349
34.3	lysine histidine transporter-like 8	1.04	2.16	contig20253_at
34.3	amino acid permease 1-like	3.00	3.42	35_22604
34.3	black hull 4	1.91	1.79	35_10798
34.3	pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump-like	1.54	2.68	35_534
34.3	vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase	1.13	1.22	35_533
34.6	low affinity sulfate transporter 3-like	1.16	2.24	contig20387_at
34.7	probable inorganic phosphate transporter 1-8	-1.82	-3.07	35_420
34.8	adenine nucleotide translocator	-1.52	-2.67	35_14437
34.8	plastidic phosphate translocator-like protein1	-1.36	-1.97	35_15405
34.8	plastidic phosphate translocator-like protein1	-1.23	-1.94	35_15406
34.8	glucose-6-phosphate phosphate translocator chloroplastic	-2.42	-2.32	35_4906
34.8	triose phosphate phosphate non-green precursor	-1.24	-2.13	35_2130
34.9	mitochondrial phosphate carrier protein mitochondrial-like	-1.04	-1.42	contig11285_at
34.9	---NA---	-1.60	-2.84	35_38703
34.9	mitochondrial phosphate carrier protein mitochondrial-like	-1.01	-1.01	hvsmea0008p24r2_s_at

BINCODE	DESCRIPCIÓN	AG132-AGRA	EG132-EGRA	IDENTIFICADOR
34.9	mitochondrial phosphate carrier protein mitochondrial-like	-1.35	-1.94	35_4221
34.9	mitochondrial carrier-like protein	1.00	2.35	35_1281
34.9	mitochondrial substrate carrier family protein	1.08	2.39	contig26293_at
34.9	mitochondrial carnitine acylcarnitine carrier-like protein	1.23	2.11	35_3511
34.11	udp-galactose udp-glucose transporter 3-like	-1.02	-2.54	35_1802
34.11	predicted protein	1.30	1.43	35_23077
34.12	zinc transporter 7-like	2.41	2.28	hd12h12r_at
34.12	zinc transporter	1.50	1.39	35_25480
34.12	zinc transporter 7-like	2.31	2.35	35_38044
34.12	solute carrier family 40 member chloroplastic isoform x1	1.18	1.25	35_4263
34.13	protein nrt1 ptr family -like isoform x3	-2.44	-4.01	35_25380
34.13	protein nrt1 ptr family -like	-1.13	-1.00	35_7556
34.13	protein nrt1 ptr family -like	-2.99	-6.18	35_24450
34.13	protein nrt1 ptr family -like	-1.80	-1.09	35_12113
34.13	probable nitrite transporter at1g68570-like	-1.34	-1.10	contig21251_at
34.13	oligopeptide transporter 7	2.24	2.92	35_23559
34.13	oligopeptide transporter 7	1.38	1.82	35_40452
34.13	oligopeptide transporter 7	1.15	1.73	35_39560
34.14	organic cation transporter	1.92	1.65	35_19546
34.14	organic cation transporter	2.09	1.90	contig17575_at
34.16	abc transporter b family member 4	-1.87	-3.63	contig21298_at
34.16	abc transporter b family member 19-like	-1.18	-2.07	35_22204
34.16	abc transporter c family member 10	-1.00	-1.20	contig6152_at
34.16	abc transporter b family member 4	-1.41	-2.77	35_8212
34.16	abc transporter c family member 3-like	-2.00	-2.52	35_10590
34.16	abc transporter b family member 1-like	-1.67	-1.59	35_6774
34.16	abc transporter c family member 10	-1.01	-1.22	contig6154_s_at
34.16	abc transporter b family member 4	-1.18	-2.09	35_23308
34.16	abc transporter c family member 3	-1.35	-1.50	35_8300
34.16	abc transporter c family member 3	-1.40	-1.54	35_3554
34.16	abc transporter c family member 10	-1.13	-1.12	35_2290
34.16	abc transporter c family member 10	-0.99	-1.14	35_2291
34.16	pleiotropic drug resistance protein 1-like	1.09	1.72	hvsmem0007k04r2_at
34.18	chloride channel protein clc-f-like isoform x1	-1.02	-1.73	35_7286
34.18	chloride channel protein clc-c-like	1.02	1.44	35_19359
34.18	boron transporter	1.61	1.48	35_47165
34.19.1	probable aquaporin pip2-6	-1.36	-3.23	35_13833
34.19.2	delta tonoplast intrinsic protein tip2 2	-1.60	-1.60	35_14109
34.19.3	aquaporin nip2-2	1.06	1.39	35_16339
34.21	calcium-transporting atpase endoplasmic reticulum-type-like	-1.14	-1.63	35_17898
34.98	glycerol 3-phosphate permease	-1.48	-2.84	35_27526
34.99	mate efflux family protein alf5-like isoform x1	-1.11	-1.94	contig21646_at
34.99	mate efflux family protein alf5-like isoform x1	-1.32	-2.29	35_24248
34.99	probable folate-biopterin transporter 4	-1.07	-1.31	35_9351
34.99	probable folate-biopterin transporter 4	-1.08	-1.62	contig18763_at
34.99	secretory carrier membrane protein	-1.91	-2.30	contig6807_at
34.99	probable folate-biopterin transporter 4	-1.67	-1.96	35_23409
34.99	mate efflux family protein 5-like	-1.75	-1.52	35_12180
34.99	secretory carrier membrane protein	-1.38	-1.85	35_2778
34.99	adenine guanine permease azg2-like	2.10	2.00	35_22284
34.99	nucleobase-ascorbate transporter 6-like	1.19	1.39	35_49642
34.99	xanthine uracil vitamin c partial	1.72	1.93	contig5847_at
34.99	mate efflux family protein 5	1.29	1.62	35_6023
34.99	nucleobase-ascorbate transporter 6-like	1.72	1.89	35_2133
34	uncharacterized membrane protein at1g06890-like	-1.65	-2.18	35_6068

A.1.2. Resultados de las diferencias entre concentraciones de CO₂ en

Graphic

Transcritos diferencialmente expresados del genotipo silvestre en CO₂ elevado frente al cultivado en CO₂ ambiente. Se representa la razón entre los logaritmos de la tasa de cambio (Fold Change); AGRA, Graphic en CO₂ ambiente; EGRA, Graphic en CO₂ elevado; BINCODE, códigos de agrupación por rutas metabólicas.

BINCODE	DESCRIPCIÓN	EGRA-AGRA	IDENTIFICADOR
CARBOHIDRATOS SECUNDARIOS			
3.5	aldose 1-epimerase-like	1.09	contig5648_s_at
3.5	fructan 6-exohydrolase	1.07	35_2595
3.5	aldose 1-epimerase-like	1.17	35_1720
OXIDACIÓN DE PENTOSAS FOSFATO			
7.3	root r-b1-like	1.52	contig3886_at
7.3	ferredoxin- chloroplastic-like	1.41	35_1296
7.3	root r-b1-like	1.37	35_1295

Apéndice

BINCODE	DESCRIPCIÓN	EGRA-AGRA	IDENTIFICADOR
METABOLISMO SECUNDARIO			
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	1.25	35_14238
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	1.07	35_14224
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	1.05	35_14234
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	1.26	35_14237
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	1.10	35_14243
16.2.1.1	phenylalanine ammonia-lyase	1.30	35_14236
16.2	4-coumarate- ligase-like 4	1.06	35_4011
16.5.1.1.4.1	cytochrome p450 71c4	1.13	35_7890
ESTRÉS			
20.1.7	xylanase inhibitor protein 1-like	1.24	35_14274
20.1.7	dirigent protein 22-like	1.11	35_31317
20.1	pathogenesis-related protein prb1-2-like	1.32	contig2208_at
20.1	pr17c precursor	1.45	35_210
20.1	chitinase 8	1.13	35_886
20.1	10-deacetylbaecatin iii 10-o-acetyltransferase	1.21	35_47875
20.1	protein	1.00	35_713
20.1	pr17d precursor	1.28	35_414
20.1	chitinase 6-like	1.14	35_20965
20.1	---NA---	1.51	35_17890
20.1	thaumatin-like protein 1b	1.22	35_18772
20.1	chitinase 5-like	1.42	35_15622
20.1	u-box domain-containing protein 21-like	1.39	35_6982
20.1	protein	1.10	35_711
20.1	endochitinase	1.05	35_17346
20.1	vacuolar defense protein	1.01	35_771
20.1	endochitinase a-like	1.29	35_15620
20.1	harpin inducing protein	1.30	35_1302
20.2	pathogenesis-related thaumatin-like protein	1.14	35_15708
20.2.1	heat-shock protein	1.26	contig3285_at
20.2.1	heat-shock protein	1.27	contig3287_x_at
20.2.1	heat-shock protein	1.81	contig3284_x_at
20.2.1	atp-dependent clp protease atp-binding subunit	-1.32	35_4256
20.2.1	heat-shock protein	1.95	35_15451
20.2.1	probable mediator of rna polymerase ii transcription subunit 37c-like	1.39	35_469
20.2.1	luminal-binding protein	1.06	35_14470
20.2.1	heat shock 22 kda protein	2.01	35_10021
20.2.1	heat-shock protein	1.18	35_15454
20.2.1	3fe-4s ferredoxin	-1.96	35_4479
20.2.1	kda heat shock chloroplastic-like	1.65	35_20962
20.2.1	heat-shock protein	1.31	35_15453
20.2.1	tpr domain containing expressed	2.30	35_19194
20.2.1	heat-shock protein	1.33	35_15452
20.2.99	oxalate oxidase gf-	1.25	contig3018_at
20.2.99	oxalate oxidase gf-	1.53	contig3017_at
20.2.99	germin-like protein 8-4	2.04	contig1517_at
20.2.99	pathogenesis-related protein prb1-2-like	1.32	contig2208_at
20.2.99	germin-like protein 3-7	1.17	contig10860_at
20.2.99	germin-like protein	1.31	35_13229
20.2.99	germin-like protein 3-8	1.18	35_18944
20.2.99	germin-like protein 8-5	1.96	35_14950
20.2.99	oxalate oxidase gf-	1.69	35_15274
20.2.99	germin-like protein subfamily 3 member 2	1.49	35_21702
20.2.99	germin-like protein 8-5	2.01	35_14954
20.2.99	germin-like protein 8-5	1.76	35_14951
20.2.99	germin-like protein 8-5	2.05	35_50935
20.2.99	germin-like protein 5-1	1.37	35_19050
20.2.99	germin-like protein 8-5	2.19	35_14955
20.2.99	---NA---	2.06	35_14953
20.2.99	germin-like protein 8-5	1.97	35_14956
20	cysteine-rich receptor-like protein kinase 20	1.51	35_20518
20	cysteine-rich receptor-like protein kinase 10-like	1.38	35_22792
20	g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase b120-like	1.44	35_9814
MISCELÁNEA			
26.2	glycosyltransferase 5	1.27	35_5886
26.2	dimboa udp-glucosyltransferase bx8-like	1.26	35_3663
26.2	beta- -galactosyltransferase 18	1.26	35_25803
26.2	probable galacturonosyltransferase 13	1.10	35_5948
26.2	indole-3-acetate beta-glucosyltransferase	1.64	35_49964
26.2	probable galacturonosyltransferase 13	1.92	35_19816
26.2	beta- -galactosyltransferase 18	1.95	35_7907
26.2	udp-glucosyltransferase 83a1-like	-1.33	35_6409
26.2	cyanidin 3-o-rutinoside 5-o-glucosyltransferase-like	-1.51	35_8024
26.2	probable glucuronosyltransferase os01g0926700-like	1.95	35_16642
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 14	-0.99	35_5392
26.4.1	beta- -glucanase precursor	2.09	35_21595
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 8-like	1.04	35_6267
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 13	1.13	35_15919
26.4.1	glucan endo- -beta-glucosidase 13	1.10	35_15920
26.4.1	lichenase-2 precursor	-1.18	35_14631
26.4	glucan endo- -beta-glucosidase 13	1.10	35_15920
26.13	chloroplast purple acid phosphatase isoform c	1.48	35_2642
26.13	purple acid phosphatase 2	1.65	35_19906
26.13	purple acid phosphatase 2-like	1.61	35_7536
PROTEÍNAS			
29.3.4.99	patellin-4-like	3.10	35_22880
29.4.1.57	protein strubbelig-receptor family 7-like	1.02	hvsme10009b19r2_s_at
29.4.1.57	serine threonine-protein kinase at5g01020-like	1.40	35_7291
29.4.1.57	serine threonine-protein kinase at5g01020	1.00	35_3964
29.4.1.57	probable serine threonine-protein kinase nak	1.19	35_17458
29.4.1.57	probable receptor-like protein kinase at5g47070	1.69	35_7107
SEÑALIZACIÓN			
30.2.2	somatic embryogenesis receptor kinase 1-like	1.05	contig3638_at
30.2.2	somatic embryogenesis receptor kinase 2-like isoform x1	1.39	contig3635_s_at
30.2.2	somatic embryogenesis receptor kinase 2-like isoform x1	1.03	35_15506
30.2.2	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 precursor	1.33	35_15510
30.2.2	somatic embryogenesis receptor kinase 2-like isoform x1	1.40	35_15508
30.2.2	somatic embryogenesis receptor kinase 1-like	1.13	35_15509
30.2.16	receptor-like protein kinase feronia	1.88	contig5561_at
30.2.16	receptor-like protein kinase herk 1	1.35	contig10499_at

BINCODE	DESCRIPCIÓN	EGRA-AGRA	IDENTIFICADOR
30.2.16	protein kinase domain containing expressed	1.17	35_23508
30.2.16	g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase at1g34300	1.27	35_9455
30.2.16	receptor-like protein kinase feronia	1.72	35_1717
30.2.16	receptor-like protein kinase herk 1	1.39	35_3289
30.2.16	receptor-like protein kinase herk 1	2.03	35_23157
30.2.16	receptor-like protein kinase feronia	1.58	35_6364
30.2.16	receptor-like protein kinase feronia	2.36	35_1718
30.2.19	receptor kinase lecrk	1.09	contig16710_at
30.2.19	lectin-domain containing receptor kinase	1.40	hs16p03u_at
30.2.19	lectin-domain containing receptor kinase	1.52	contig24522_at
30.2.19	lectin-domain containing receptor kinase	1.05	35_5850
30.2.19	lectin-domain containing receptor kinase	1.19	35_21316
30.2.19	l-type lectin-domain containing receptor kinase -like	1.16	35_26360
30.2.22	proline-rich receptor-like protein kinase perk9	1.42	contig17584_at
30.2.22	receptor protein kinase 1	1.20	contig24211_at
30.2.22	proline-rich receptor-like protein kinase perk8-like	1.37	35_5517
30.2.22	proline-rich receptor-like protein kinase perk8	2.07	35_20653
30.3	calcium-dependent protein kinase 2	2.69	contig16998_at
30.3	calmodulin-like protein 5	1.24	contig1324_at
30.3	calmodulin-related protein touch-induced	1.04	contig5941_at
30.3	calmodulin-like protein 3	1.14	35_5037
30.3	pxg_orys1j ame: full=peroxygenase	1.02	35_45386
30.3	calcium-binding protein cml31	1.21	35_23674
30.3	calcium-transporting atpase plasma membrane-type	1.09	35_4602
30.3	calcium-dependent protein kinase 1-like	2.66	35_8408
30.3	protein iq-domain 14-like	-1.26	35_3150
30.3	protein iq-domain 14-like	-1.26	35_3149
30.3	calcium-dependent protein kinase 1-like	1.84	35_11371
ORGANIZACIÓN CELULAR			
31.1.1.2	beta- partial	1.19	contig1507_at
31.1.1.2	tpa: beta tubulin6 isoform 1	1.23	35_14338
31.1.1.2	---NA---	1.13	35_49732
TRANSPORTE			
34.2	sugar carrier protein c-like	1.22	contig5537_at
34.2	polyol transporter 5-like	1.04	35_16269
34.8	---NA---	1.12	35_50423
34.8	phosphoenolpyruvate phosphate translocator chloroplast-like	-1.21	contig24832_at
34.8	phosphoenolpyruvate phosphate translocator chloroplast-like	-1.29	35_6528
34.9	s-type anion channel slah3-like	1.13	35_38703
34.9	solute carrier family 25 member 44-like	-1.44	contig26293_at
34.9	mitochondrial carrier-like protein	-1.48	35_1281
34.12	metal transporter nramp2-like	-1.22	contig24105_at
34.16	abc transporter b family member 4	1.12	35_8212
34.16	abc transporter b family member 4	1.34	contig21298_at
34.16	pleiotropic drug resistance protein 2	-1.28	35_12100
34.99	mate efflux family protein 9-like	1.24	35_25566
34.16	mate efflux family protein 9-like	1.24	35_25566
34.99	xanthine uracil vitamin c partial	1.12	contig19054_at
34.99	uncharacterized transporter ybr287w-like	1.12	rbaall12n12_s_at
34.99	uncharacterized transporter ybr287w-like	1.13	35_18641

A.1.3. Resultados de las diferencias entre concentraciones de CO₂ en G132

Transcritos diferencialmente expresados del genotipo mutante en CO₂ elevado frente al cultivado en CO₂ ambiente. Se representa la razón entre los logaritmos de la tasa de cambio (Fold Change); AG132, mutante en CO₂ ambiente; EG132, mutante en CO₂ elevado; BINCODE, códigos de agrupación por rutas metabólicas.

BINCODE	DESCRIPCIÓN	EG132-AG132	IDENTIFICADOR
20.1	cytokinin-o-glucosyltransferase 1	-1.10	35_16985
26.2	cytokinin-o-glucosyltransferase 1	-1.10	35_16985
26.2	cytokinin-o-glucosyltransferase 2	-1.56	35_3491
20.2.99	dehydrin partial	-2.03	35_14534
20.1	phytosulfokine receptor 2	-1.35	35_1343
20.1	phytosulfokine receptor 2	-1.91	35_1340
26.2	udp-glycosyltransferase 83a1-like	-1.39	35_6409
16.2	uncharacterized acetyltransferase at3g50280-like	-1.09	35_49425

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido realizado en el grupo de Fotosíntesis del Departamento de Estrés Abiótico del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) y en el grupo de Mejora Genética de Cereales de Invierno del Departamento de Cultivos Extensivos del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Lérida (IRTA).

El trabajo ha sido financiado por una Beca del Subprograma de Formación de Personal Investigador en los centros de investigación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (FPI-INIA) asociada al proyecto RTA2009-00006-C04-01, y ha sido financiado por el MINECO (AGL2009-11987) y la Junta de Castilla y León (CSI148A11-2, CSI250U13).