



CSIC



Departamento de Estrés Abiótico
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Departamento de Microbiología y Genética
Facultad de Biología
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Caracterización fisiológica, bioquímica y molecular del metabolismo del carbono y nitrógeno en plantas de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) crecidas en CO₂ elevado con distinta disponibilidad de nitrógeno

Rubén Vicente Pérez





Departamento de Estrés Abiótico
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Departamento de Microbiología y Genética
Facultad de Biología
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Caracterización fisiológica, bioquímica y molecular del metabolismo del carbono y nitrógeno en plantas de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) crecidas en CO₂ elevado con distinta disponibilidad de nitrógeno

Tesis Doctoral presentada por **Rubén Vicente Pérez** para optar al grado de Doctor con mención Internacional en Agrobiotecnología por la Universidad de Salamanca

Directora

Dra. Rosa María Morcuende Morcuende

Científica Titular del Departamento de Estrés Abiótico del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, IRNASA-CSIC

Salamanca, 2015

El presente trabajo ha sido financiado a través de los proyectos AGL2009-11987 y AGL2006-13541-C02-02, concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Rubén Vicente Pérez ha disfrutado de una ayuda para la Formación de Personal Investigador (BES-2010-031029) y de tres ayudas para la realización de estancias en otros centros de I+D en el extranjero (EEBB-I-12-05402, EEBB-I-13-06805 y EEBB-I-13-06806), concedidas por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Economía y Competitividad.

La **Dra. ROSA MARÍA MORCUENDE MORCUENDE**, Científica Titular de Organismos Públicos de Investigación, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada " **Caracterización fisiológica, bioquímica y molecular del metabolismo del carbono y nitrógeno en plantas de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) crecidas en CO₂ elevado con distinta disponibilidad de nitrógeno**", ha sido realizada por **D. RUBÉN VICENTE PÉREZ** en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) y reúne originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, firmo el presente certificado en Salamanca a 17 de julio de 2015.

Fdo.: Dra. Rosa María Morcuende Morcuende

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar el trabajo, dirección y apoyo de mi directora de Tesis, la Dra. Rosa María Morcuende Morcuende, que ha contribuido de manera fundamental a mi formación científica y me ha transmitido su pasión por la investigación, además de haber confiado en mi labor desde el primer día.

Quiero expresar también mi agradecimiento por toda la ayuda recibida por los demás miembros del grupo de investigación, al Prof. Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuenca por sus consejos, correcciones y trabajo durante el desarrollo de la Tesis, a la Dra. Pilar Pérez Pérez por su apoyo y dedicación, y a los técnicos de nuestro grupo, María Ángeles Boyero San Blas y Ángel Luis Verdejo Centeno, por toda su colaboración durante el crecimiento de las plantas y los análisis.

Al Prof. Dr. Björn Usadel de la Universidad de Aquisgrán (Aachen, Alemania) por acogerme en su grupo de investigación durante dos de mis estancias e introducirme en la bioinformática. En este sentido, también es de reconocer la ayuda recibida por parte de Anthony M. Bolger y Marie Bolger, que además hicieron más agradable mi paso por la ciudad.

Al Prof. Dr. Mark Stitt del Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas (Golm-Potsdam, Alemania) por acogerme en su grupo y por sus valiosas ideas, y al Dr. John E. Lunn por ayudarme en todo lo que pude necesitar dentro y fuera del laboratorio durante mi estancia en Potsdam. A Regina Feil, la Dra. Mutsumi Watanabe y la Dra. Stephanie Arrivault por su asistencia con las medidas de metabolitos.

A mis compañeros de andanzas Javier Córdoba Jacoste, la Dra. Ana María Mendez Espinoza, Laura Kütt, Fátima Valeros Martín y Estefanía Uberegui Bernad, y al resto de estudiantes de grado, máster y en prácticas, que hicieron más amenas las horas de trabajo en el laboratorio. También al resto de personal del IRNASA que nos ha ayudado, en especial, al Dr. José Mariano Igual Arroyo por instruirme en la estadística multivariante. A la profesora de la Universidad de Salamanca, la Dra. Josefa Babiano Puerto, por infundirme su entusiasmo por la Fisiología Vegetal en mis inicios. A los revisores externos de esta Tesis, el Dr. Gorka Erice Soreasu, el Dr. Igor Delfín Florez Sarasa y la Dra. Svetla Kostadinova, por dedicarme parte de su tiempo.

A mis padres y hermanos.

Abreviaturas

1-FEH	fructano 1-exohidrolasa	CST	carbohidratos solubles totales
1-FFT	fructano:fructano 1-fructosiltransferasa	CTEF	cadena de transporte electrónico fotosintético
1-SST	sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa	CTEM	cadena de transporte electrónico mitocondrial
2PGA	2-fosfoglicerato	CV	coeficiente de variación
3PGA	3-fosfoglicerato	Cys	cisteína
6-FEH	fructano 6-exohidrolasa	Cytb_{6f}	complejo citocromo b _{6f}
6-KEH	6-kestotriosa exohidrolasa	DBE	enzimas desramificantes de almidón
6-SFT	sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa	dds	días después de la siembra
6&1-FEH	fructano 6&1-exohidrolasa	DHAP	dihidroxiacetona fosfato
6G-SFT	fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa	DHPS	dihidrodipicolinato sintasa
AAT	aspartato aminotransferasa	DiT1	translocador 2-oxoglutarato/malato
ACO	aconitasa	DiT2	translocador glutamato/malato
ADN	ácido desoxirribonucleico	dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
ADNasa	desoxirribonucleasa	E	velocidad de transpiración
ADNc	ADN complementario	E4P	eritrosa-4-fosfato
ADNg	ADN genómico	EC	clasificación numérica de enzimas (<i>Enzyme Commission number</i>)
ADP	adenosina difosfato	EFH	tratamiento: CO ₂ elevado, alta temperatura y alto aporte de nitrógeno
ADP-glucosa	adenosina difosfato glucosa	EH	tratamiento: CO ₂ elevado y alto aporte de nitrógeno
ADP-RF	factor de ribosilación-ADP	EIH	tratamiento: CO ₂ elevado, temperatura ambiente y alto aporte de nitrógeno
AFH	tratamiento: CO ₂ ambiente, alta temperatura y alto aporte de nitrógeno	EFL	tratamiento: CO ₂ elevado, alta temperatura y bajo aporte de nitrógeno
AFL	tratamiento: CO ₂ ambiente, alta temperatura y bajo aporte de nitrógeno	EIL	tratamiento: CO ₂ elevado, temperatura ambiente y bajo aporte de nitrógeno
AGPPasa	ADP-glucosa-pirofosfatasa	EL	tratamiento: CO ₂ elevado y bajo aporte de nitrógeno
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa	Emerg	estadio de desarrollo: emergencia de la espiga
AH	tratamiento: CO ₂ ambiente y alto aporte de nitrógeno	ENO	enolasa
AIH	tratamiento: CO ₂ y temperatura ambiente y alto aporte de nitrógeno	EST	etiqueta de secuencia expresada
AIL	tratamiento: CO ₂ y temperatura ambiente y bajo aporte de nitrógeno	F2,6BP	fructosa-2,6-bisfosfato
AK	aspartato quinasa	F2KBP	fructosa-6-fosfato-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa
Ala	alanina	F6P	fructosa-6-fosfato
ALA	ácido 5-aminolevulínico	FACE	sistemas de enriquecimiento en CO ₂ al aire libre
AL	tratamiento: CO ₂ ambiente y bajo aporte de nitrógeno	FAD	flavin adenín dinucleótido (oxidado)
ALT	alanina aminotransferasa	FADH₂	flavin adenín dinucleótido (reducido)
AMP	adenosina monofosfato	FBA	fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa
ANRm	actividad nitrato reductasa máxima	FBP	fructosa-1,6-bisfosfato
ANRs	actividad nitrato reductasa selectiva	FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
A_n	tasa fotosintética o velocidad de asimilación fotosintética del CO ₂	Fd	ferredoxina
Ant	antesis	Fd_{ox}	ferredoxina oxidada
Arg	arginina	Fd_{red}	ferredoxina reducida
ARI	actividad Rubisco inicial	FEH	fructano exohidrolasas
ARN	ácido ribonucleico	Feo	feofitina
ARNasa	ribonucleasa	Fig.	figura
ARNi	ARN de interferencia	FNR	ferredoxina NADP reductasa
ARNm	ARN mensajero	FT	fructosiltransferasa
ARNr	ARN ribosómico	FTR	ferredoxina-tiorredoxina reductasa
ARNt	ARN de transferencia	G1P	glucosa-1-fosfato
ART	actividad Rubisco total	G6P	glucosa-6-fosfato
AS	asparagina sintetasa	G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Asn	asparagina	Gal6P	galactosa-6-fosfato
Asp	aspartato	GAP	gliceraldehído-3-fosfato
ATP	adenosina trifosfato	GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
ATPasa	ATP sintasa	GAPN	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante
BE	enzimas ramificantes de almidón	GBP	glucosa-1,6-bisfosfato
BSA	seroalbumina bovina	GBSS	almidón sintasa unida a gránulos
C	carbono	GDC	complejo glicina descarboxilasa
CA	anhidrasa carbónica	GDH	glutamato deshidrogenasa
CAT	catalasa	GEI	gases de efecto invernadero
CesA	complejo celulosa sintasa	GGAT	glutamato:glioxilato aminotransferasa
chl	clorofilas	Gly3P	glicerol-3-fosfato
chl a	clorofila a	Glu	ácido glutámico o glutamato
chl b	clorofila b	GluTR	glutamil-tRNA reductasa
C_i	concentración de CO ₂ intercelular	Gln	glutamina
CDC	proteína de control de división celular	Gly	glicina
CKs	citoquininas		
CO₂	dióxido de carbono		
CS	citrato sintasa		

g_m	conductancia del mesófilo	PEP	fosfoenolpiruvato
GO	glicolato oxidasa	PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilasa
GOGAT	glutamato sintasa	PF	peso fresco
GPT	translocador de glucosa-6-fosfato/fosfato	PFK	fosfofructoquinasa dependiente de ATP
g_s	conductancia estomática	PFP	fosfofructoquinasa dependiente de PP_i
GS	glutamina sintetasa	PGAM	fosfoglicerato mutasa
GWD	glucano-agua diquinasa	PGI	fosfoglicosa isomerasa
H⁺	protón	PGK	fosfoglicerato quinasa
H₂O	agua	PGLP	2-fosfoglicolato fosfatasa
H₂O₂	peróxido de hidrógeno	PGM	fosfoglucomutasa
HATS	sistema de transporte de alta afinidad	Phe	fenilalanina
His	histidina	P_i	fosfato inorgánico
HPs	hexosas fosfato	PK	piruvato quinasa
HPR	hidroxipiruvato reductasa	PNUE	uso eficiente de N en la fotosíntesis
HSD	homoserina deshidrogenasa	PP_i	pirofosfato
HSP	proteína de choque térmico	PRK	fosforribuloquinasa
HXK	hexoquinasa	Pro	prolina
ICDH	isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP	PRPP	fosforribosil pirofosfato
IDH	isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD	PS	peso seco
INV	invertasa	PSI	fotosistema I
IPCC	Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático	PSII	fotosistema II
IPP	pirofosfatasa inorgánica	PWD	fosfoglicano-agua diquinasa
Ile	isoleucina	R	coeficiente de correlación de Pearson / software informático
ILG	inicio del llenado del grano	R5P	ribosa-5-fosfato
ISO	isoamilasa	RBA	Rubisco activasa
IWGSC	Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma del Trigo	R_a	velocidad de respiración mitocondrial en la luz
J	velocidad de transporte electrónico	ROS	especies reactivas de oxígeno
K	potasio	RLI	inhibidor ARNasa L
k_{cat}	eficiencia catalítica de la Rubisco	RPE	ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa
LATS	sistema de transporte de baja afinidad	RPI	ribosa-5-fosfato isomerasa
Leu	leucina	Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
LHCI	complejo cosechador de luz del fotosistema I	Ru5P	ribulosa-5-fosfato
LHCII	complejo cosechador de luz del fotosistema II	RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfato
Lys	lisina	S6P	sacarosa-6-fosfato
Man6P	manosa-6-fosfato	S7P	sedoheptulosa-7-fosfato
MDH	malato deshidrogenasa	SBP	sedoheptulosa-1,7-bisfosfato
Met	metionina	SBPasa	sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
MgCh	magnesio quelatasa	Ser	serina
MoCo	cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa	SGAT	serina:glioxilato aminotransferasa
MSA	alineamiento múltiple de secuencias	SHMT	serina hidroximetiltransferasa
N	nitrógeno	SNP	polimorfismo de nucleótido simple
N₂	nitrógeno atmosférico	SnRK1	proteína quinasa-1 relacionada con SNF1
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)	SPP	sacarosa-fosfato fosfatasa
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)	SPS	sacarosa-fosfato sintasa
NADP⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada)	SS	almidón sintasa soluble
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)	SUS	sacarosa sintasa
NAGK	N-acetilglutamato quinasa	T6P	trehalosa-6-fosfato
NAGS	N-acetilglutamato sintasa	TC	secuencia tentativa consenso
NGS	secuenciación de nueva generación	TCA	ácidos tricarbóxicos
NH₃	amoníaco	TF	factor de transcripción
NH₄⁺	amonio	TGC	cámaras de gradiente de temperatura
NiR	nitrito reductasa	Thr	treonina
NO₂⁻	nitrito	TK	transquetolasa
NO₃⁻	nitrato	TP	triosas fosfato
NR	nitrato reductasa	TPI	triosa fosfato isomerasa
O₂	oxígeno atmosférico	TPP	trehalosa-6-fosfato fosfatasa
OAA	oxaloacetato	TPS	trehalosa-6-fosfato sintasa
OEC	complejo productor de oxígeno	TPT	translocador de triosas fosfato/fosfato
OGDC	complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa	TPU	velocidad de uso de triosas fosfato
OPPP	ciclo oxidativo de las pentosas fosfato	TRE	trehalasa
OTC	cámaras de techo abierto	Trp	triptófano
P	fósforo	Trx	tiorredoxina
P	valor de <i>P</i> (probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta)	Tyr	tirosina
pb	pares de bases	UDP-glucosa	uridina difosfato glucosa
PC	plastocianina	UGPasa	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa
PDC	complejo piruvato deshidrogenasa	U	unidad
		Val	valina
		V_{c,max}	velocidad máx. de carboxilación de la Rubisco
		vs	versus
		WUE	uso eficiente de agua
		Xu5P	xilulosa-5-fosfato

Índice

Agradecimientos	v
Abreviaturas	vii
Índice	ix
Prefacio.....	1
Abstract.....	3
CAPÍTULO 1: Introducción	5
1.1. Cambio Climático. Causas y efectos.....	6
1.2. El trigo.....	10
1.2.1. Morfología y ciclo vegetativo del trigo	10
1.2.2. Domesticación del trigo	11
1.2.3. Cultivo del trigo.....	12
1.2.4. Secuenciación del genoma de trigo.....	13
1.3. Fijación de carbono.....	15
1.3.1. Fotosíntesis: características generales.....	15
1.3.2. Absorción de la luz	15
1.3.3. Transporte electrónico fotosintético y fotofosforilación	17
1.3.4. Ciclo de Calvin-Benson	20
1.3.5. Fotorrespiración	26
1.3.6. Metabolismo de carbohidratos	28
1.3.6.1. Almidón	29
1.3.6.2. Sacarosa	30
1.3.6.3. Fructanos	32
1.3.6.4. Trehalosa	35
1.3.7. Respiración	36
1.3.7.1. Glicólisis.....	36
1.3.7.2. Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato	38
1.3.7.3. Ciclo de los ácidos tricarbónicos	39
1.3.7.4. Transporte electrónico mitocondrial	40
1.4. Asimilación de nitrógeno	41
1.4.1. Absorción y transporte de nitrógeno del suelo.....	41
1.4.2. Reducción de nitrato a amonio	44
1.4.3. Asimilación de amonio	46
1.4.4. Biosíntesis de aminoácidos y compuestos nitrogenados.....	48
1.5. Efectos del Cambio Climático en la agricultura	52
1.5.1. Efecto directo del aumento de la concentración de CO ₂ en las plantas	53
1.5.2. Efecto del crecimiento prologando a concentraciones de CO ₂ elevadas en las plantas	54
1.5.2.1. Efecto de la temperatura del aire en la respuesta de las plantas al CO ₂ elevado	59
1.5.2.2. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la respuesta de las plantas al CO ₂ elevado	61
CAPÍTULO 2: Objetivos	63
CAPÍTULO 3: Materiales y métodos	67
3.1. Diseño experimental.....	68
3.1.1. Material vegetal	68
3.1.2. Experimento 1: cultivo hidropónico (abril-julio de 2011)	68
3.1.3. Experimento 2: cultivo hidropónico (mayo-julio 2012)	71
3.1.4. Experimento 3: cultivo de campo (octubre de 2007-mayo de 2008)	74
3.2. Metodología	78
3.2.1. Parámetros de crecimiento.....	78

3.2.2. Absorción de nitrato y de solución nutritiva	79
3.2.3. Determinación de nitrógeno	80
3.2.4. Medida de la fotosíntesis <i>in vivo</i>	82
3.2.5. Medida de la fluorescencia de la clorofila	84
3.2.6. Valoración de compuestos del metabolismo del carbono y nitrógeno	85
3.2.6.1. Clorofilas	85
3.2.6.2. Extracción con etanol-agua	86
3.2.6.2.1. Glucosa y fructosa	87
3.2.6.2.2. Sacarosa	88
3.2.6.2.3. Fructanos	88
3.2.6.2.4. Carbohidratos solubles totales	89
3.2.6.2.5. Almidón	89
3.2.6.2.6. Aminoácidos totales	89
3.2.6.2.7. Determinación de aminoácidos por HPLC	90
3.2.6.3. Extracción con ácido perclórico	91
3.2.6.3.1. Hexosas fosfato	91
3.2.6.3.2. 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato	92
3.2.6.3.3. Adenosina trifosfato	92
3.2.6.3.4. 2-oxoglutarato	93
3.2.6.4. Extracción con cloroformo-metanol	93
3.2.6.4.1. Determinación de intermediarios metabólicos por cromatografía de intercambio aniónico AEC-MS/MS	94
3.2.6.4.2. Determinación de intermediarios metabólicos por cromatografía de pares iónicos IPC-MS/MS	95
3.2.6.5. Determinación del contenido de iones	96
3.2.6.5.1. Nitrato	96
3.2.6.5.2. Iones por cromatografía iónica IC	96
3.2.6.6. Determinación de proteínas	97
3.2.6.6.1. Proteínas totales	97
3.2.6.6.2. Proteínas solubles	97
3.2.6.6.3. Proteínas de membrana	98
3.2.6.6.4. Cuantificación de Rubisco por electroforesis SDS-PAGE y densitometría	98
3.2.7. Análisis de actividades enzimáticas	99
3.2.7.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad Rubisco	99
3.2.7.2. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad nitrato reductasa	101
3.2.8. Análisis de la expresión de genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno por qRT-PCR	102
3.2.8.1. Identificación de los genes de estudio	103
3.2.8.2. Diseño de primers	106
3.2.8.3. Aislamiento y cuantificación de ARN	106
3.2.8.4. Digestión de ADN genómico	108
3.2.8.5. Síntesis de ADN complementario	109
3.2.8.6. Condiciones de la qRT-PCR	109
3.2.8.7. Validación de los primers diseñados	111
3.2.8.8. Normalización y análisis de los resultados de expresión génica	112
3.2.9. Visualización de datos biológicos en rutas metabólicas	114
3.2.10. Tratamiento estadístico y representación gráfica de los datos	115

CAPÍTULO 4: Experimento 1..... 119

4.1. Resultados del experimento 1..... 120

4.1.1. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el crecimiento de las plantas	120
4.1.1.1. Peso seco de las diferentes partes de la planta	120
4.1.1.2. Contenido de agua de las diferentes partes de la planta	121
4.1.1.3. Área verde de las diferentes partes de la planta	121
4.1.1.4. Peso seco por área foliar	122
4.1.1.5. Número de tallos y espigas por planta y longitud de la raíz	122
4.1.2. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la absorción de solución nutritiva y nitrato	123
4.1.3. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido y la distribución del nitrógeno en la planta	124
4.1.3.1. Porcentaje de nitrógeno en materia seca de las diferentes partes de la planta	124
4.1.3.2. Contenido de nitrógeno por órgano	125
4.1.3.3. Distribución porcentual del nitrógeno entre órganos sobre el total de la planta	125
4.1.3.4. Contenido de nitrógeno por superficie foliar	127
4.1.3.5. Contenido de nitrato en la hoja bandera y la raíz	127
4.1.4. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el intercambio gaseoso	127
4.1.5. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de compuestos del metabolismo del carbono y nitrógeno	130

4.1.5.1. Contenido de carbohidratos en la hoja bandera y la raíz	130
4.1.5.2. Contenido foliar de clorofilas	130
4.1.5.3. Contenido de hexosas fosfato en la hoja bandera y la raíz	131
4.1.5.4. Contenido de 2-oxoglutarato en la hoja bandera y la raíz	131
4.1.5.5. Contenido de aminoácidos en la hoja bandera y la raíz	131
4.1.5.6. Contenido de proteínas totales, solubles y de membrana en la hoja bandera y la raíz	134
4.1.5.7. Contenido de proteína Rubisco	134
4.1.6. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la actividad de enzimas del metabolismo del carbono y nitrógeno	135
4.1.6.1. Actividad Rubisco en la hoja bandera	135
4.1.6.2. Actividad nitrato reductasa en la hoja bandera y la raíz	136
4.1.7. Diseño y optimización de una plataforma de PCR cuantitativa en tiempo real para estudios de expresión génica en trigo duro	136
4.1.7.1. Evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes de referencia para la normalización de resultados de la qRT-PCR	136
4.1.7.2. Validación de los genes incorporados a la plataforma para estudios de expresión génica	137
4.1.8. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la expresión de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz	143
4.1.9. Integración de los resultados de metabolitos, transcritos y proteína Rubisco	146
4.1.10. Relaciones lineales y redes de correlación entre parámetros	155
4.2. Discusión del experimento 1	159
CAPÍTULO 5: Experimento 2	179
5.1. Resultados del experimento 2	180
5.1.1. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el crecimiento de las plantas ...	180
5.1.1.1. Peso seco de las diferentes partes de la planta	180
5.1.1.2. Contenido de agua de las diferentes partes de la planta	180
5.1.1.3. Peso seco por área foliar	180
5.1.1.4. Número de tallos por planta y longitud de la raíz	181
5.1.2. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la absorción de solución nutritiva y nitrato	181
5.1.3. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de nitrato de la planta y en el contenido de nitrógeno orgánico por superficie foliar	182
5.1.4. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el intercambio gaseoso	183
5.1.5. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la fluorescencia de la clorofila	184
5.1.6. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de compuestos del metabolismo del carbono y del nitrógeno	185
5.1.6.1. Contenido de nucleótidos de adenina y piridina en la hoja bandera y la raíz	185
5.1.6.2. Contenido foliar de clorofilas	185
5.1.6.3. Contenido de metabolitos del ciclo de Calvin-Benson y de la síntesis de carbohidratos en la hoja bandera y la raíz	185
5.1.6.4. Contenido de metabolitos de la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ácidos orgánicos en la hoja bandera y la raíz	186
5.1.6.5. Contenido de aminoácidos en la hoja bandera y la raíz	187
5.1.6.6. Contenido de proteínas totales, solubles y de membrana en la hoja bandera y la raíz	193
5.1.6.7. Contenido de proteína Rubisco	193
5.1.7. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de iones en la hoja bandera y la raíz	194
5.1.8. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la actividad de enzimas del metabolismo del carbono y nitrógeno	195
5.1.8.1. Actividad Rubisco en la hoja bandera	195
5.1.8.2. Actividad nitrato reductasa en la hoja bandera y la raíz	195
5.1.9. Análisis multivariable del contenido de metabolitos, proteínas e iones y de las actividades enzimáticas	196
5.1.10. Efecto del CO ₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la expresión de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz	199
5.1.11. Integración de los resultados de metabolitos, transcritos y proteína Rubisco	202
5.1.12. Redes de correlación entre parámetros	211
5.2. Discusión del experimento 2	214

CAPÍTULO 6: Experimento 3.....	237
6.1. Resultados del experimento 3.....	238
6.1.1. Efecto del CO ₂ de crecimiento, la temperatura y la fertilización nitrogenada en los parámetros fisiológicos y bioquímicos. Resultados previos	238
6.1.2. Efecto del CO ₂ de crecimiento, la temperatura y la fertilización nitrogenada en la expresión de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno de la hoja bandera	240
6.1.3. Integración de los resultados de metabolitos, transcritos y proteínas.....	245
6.1.4. Red de correlación entre parámetros del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro bajo distintas condiciones ambientales. Experimentos 1, 2 y 3.....	248
6.2. Discusión del experimento 3	253
CAPÍTULO 7: Conclusiones - Conclusions	263
CAPÍTULO 8: Anexos	267
CAPÍTULO 9: Bibliografía	275

Prefacio

La quema de combustibles fósiles, la industrialización, la deforestación y, en menor medida, los cambios en el uso de la tierra han conducido a un rápido incremento de los niveles de dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero en la atmósfera desde la Revolución Industrial. Los pronósticos de Cambio Climático auguran una elevación de la temperatura media de la superficie terrestre en asociación con una duplicación de la concentración atmosférica de dióxido de carbono para finales de siglo, junto a episodios de precipitaciones intensas y periodos de sequía más frecuentes y severos que conducirán a una escasez de recursos hídricos y a la degradación de los suelos, cambios que afectarán al crecimiento y desarrollo de las plantas y repercutirán en la productividad y rendimiento agrícola en muchas regiones del mundo. El incesante crecimiento de la población a nivel mundial incrementará la demanda de productos agrícolas, por lo que la necesidad de satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos en un ambiente cambiante y garantizar la seguridad alimentaria constituye uno de los grandes desafíos a los que se enfrenta la investigación agrícola en el presente siglo.

El crecimiento prolongado de las plantas a concentraciones elevadas de dióxido de carbono conduce a un fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis. Esta pérdida de capacidad fotosintética se acompaña de un descenso de actividad y proteína Rubisco, una acumulación de carbohidratos y una disminución del estado nitrogenado de la planta, que parece ser más acusado cuando las plantas crecen con un suministro de nitrógeno limitante. El trigo es uno de los cultivos agrícolas más importantes para la alimentación humana, que se cultiva principalmente en zonas semiáridas con una disponibilidad de nutrientes y recursos hídricos limitante. Las condiciones ambientales para el nuevo escenario climático agudizarán estas limitaciones, en especial, en regiones mediterráneas semiáridas propias de nuestro entorno geográfico. Para el sostenimiento del rendimiento de los cultivos se necesitaría incrementar la aplicación de fertilizantes nitrogenados, lo cual, sin duda, sería económicamente costoso y nocivo para el ambiente, que generaría problemas de contaminación hídrica y edáfica.

En respuesta a estos desafíos, esta Tesis Doctoral lleva a cabo investigaciones para profundizar en la comprensión de los mecanismos implicados en el desequilibrio en el estado de carbono y nitrógeno que subyace en la aclimatación del trigo duro a la concentración de dióxido de carbono elevada en función de la disponibilidad de nitrógeno y en interacción con la temperatura. A tal fin, es de utilidad el desarrollo y optimización de una herramienta para estudios de expresión génica que incluya un amplio grupo de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno, lo cual facilitará la integración del patrón de expresión génica con los cambios en la biomasa, los niveles de metabolitos y actividades de enzimas de dichos metabolismos que están implicados en la respuesta de aclimatación. La finalidad es generar nuevos conocimientos sobre los mecanismos de regulación y señalización involucrados en la respuesta de las plantas a los cambios ambientales futuros. La sostenibilidad de la productividad agrícola supondrá un desafío para la investigación agrícola que requerirá mejorar la eficiencia productiva de los cultivos a través de programas de mejora convencional o de ingeniería genética con un menor impacto medioambiental en el nuevo escenario climático.

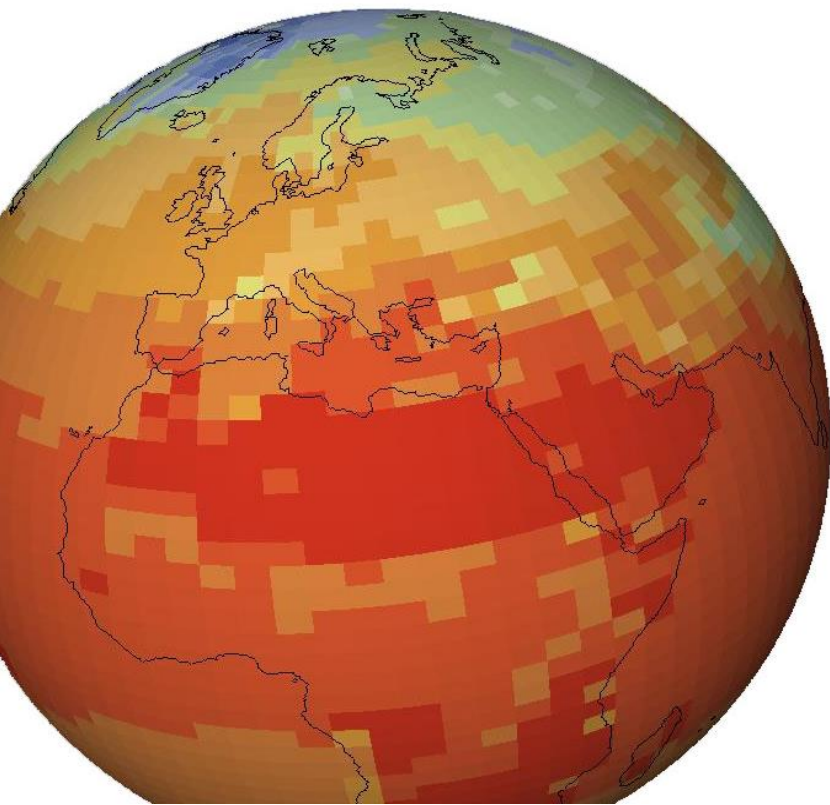
Abstract

Thesis: Physiological, biochemical and molecular characterization of carbon and nitrogen metabolism of durum wheat plants (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) grown in elevated CO₂ at different nitrogen availabilities.

Summary: Climate change is a major challenge to food security, thus it is important to understand how future crops can be bred to withstand adverse environmental conditions. Growth in elevated CO₂ often leads to a down-regulation of photosynthesis and a loss of nitrogen in plant tissues, indicative of a shift in the carbon-nitrogen balance of the plant and highlighting the importance of studying the tight interaction between both metabolic pathways. The overall aim of this Doctoral Thesis is to understand the mechanisms involved in the decline of N found in plants grown in elevated CO₂ through the integrated investigation of biomass, gene expression, possible post-translational modifications, enzyme activities and levels of metabolites and other compounds of the plants. To achieve this goal (a) a qRT-PCR platform for analysing the expression of carbon and N metabolism genes in durum wheat has been developed; (b) it has been analysed whether growth in elevated CO₂ limits N uptake when nutrient movement to roots is unrestricted, by using hydroponic cultures; (c) whether N availability and plant development modify the effect of CO₂ enrichment on N uptake and allocation within plants has been assessed; and (d) the transcriptional response to elevated [CO₂] and high temperature at two N supplies in durum wheat grown in field chambers, and its relationship with other biochemical and physiological parameters has also been investigated. In this research, the qRT-PCR primer platform developed has enabled us to measure transcript levels in leaves for 125 genes and in roots for 38 genes. In wheat grown in hydroponic culture, elevated CO₂ did not affect the nitrate uptake per unit root mass at anthesis, irrespective of N availability in the nutrient solution, but decreased it at early grain filling in plants with suboptimal N supply. Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ was found in plants with superoptimal, but not with suboptimal N supply, in association in the latter with an improvement of leaf N status induced by elevated CO₂, which was accompanied by the induction of genes for photosynthesis and N assimilation, and increases of Rubisco protein and activity, and amino acid and protein contents. In contrast, in plants with superoptimal N supply, the decline of photosynthetic capacity was related to a loss of Rubisco protein and a limitation in photosynthetic electron transport due to the inhibition of N assimilation. However, when N availability was more restricted, growth at elevated CO₂ led to a down-regulation of photosynthesis in N deficient plants but not in those with optimal N supply, probably because with the latter N assimilation was not inhibited, organic nitrogen content was not reduced in flag leaves, and a strong up-regulation of nitrogen metabolism genes occurred in the roots. In N deficient plants, elevated CO₂ increased the biomass of the plants and the carbohydrate content in the flag leaf, but sharply decreased the foliar levels of ATP, ADP, NADP, RuBP, FBP, glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates and amino acids, and also repressed genes for N assimilation and induced a decline of N concentration per unit flag leaf area. When durum wheat was grown in field chambers, elevated CO₂ also caused down-regulation of photosynthetic capacity and loss of N compounds, including Rubisco, associated with a repression of genes involved in photosynthesis and N assimilation, particularly at low N supply. High temperatures increased stomatal conductance and thus did not inhibit photosynthesis, even though Rubisco protein and activity, soluble protein and leaf N were decreased and gene expression for photosynthesis and N assimilation was also repressed. The results from the hydroponic experiments suggest that elevated CO₂ restricts N uptake late in development, superoptimal N supply overriding this restriction. Increased N allocation to the shoot, mainly to the flag leaf, at suboptimal N supply could alleviate photosynthetic acclimation to elevated CO₂. When N availability was more restricted by reducing frequency of renewal as well as concentration of the nutrient solution, the photosynthesis in N deficient plants was limited by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation and regeneration. Finally, the results of the field experiment showed that under future Climate Change scenario, C fixation capacity and N assimilation will be down-regulated in an N supply-dependent extent. This investigation can contribute to higher and more stable crop yield of durum wheat in the face of Climate Change, and can suggest criteria that potentially can be used directly in conventional breeding programmes.

Keywords: elevated CO₂ • nitrogen • acclimation • nitrate uptake • primary metabolism • qRT-PCR • transcript profiling • Rubisco • nitrate reductase • nitrogen allocation • carbohydrates • high temperature • *Triticum durum*

CAPÍTULO 1: Introducción



1.1. Cambio Climático. Causas y efectos

El clima de la Tierra está determinado básicamente por la radiación solar, la densidad de la atmósfera y su capacidad para absorber y retener esta radiación (Sorokhtin *et al.*, 2011). El Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) señala que el término Cambio Climático se refiere a una variación en el clima (bien sea en el valor medio y/o en la variabilidad de sus propiedades) que persiste durante un período prolongado, tanto si es consecuencia de la variabilidad natural como de la actividad humana. Sin embargo, el artículo 1 de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático relaciona el Cambio Climático con un cambio del clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana. El sistema climático consta de distintos componentes, que incluyen a la atmósfera, la hidrosfera, la litosfera, la biosfera y la criosfera, junto a un sexto componente incorporado recientemente, el sistema socioeconómico. Este último parece alterar el clima a una velocidad mayor que los anteriores, como consecuencia del modelo económico y energético establecido en la actualidad. Por ello, el Cambio Climático representa uno de los problemas ambientales más importantes a los que se enfrenta la humanidad y constituye una de las principales amenazas para la mejora sostenible de la producción agrícola.

La radiación solar determina el sistema climático terrestre. De la radiación solar incidente en el planeta, una parte (50%) es reflejada por la atmósfera (gases, aerosoles y nubes) y la superficie terrestre (albedo), y la restante es absorbida por ambas (20% y 30%, respectivamente). La superficie terrestre reemite la energía en forma de radiación infrarroja, que en parte puede perderse en el espacio o, en su mayoría, ser reabsorbida por las nubes y los gases de efecto invernadero (GEI). Los GEI son aquellos componentes gaseosos de la atmósfera que absorben y reemiten radiación infrarroja. Este hecho produce el calentamiento de la superficie terrestre y la troposfera, que mantiene una temperatura esencial para la vida en la Tierra (efecto invernadero natural).

Los principales GEI son el vapor de agua, el dióxido de carbono (CO_2), el ozono (O_3), el metano (CH_4), el óxido nitroso (N_2O), los halocarbonos (grupo de gases que contienen F, Cl y Br) y otros gases industriales. Aun cuando la mayoría de los GEI se producen de forma natural, su concentración está aumentando como resultado directo de las actividades antropogénicas. El análisis del aire retenido en núcleos de hielo ha mostrado que la concentración de CO_2 , CH_4 y N_2O ha aumentado a niveles nunca vistos en los últimos 800.000 años (IPCC, 2013). Durante ese periodo, la concentración de estos tres gases permaneció relativamente constante, con valores máximos de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 , $800 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CH_4 y $300 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de N_2O en periodos interglaciares, y mínimos de 180, 350 y 200, respectivamente, en periodos glaciares (Fig. 1.1a). Sin embargo, en 2011 la concentración de CO_2 , CH_4 y N_2O fue de $391 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, $1803 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $324 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que supone un aumento con respecto a la época preindustrial (1750) de un 40%, 150% y 20%, respectivamente (MacFarling Meure *et al.*, 2006; IPCC, 2013). En la anualidad de 2014, se alcanzó una $[\text{CO}_2]$ media de $398,55 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, medido en el observatorio Mauna Loa de Hawaii (Dr. Tans y Dr. Keeling, www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/).

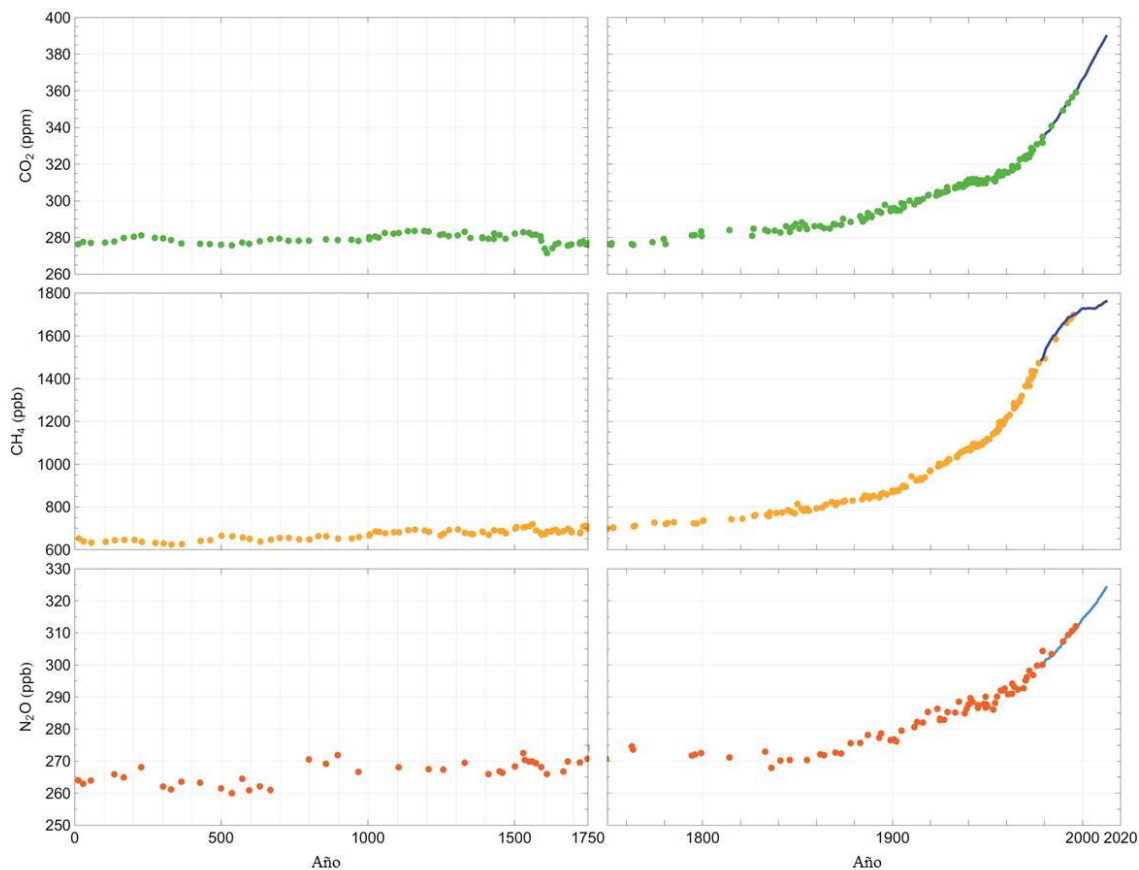


Fig. 1.1a. Concentración atmosférica de CO₂, CH₄ y N₂O desde el año 0 hasta la era industrial (izquierda) y desde la era industrial a la actualidad (IPCC, 2013). Las concentraciones fueron determinadas a partir del aire contenido en núcleos de hielo (símbolos de colores) y de medidas directas de la atmósfera (líneas azules, medidas en el observatorio del Cabo Grim, Australia) (MacFarling Meure *et al.*, 2006; IPCC, 2013).

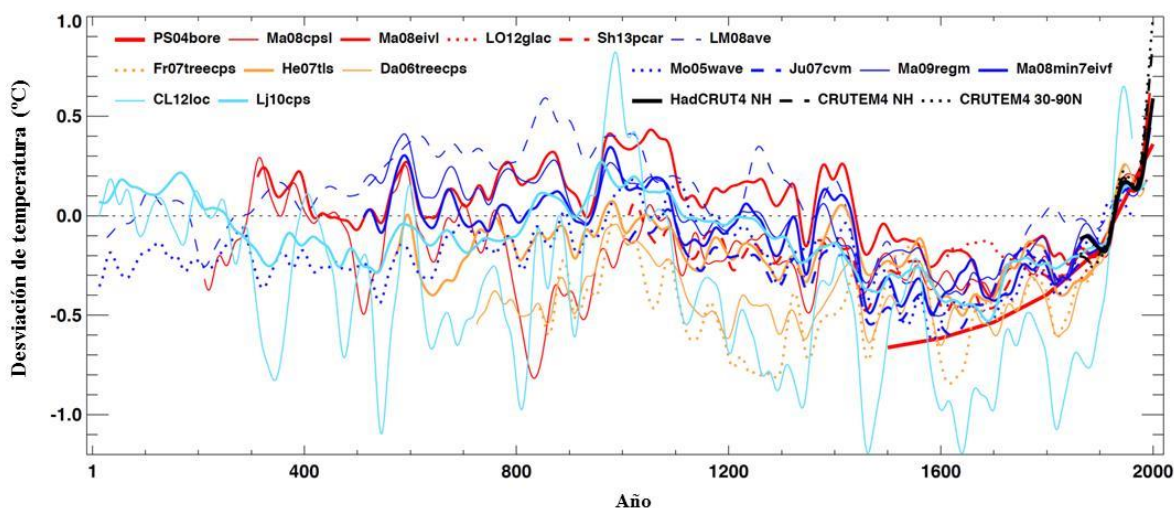


Fig. 1.1b. Reconstrucción de los cambios de temperatura media global en los últimos 2000 años (IPCC, 2013). Se muestra la desviación de temperatura del Hemisferio Norte con respecto al valor medio de temperatura de 1881 a 1980 para diferentes reconstrucciones en los últimos 2000 años. En rojo y naranja se muestran las reconstrucciones de temperaturas de la superficie terrestre de diferentes latitudes, en azul de la superficie terrestre con la del océano y en negro las temperaturas medidas con instrumentación. Cada reconstrucción individual viene detallada en el Apéndice 5.A.1 del IPCC (2013).

El CO₂ tiene como principales fuentes naturales los océanos, los volcanes, los incendios y la respiración de los seres vivos, entre otros, y como principal sumidero la fotosíntesis de las plantas. La combustión de combustibles fósiles como carbón, petróleo y gas, y la producción de cemento (debidos a la industrialización) y, en menor medida, los cambios en el uso de la tierra (principalmente la deforestación, que causa una reducción del carbono almacenado), han conducido a un rápido aumento en los niveles de CO₂ atmosférico. Se considera el GEI antropogénico más importante, determinante del calentamiento del planeta en las próximas décadas (IPCC, 2013). El aumento de CO₂ en la atmósfera se produjo a razón de 1,7 μmol·mol⁻¹·año⁻¹ de 1980 a 2011 (2,0 de 2002 a 2011). Las estimaciones realizadas muestran que de 1750 a 2011 se han acumulado 555 Gt de carbono (C) de origen antropogénico en la atmósfera y, de ellos, unas 375 Gt de C se asociaron a emisiones de CO₂ y 180 al cambio en el uso del suelo. De ese total, 240 Gt de C se acumularon en la atmósfera, 155 en el océano y 160 en los ecosistemas terrestres (IPCC, 2013). Por ello, el CO₂ atmosférico ha aumentado en menor medida de lo que podría hacerlo gracias al ciclo del C de la hidrosfera y la litosfera-biosfera, que ayudan a mitigar el Cambio Climático inducido por el CO₂. Sin embargo, entre las consecuencias más graves de los cambios descritos, destaca la acidificación de los océanos, que han absorbido un 30% del CO₂ emitido desde el inicio de la industrialización (IPCC, 2013).

La temperatura global media, considerando la superficie terrestre y el océano, ha aumentado 0,85 °C entre 1880 y 2012 (IPCC, 2013). La temperatura media del Hemisferio Norte de los últimos 30-50 años ha excedido muy probablemente la temperatura media de cualquier otro intervalo de 30-50 años de los últimos 800 años (Fig. 1.1b). Durante el primer milenio, la temperatura media de algún intervalo de 50 años pudo haber sido superior a la actual (1963-2012), no obstante, en ningún momento se alcanzaron las temperaturas elevadas observadas en los últimos 30 años. De proseguir las emisiones de GEI al ritmo actual o mayor, se intensificaría el calor retenido en la atmósfera y tendrían lugar numerosos cambios en el sistema climático mundial durante el siglo XXI (efecto invernadero antropogénico), muy probablemente de una magnitud superior a los observados durante el siglo XX. Las previsiones de los cambios en la [CO₂] atmosférica dependerán del panorama de emisiones más que de los cambios físicos en el Cambio Climático. Las emisiones acumuladas de CO₂ para el periodo 2012-2100 se estiman en 140-410 Gt de C para el escenario más favorable, y en 1415-1910 para el más desfavorable (IPCC, 2013). La [CO₂] podría oscilar en un rango de 421-985 μmol·mol⁻¹ considerando todas las predicciones, y de 794-1142 μmol·mol⁻¹ considerando únicamente el escenario con unas emisiones antropogénicas similares a las actuales (IPCC, 2013). Al igual que para las emisiones de GEI, los cambios de temperatura dependerán del escenario futuro pronosticado. Diferentes modelos de simulación indican que la temperatura media global aumentará, con respecto a la observada en 1986-2005, 0,3-1,7 °C en el escenario más favorable y 2,6-4,8°C en el más desfavorable durante el siglo XXI (Fig. 1.1c; IPCC, 2013).

Según los informes del IPCC, el calentamiento del sistema climático es (i) inequívoco, como evidencian ya los aumentos observados en el promedio mundial de la temperatura del aire y del océano, el deshielo generalizado de nieves y hielos, y el aumento del promedio mundial del nivel del mar; (ii) inusual, tratándose de un calentamiento con un comportamiento diferente a lo que dicen los estudios paleoclimáticos; (iii) de origen antropogénico en su mayor parte; y (iv) tiene una proyección inquietante, ya que la inercia actual del planeta conduciría a seguir con el calentamiento incluso si se minimizan o anulan las emisiones actuales.

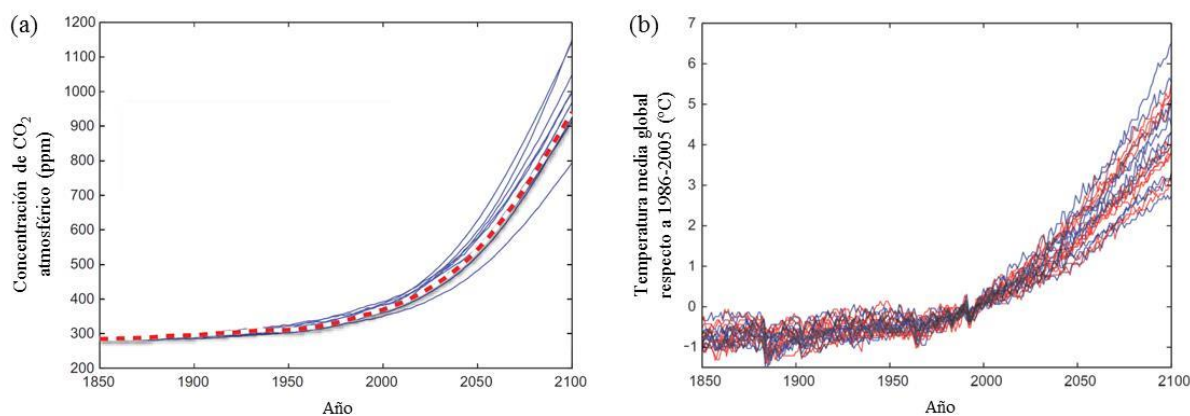


Fig. 1.1c. Aumentos en (a) la concentración atmosférica de CO_2 y (b) la temperatura media global con respecto al periodo 1986-2005 pronosticados para el escenario de emisiones más desfavorable RCP8.5 (IPCC, 2013). Se considera un incremento de las emisiones de GEI al ritmo actual por el aumento continuo de la población, sin medidas de mitigación. Para finales de siglo, la concentración de CO_2 aumentaría entre $794\text{-}1149 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y la temperatura $2,6\text{-}4,8 \text{ }^\circ\text{C}$.

El Cambio Climático no es una novedad a lo largo de la historia geológica del planeta. Se han producido con anterioridad otros cambios de notable magnitud desde la formación de la Tierra, bien por causas naturales externas (como los cambios en la constante solar o en los ciclos de los parámetros orbitales) o por causas naturales endógenas (principalmente por la actividad volcánica). Sin embargo, el calentamiento global actual del planeta no puede explicarse teniendo en consideración únicamente la variabilidad natural. De hecho, si se consideran las causas naturales junto a simulaciones de las causas antrópicas se produce un perfecto acoplamiento con el calentamiento global (IPCC, 2013).

El calentamiento, dependiendo de la zona geográfica, puede ser más severo o tenue, por lo que no es regionalmente uniforme. El IPCC (2013) señala que en la región correspondiente a Europa central y la zona mediterránea se produjo un aumento del número de días y noches cálidas, y un descenso de las frías desde 1950. Varios estudios avalan que en los últimos 40 años aumentaron la intensidad y frecuencia de las precipitaciones extremas en estas zonas, especialmente en invierno. Las predicciones auguran un calentamiento en todas las estaciones del año, que será mayor en invierno en el norte de Europa y en el verano en la zona mediterránea. Las olas de calor serán más frecuentes, intensas y duraderas en toda la región europea. Mientras que las precipitaciones mostrarán mayor variabilidad según las zonas, pudiendo aumentar la precipitación anual en el norte y centro de Europa y descender la precipitación media en verano en la zona mediterránea. La mayoría de modelos predicen que las consecuencias más severas del Cambio Climático tendrán lugar en las zonas secas y áridas de la región mediterránea (Araus & Slafer, 2011), lo cual constituirá una amenaza para la productividad y el rendimiento de los cultivos, particularmente aquellos más vulnerables a las alteraciones ambientales.

1.2. El trigo

1.2.1. Morfología y ciclo vegetativo del trigo

El trigo es una planta monocotiledónea de carácter anual, perteneciente a la tribu *Triticeae*, familia Poaceae (gramíneas) y subfamilia Pooideae. Las principales estructuras de la planta de trigo son el coleóptilo, el tallo, los tallos hijos (también llamados macollos o brotes laterales), las hojas, las espigas y las raíces (Bowden *et al.*, 2008) (Fig. 1.2.1a). El coleóptilo es una estructura especializada que permite la emergencia de la plántula. El tallo está formado por dos estructuras: los nudos, órganos en los que confluyen el resto de las partes de la planta, y los entrenudos, que constituyen las partes del tallo que se alargan durante el crecimiento. El tallo es erecto y hueco en su interior excepto en el nudo, y sirve como reserva temporal de asimilados proporcionando nutrientes a las estructuras en desarrollo, principalmente al grano. Los tallos hijos surgen de la base del tallo principal y desarrollan sus propias estructuras. Las hojas se disponen de forma alterna a lo largo del tallo y están conformadas por la vaina, que se inserta en el nudo y envuelve el entrenudo situado sobre él confiriéndole firmeza, y la lámina, que se separa del tallo. La última hoja del tallo es conocida como la hoja bandera. Las plantas de trigo poseen raíces primarias o seminales, que aparecen durante la germinación para sustentar la planta en los primeros estadios, y raíces secundarias o adventicias, que surgen durante el ahijamiento a partir de los nudos de la corona (Benlloch-Gonzalez *et al.*, 2014). Las espigas presentan un eje principal o raquis, en cuyos nudos se encuentran las estructuras florales denominadas espiguillas. Éstas contienen varias flores, cada una de las cuales está encerrada entre dos brácteas protectoras, la pálea y la lemma, que envuelven el carpelo. El óvulo fertilizado forma la unidad reproductiva, el grano, formado por el embrión, el endospermo (proporciona energía y nutrientes al embrión durante la germinación) y el salvado (cubierta exterior protectora). El embrión permitirá generar una nueva planta de trigo después de la germinación.

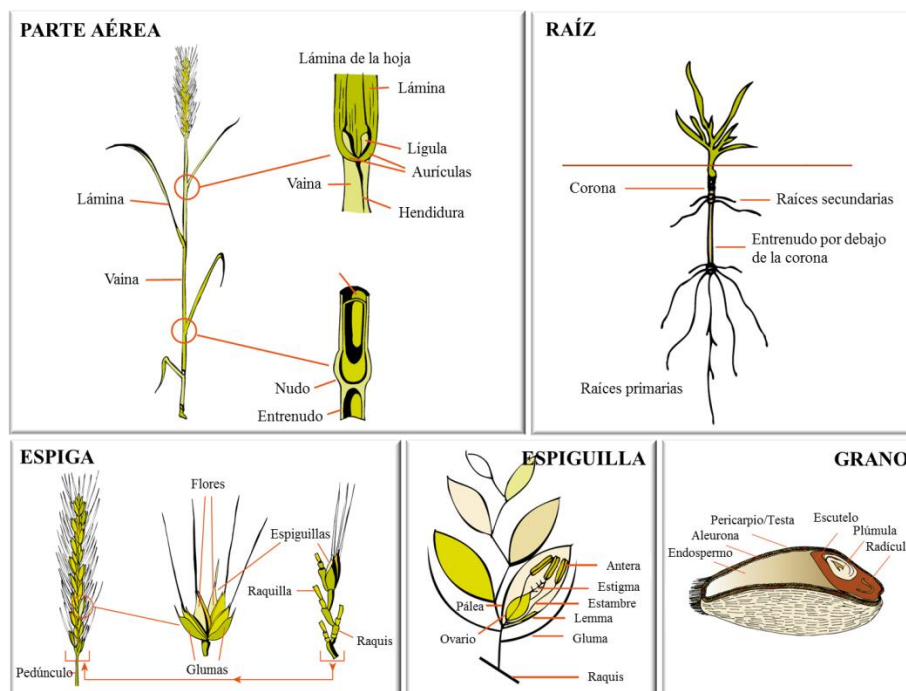


Fig. 1.2.1a. Estructura del trigo (Bowden *et al.*, 2008).

El ciclo de vida del trigo es un proceso complejo, pudiendo coexistir varios estadios de desarrollo a la vez en diferentes partes de la misma planta (Fig. 1.2.1b). Con la germinación de la semilla aparece la radícula, produciéndose posteriormente el crecimiento y desarrollo de las raíces, las hojas y los tallos, gracias a la absorción de nutrientes del suelo y la fotosíntesis (Bowden *et al.*, 2008). Esta fase de crecimiento vegetativo permite la acumulación de nutrientes, carbohidratos y proteínas, necesarios para el desarrollo posterior. La fase reproductiva comienza cuando se generan las últimas hojas y se forman y emergen las espigas, que engloban las estructuras florales del trigo (Bowden *et al.*, 2008). Finalmente, tiene lugar la etapa de desarrollo y llenado del grano, que comprende la translocación de fotoasimilados desde las partes vegetativas al grano en crecimiento, periodo que se extiende desde la floración y fertilización hasta el desarrollo y maduración del grano (Bowden *et al.*, 2008).

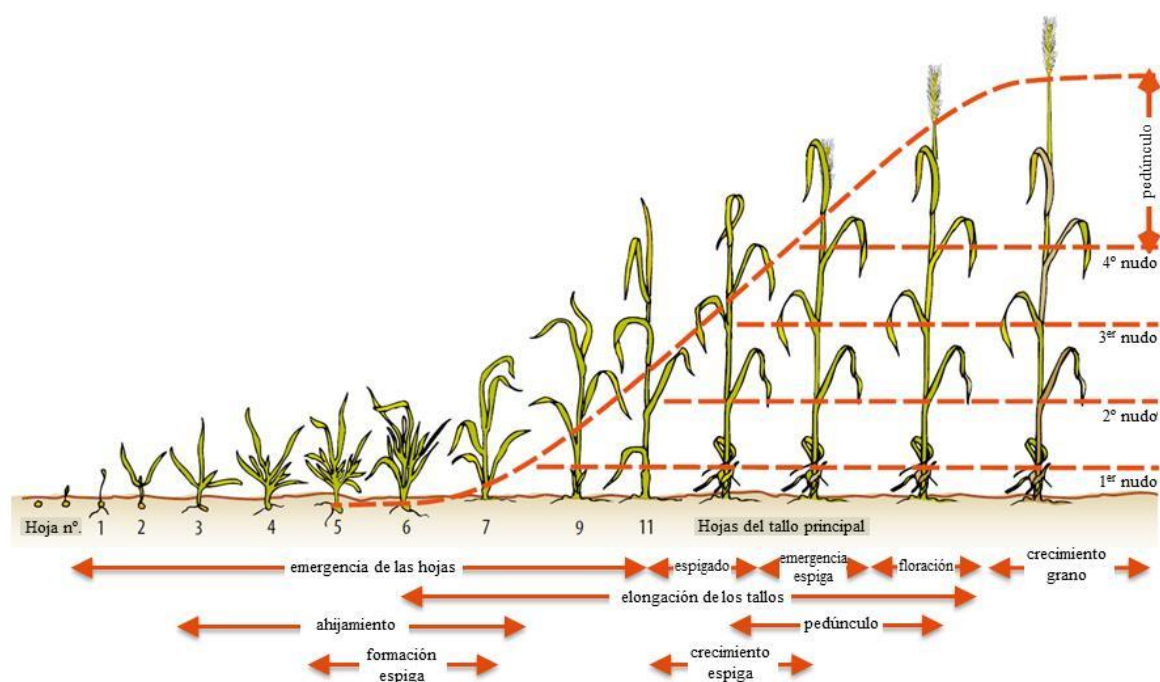


Fig. 1.2.1b. Ciclo de vida del trigo (Bowden *et al.*, 2008).

1.2.2. Domesticación del trigo

La domesticación del trigo, proceso de adaptación y especiación a manos del ser humano, junto a la de otros cultivos, permitió el sedentarismo en el Neolítico (Peleg *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011). Este proceso ha causado cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, lo que se conoce como síndrome de domesticación, y se asocian con alteraciones en un grupo de genes que difieren entre las especies domesticadas y salvajes (Peleg *et al.*, 2011). En el inicio de la agricultura hace unos 10.000-15.000 años en la zona del Creciente Fértil, los cereales suscitaron interés debido a su productividad, importancia alimenticia y facilidad de transporte y almacenaje (Feuillet *et al.*, 2008). El trigo presenta alopoliploidía, al igual que otros importantes cultivos agrícolas, como el algodón, la colza y la avena, entre otros muchos (Huang & Brûlé-Babel, 2010; Krasileva *et al.*, 2013). Las especies alopoliploides contienen dos o más juegos de cromosomas similares en el mismo núcleo por hibridación interespecífica seguida de una duplicación espontánea de cromosomas o una reducción de gametos (Feldman & Levy, 2009; Huang & Brûlé-Babel, 2010).

Las especies de trigo se clasifican en tres grupos atendiendo al número de cromosomas presentes en las células vegetativas: diploides (14 cromosomas), tetraploides (28) o hexaploides (42) (Fig. 1.2.2a). Una de las primeras especies domesticadas fue el trigo diploide, *Triticum monococcum* ($2n=2x=14$, AA), a partir de la especie salvaje *Triticum boeoticum* (Peng *et al.*, 2011). El primer evento de hibridación fue entre un trigo diploide próximo a *Triticum urartu* ($2n=2x=14$, AA) con una especie desconocida próxima a *Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$, SS) que proporcionó el genoma B hace 300.000-500.000 años (Feuillet *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2011; Pont *et al.*, 2011). El trigo tetraploide resultante, *Triticum turgidum* ($2n=4x=28$, AABB), fue domesticado y se obtuvieron variedades más productivas y mejor adaptadas a diferentes condiciones ambientales, algunas de las cuales se cultivan en nuestros días, como es el trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). Se produjo un segundo evento de hibridación hace unos 8.000 años entre el trigo tetraploide y *Aegilops tauschii* ($2n=2x=14$, DD), especie salvaje con el genoma D (Spannagl *et al.*, 2013). Esto permitió la obtención de una progenie fértil de trigo hexaploide o panadero, *Triticum aestivum* ($2n=6x=42$, AABBDD) (Feuillet *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011). Marcussen *et al.* (2014) propusieron que el genoma D se originó a partir de los genomas A y B por especiación híbrida homoploide hace unos 5,5 millones de años.

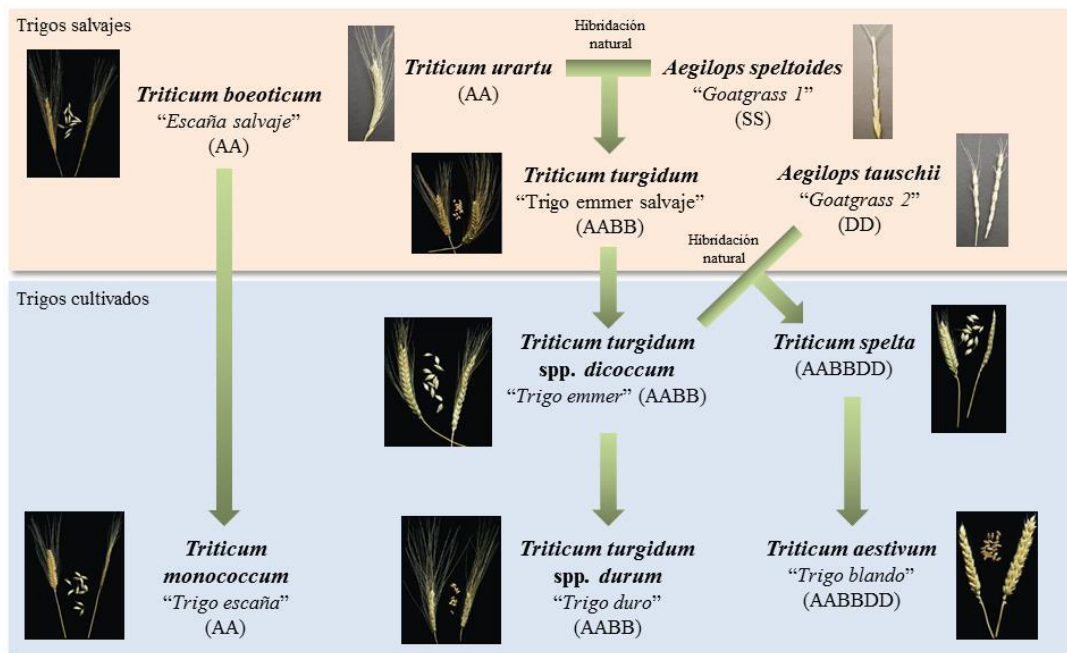


Fig. 1.2.2a. Eventos de hibridación durante la evolución del trigo (Feuillet *et al.*, 2008; Feldman & Levy, 2009; Peng *et al.*, 2011; Eversole *et al.*, 2014).

1.2.3. Cultivo del trigo

El trigo es uno de los cultivos más importantes a escala global en términos de área cultivada y cantidad destinada para la alimentación humana y animal. Es un alimento básico indispensable en la dieta del 30% de la población mundial (IWGSC, 2014), que proporciona hasta el 20% de las proteínas y calorías consumidas, además de aportar vitaminas y minerales (Brenchley *et al.*, 2012; FAOSTAT, 2014, <http://faostat.fao.org>). Desde un punto de vista agrícola y comercial, son importantes el trigo hexaploide o panadero, utilizado principalmente para la producción de pan, y el trigo tetraploide o duro, que con un mayor contenido en gluten es utilizado para la fabricación de pasta, bulgur o cuscús. El genoma D confiere mejores características al endospermo del trigo hexaploide para la producción

de pan y una mejor adaptación geográfica (Feuillet *et al.*, 2008). El trigo diploide (*Triticum monococcum*) tiene un menor interés y se trata más bien de una especie salvaje utilizada para alimentación animal (Peng *et al.*, 2011). En la actualidad, algunos híbridos entre trigo y otros cereales han despertado cierto interés comercial, como *Triticale* (*Triticum aestivum* × *Secale cereale*) o *Tritordeum* (*Triticum turgidum* conv. *durum* × *Hordeum chilense*). El cultivo de trigo predomina en zonas templadas y subtropicales de ambos hemisferios (Peng *et al.*, 2011). Con una extensión de 218 millones de Ha de superficie cultivada y una producción de 713 millones de toneladas de grano, el trigo ocupa el cuarto lugar de los cultivos alimentarios, sólo por detrás de la caña de azúcar, el maíz y el arroz (FAOSTAT, 2014). La producción de trigo duro se estima en 30 millones de toneladas de grano en 16 millones de Ha, lo que representa el 5-8% del total de la producción de trigo (Peng *et al.*, 2011; Lidon *et al.*, 2014). El 60% de su producción se concentra en la región mediterránea por su mejor adaptación a climas con temperaturas cálidas y escasas precipitaciones, en concreto en Italia, España, Francia y Grecia (Lidon *et al.*, 2014).

1.2.4. Secuenciación del genoma de trigo

El genoma del trigo tetraploide y hexaploide es uno de los más grandes en especies cultivables (Fig. 1.2.4a), con un tamaño haploide de 12,66 Gb (billones de bases) y 17,33 Gb, respectivamente (Bennett & Leitch, 2012). Es mucho mayor que el de otras especies vegetales próximas y contiene secuencias de ADN altamente repetidas (80%) (Gao *et al.*, 2010; Brenchley *et al.*, 2012; Eversole *et al.*, 2014). La similitud entre las secuencias homólogas de los genomas A, B y D se estima en un 97% (Dvorak *et al.*, 2006; Krasileva *et al.*, 2013). La mayor parte de los genes de una sola copia presentes en gramíneas diploides presentan tres copias en el trigo blando (Sharma *et al.*, 2010) o dos copias en el trigo duro (Shaw *et al.*, 2009) de acuerdo con sus genomas. En general, las especies poliploides muestran una mejor y más rápida adaptación a distintas condiciones ambientales, lo que supone una mejora en las características fisiológicas y morfológicas con respecto a los progenitores diploides (Pont *et al.*, 2011).

El enorme tamaño del genoma del trigo, su poliploidía, la alta tasa de repetición de secuencias y la compleja estructura de los elementos transponibles han dificultado su proceso de secuenciación (Spannagl *et al.*, 2013). El Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma del Trigo (IWGSC), está llevando a cabo la secuenciación y anotación del genoma del trigo hexaploide (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) desde 2005. Esto ha requerido la adopción de una estrategia basada en el mapeo físico y la secuenciación individual de cada cromosoma (Eversole *et al.*, 2014), y ha permitido la publicación de un borrador del genoma del trigo con 124.201 *loci* en julio de 2014 (IWGSC, 2014). La erosión de la diversidad genética durante la domesticación ha conducido a una pérdida de genes, que se estima en unos 10.000-16.000 con respecto a los progenitores (Brenchley *et al.*, 2012), mientras que otros se han adquirido o duplicado (IWGSC, 2014). A pesar de que se requerirá más tiempo para conocer la posición y distribución de los genes y su anotación funcional, existen distintos recursos y herramientas disponibles para la comunidad científica interesada en trigo. Así, en la base de datos dbEST (Boguski *et al.*, 1993) del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) existen 1,3 millones de marcadores de secuencias expresadas (EST, “Expressed Sequence Tag”) y más de 40.000 unigenes para trigo blando a fecha de enero de 2015, junto a un microarray (55 k Affymetrix GeneChip[®]) que contiene 61.127 pruebas (“probe sets”) para 55.052 transcritos. No obstante, en trigo duro sólo existen 19.687 ESTs en el NCBI, y 7.803 transcritos en la base de datos “TIGR Plant Transcript Assemblies” (Childs *et al.*, 2007).

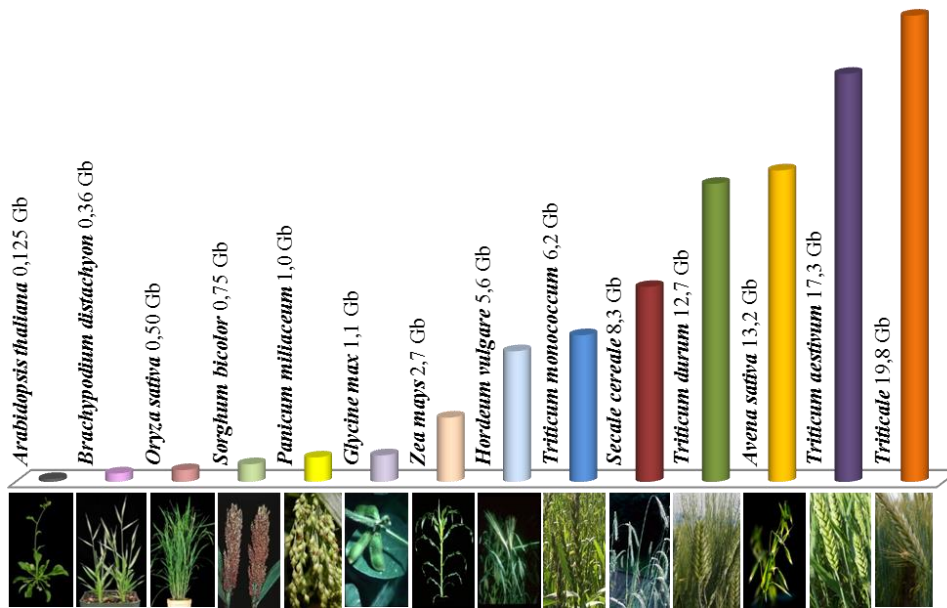


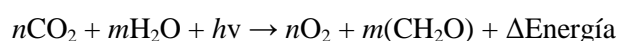
Fig. 1.2.4a. Tamaño del genoma de los principales cultivos agrícolas para la producción de grano. El tamaño de los genomas se obtuvo de la base de datos del Royal Botanic Gardens (Bennett & Leitch, 2012). Se incluye la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

La secuenciación de nueva generación (NGS), bien por técnicas de Illumina (Solexa) o pirosecuenciación 454 (Roche), ha permitido un rápido incremento del número de secuencias disponibles gracias al desarrollo de algoritmos para el ensamblaje *de novo* de secuencias. A su vez, la identificación de genes ortólogos, es decir, genes en diferentes especies que se originaron a partir de un gen de un ancestro común y que frecuentemente conservan la misma función biológica (Remm *et al.*, 2001), constituye una herramienta útil para cubrir las funciones del metabolismo aún desconocidas en trigo. A ello ha contribuido el estudio del genoma de los progenitores del trigo (Spannagl *et al.*, 2013; IWGSC, 2014) y la secuenciación de los genomas de otras gramíneas, como arroz, cebada o *Brachypodium distachyon*, que poseen una elevada sintenia y un alto grado de conservación del contenido y organización de sus genes (Brenchley *et al.*, 2012). La obtención de un genoma de referencia para el trigo ayudaría a profundizar en el conocimiento de los mecanismos de respuesta de esta especie vegetal al ambiente, además de facilitar la mejora genética y el desarrollo de nuevas variedades de trigo necesarias para satisfacer la demanda futura de alimentos (IWGSC, 2014).

1.3. Fijación de carbono

1.3.1. Fotosíntesis: características generales

La vida en la Tierra depende de la habilidad de los organismos fotosintéticos para capturar el CO_2 inorgánico de la atmósfera y transformarlo en C orgánico de la biosfera por medio de la fotosíntesis, único proceso biológico capaz de utilizar y transformar la energía lumínica procedente del Sol en energía química fundamental para la vida. La fotosíntesis oxigénica, presente en plantas superiores, es un proceso de oxidorreducción en el que el agua se oxida y el CO_2 se reduce, produciéndose la liberación de O_2 y el almacenamiento del poder reductor resultante en numerosos compuestos carbonados que constituyen la materia orgánica.



La comunicación del ambiente gaseoso del interior de la planta con el del exterior tiene lugar a través de los estomas, que son orificios que atraviesan la epidermis de las plantas y facilitan el intercambio gaseoso (Fig. 1.3.1a). Están formados por dos grandes células conocidas como células oclusivas o guarda dispuestas frente a frente, bajo las cuales se encuentra una cavidad denominada cámara subestomática, rodeada de células acompañantes. Cuando las células oclusivas se separan dejan un hueco llamado ostiolo que comunica los espacios aéreos del mesófilo con la atmósfera externa (Fig. 1.3.1a). La turgencia de las células oclusivas controla el grado de apertura y cierre de los estomas por un mecanismo complejo en respuesta a distintos factores (Negi *et al.*, 2014). El grado de apertura de los estomas modula la pérdida de agua por transpiración y la entrada del CO_2 atmosférico para la fotosíntesis, que tendrá que atravesar una serie de barreras que oponen resistencia (Flexas *et al.*, 2008) hasta llegar al cloroplasto, donde tiene lugar la fotosíntesis.

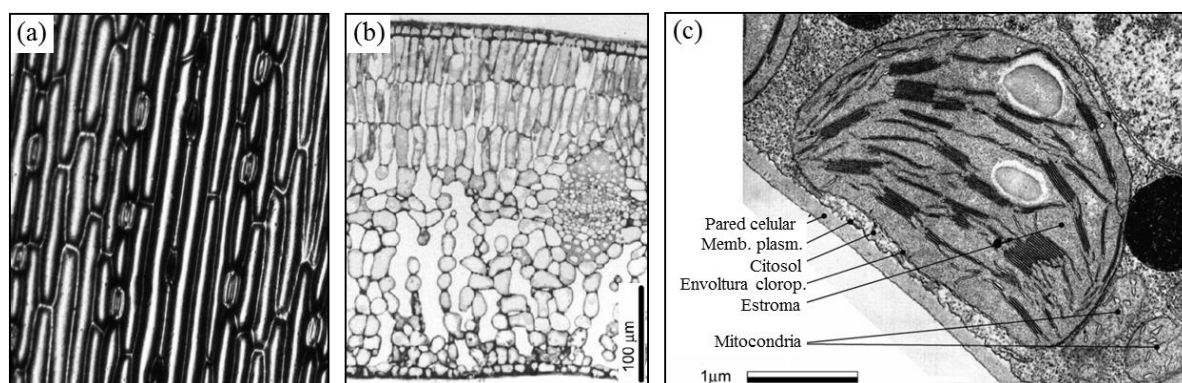


Fig. 1.3.1a. (a) Células y estomas de la epidermis de una hoja de cebada (imagen cedida por el Dr. Rafael Martínez-Carrasco); (b) Corte transversal de la hoja de una planta C_3 (*Camellia japonica*), en el que se observa el mesófilo en empalizada en la parte superior y el mesófilo lagunar en la inferior; y (c) micrografía electrónica de un cloroplasto (Evans *et al.*, 2009).

1.3.2. Absorción de la luz

Las plantas absorben la energía lumínica de la luz solar y la convierten a través de la cadena de transporte electrónico fotosintético (CTEF) en moléculas energéticas –ATP, ferredoxina reducida

(Fd_{red}) y NADPH⁻, que pueden ser utilizadas en distintos procesos metabólicos (Foyer *et al.*, 2012). La absorción de fotones en distintas zonas del espectro visible y la transferencia de energía a otras moléculas se lleva a cabo gracias a los pigmentos fotosintéticos –las clorofilas y los carotenoides–, que se localizan en los tilacoides formando complejos con proteínas específicas. Las clorofilas son compuestos de tipo tetrapirrol, en las que se diferencia un anillo de porfirina que contiene Mg, cuya función es absorber la luz, junto a una cadena hidrófoba de fitol, que facilita la integración en la membrana plasmática (Tanaka & Tanaka, 2007). En plantas superiores, se distinguen dos tipos de clorofilas, la clorofila a (chl a) que presenta un grupo metilo, y la clorofila b (chl b) con un grupo formilo (Tanaka & Tanaka, 2007), características que confieren cambios en el espectro de absorción de la molécula. Los carotenoides son compuestos isoprenicos entre los que se distinguen los carotenos y, si contienen átomos de oxígeno, las xantofilas (Barceló *et al.*, 2005). La clorofila a presenta máximos de absorción a 663 y 420 nm, la clorofila b a 644 y 430 nm y los carotenoides entre 450-490 nm. La absorción de fotones induce la excitación de electrones del sistema de dobles enlaces conjugados de los pigmentos a un nivel de energía superior (Foyer *et al.*, 2012). El regreso al estado fundamental del electrón excitado conlleva la liberación de energía de excitación, que es transferida de los carotenoides y la chl b a la chl a, y de ésta a los componentes de la CTEF (Taiz & Zeiger, 2010; Foyer *et al.*, 2012).

La síntesis de clorofilas tiene lugar en el cloroplasto, compartiendo las reacciones iniciales en dicha ruta con la síntesis de otros tetrapirroles, que incluyen sirohemos, hemos y fitocromobilinas (Papenbrock & Grimm, 2001; Rüdiger & Grimm, 2006; Tanaka & Tanaka, 2007) (Fig. 1.3.2a). Éstos son esenciales en las principales rutas de conversión de energía, respiración y fotosíntesis, actuando como cofactores o cromóforos (Papenbrock & Grimm, 2001; Tanaka & Tanaka, 2007). El proceso se inicia a partir del glutamato (Glu) (Forde & Lea, 2007), que en tres reacciones consecutivas es transformado en ácido 5-aminolevulínico (ALA), primer precursor específico de la biosíntesis de tetrapirroles (Rüdiger & Grimm, 2006). Dicho ácido se transforma después de tres conversiones catalizadas por otras tantas enzimas en uroporfirinógeno III (Fig. 1.3.2a). Este primer tetrapirrol cíclico puede bien ser utilizado en la biosíntesis del grupo sirohemo (Tanaka & Tanaka, 2007), cofactor presente en la nitrito reductasa, o bien ser transformado a protoporfirina IX. En este punto, la ruta se ramifica hacia la síntesis de grupos hemo con la quelación de Fe en el macrociclo tetrapirrónico, o bien continúa hacia la síntesis de clorofilas con la quelación de Mg. En esta última ruta biosintética, el complejo enzimático de la magnesio quelatasa (MgCh, EC 6.6.1.1) cataliza la inserción dependiente de ATP de un ión Mg²⁺ en el anillo tetrapirrónico de la protoporfirina IX generando Mg-protoporfirina IX, la cual puede continuar transformándose hasta producir chl a (Papenbrock & Grimm, 2001). La interconversión de la chl a en chl b comporta una serie de transformaciones adicionales que conforman el ciclo de las clorofilas (Rüdiger & Grimm, 2006; Tanaka & Tanaka, 2007) (Fig. 1.3.2a).

El paso limitante de la síntesis de tetrapirroles y clorofilas es el catalizado por la glutamil-tRNA reductasa (GluTR, EC 1.2.1.70), que reduce el grupo carboxilo activado de la glutamil-tRNA a un grupo formilo para producir glutamato semialdehído (Papenbrock & Grimm, 2001; Tanaka & Tanaka, 2007). La GluTR es codificada por una pequeña familia de genes conocidos como *HemA*. El principal factor ambiental que modula la expresión de los genes que codifican los enzimas de la biosíntesis de tetrapirroles es la luz (Papenbrock & Grimm, 2001). Así, se ha mostrado que la expresión del gen *HemA1* se encuentra sujeta a un control circadiano, con cambios diurnos que revelan un máximo en la expresión del gen en las tres primeras horas de iluminación seguidos de un descenso posterior (Rüdiger & Grimm, 2006). La expresión de los genes *HemA* en plantas de pepino, cebada y *Arabidopsis* se expresan también diferencialmente por las citoquininas (CKs) y la temperatura

(Papenbrock & Grimm, 2001). Sin embargo, la actividad GluTR parece ser modulada por retroalimentación negativa de los productos finales más que por una regulación transcripcional, que suele ser más lenta (Tanaka & Tanaka, 2007). La actividad de cada ramificación de la ruta de tetrapirroles está regulada por la demanda de sus productos (Rüdiger & Grimm, 2006). La ramificación a nivel de la protoporfirina IX constituye otro punto importante de regulación a nivel transcripcional (Papenbrock & Grimm, 2001) (Fig. 1.3.2b). Además, las plantas superiores ejercen un control riguroso en el mantenimiento de las proporciones de chl a y b a nivel foliar a través del ciclo de las clorofilas, dado que se necesitan en una relación estequiométrica fija (aprox. 3:1) para la correcta transferencia de energía (Tanaka & Tanaka, 2007).

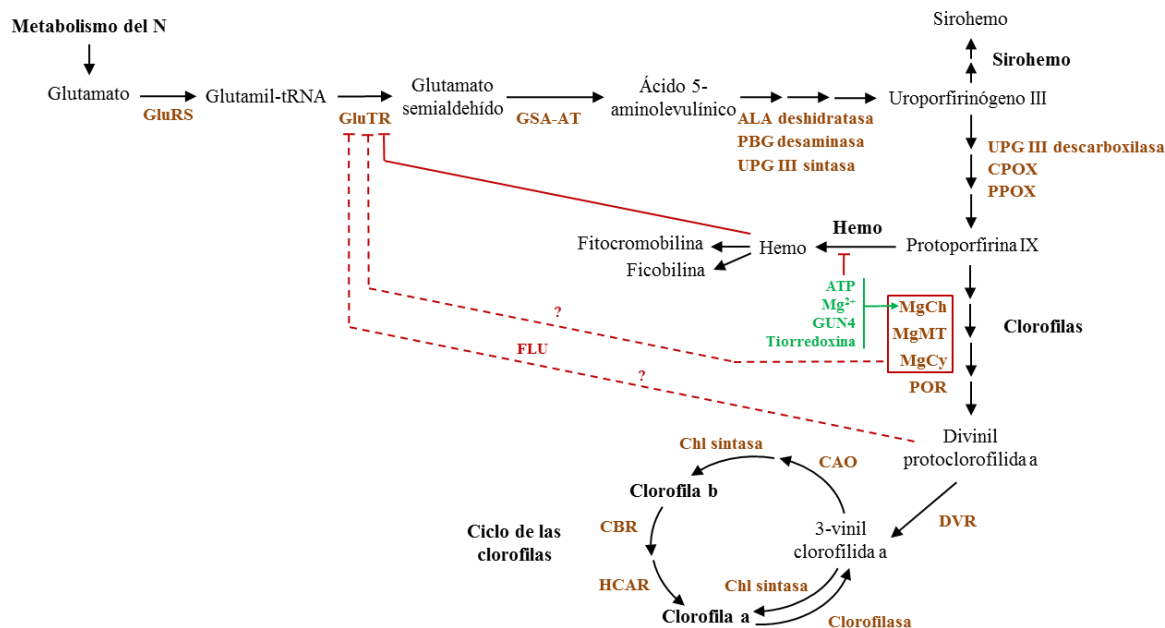
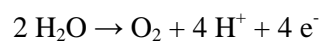


Fig. 1.3.2a. Biosíntesis y regulación de tetrapirroles en plantas superiores. Esquema basado en Papenbrock & Grimm (2001), Rüdiger & Grimm (2006) y Tanaka & Tanaka (2007). GluRS, glutamilo-tRNA sintetasa; GluTR, glutamilo-tRNA reductasa; GSA-AT, glutamato-1-semialdehído aminotransferasa; ALA deshidratasa, ácido 5-aminolevulínico deshidratasa; PBG, porfobilinógeno desaminasa; UPG III sintasa, uroporfirinógeno III sintasa; UPG III descarboxilasa, uroporfirinógeno III descarboxilasa; CPOX, coproporfirinógeno III oxidasa; PPOX, protoporfirinógeno IX oxidasa; MgCh, magnesio quelatasa; MgMT, magnesio protoporfirina IX metiltransferasa; MgCy, magnesio protoporfirina IX monometil éster ciclasa; DVR, divinilclorofilida reductasa; POR, protoclorofilida oxidorreductasa; Chl sintasa, clorofila sintasa; CAO, clorofilida a oxigenasa; CBR, clorofila b reductasa; HCAR, 7-hidroxi metil clorofila a reductasa; GUN4, proteína de unión a porfirinas; FLU, regulador negativo de la biosíntesis de clorofilas. Las líneas verdes indican regulación positiva y las rojas negativa.

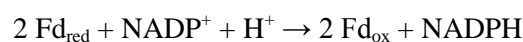
1.3.3. Transporte electrónico fotosintético y fotofosforilación

El aparato fotosintético está constituido por cuatro complejos proteicos integrados en la membrana tilacoidal y por varias moléculas conectoras de naturaleza lipídica y proteica (Fig. 1.3.3a). Estos componentes permiten la absorción de la energía lumínica y la transformación del flujo de fotones en uno de electrones, cuya transferencia a través de la CTEF está acoplada a la generación de energía química en forma de ATP y poder reductor (Baker *et al.*, 2007). Los fotosistemas son complejos proteicos capaces de absorber y transformar la energía fotónica en química. Las plantas superiores poseen dos fotosistemas (PS, “photosystem I”), PSI y PSII (Fig. 1.3.3a). En ellos, se diferencian (i) los complejos cosechadores de la luz (LHC, “light-harvesting complex”), LHCI y LHCII asociados al PSI y PSII, respectivamente, también denominados complejos antena que están formados por pigmentos unidos a proteínas, y (ii) los centros de reacción (Barceló *et al.*, 2005; Taiz & Zeiger, 2010).

Los componentes del centro de reacción del PSI (PsaC, PsaN, etc.) se organizan entorno a las proteínas PsaA y PsaB a las que se asocia una forma especial de chl a (P700, que absorbe a una longitud de onda máxima de 700 nm), junto a más de 40 moléculas de chl a y varias de β -caroteno (Barceló *et al.*, 2005; Taiz & Zeiger, 2010). El centro de reacción del PSII contiene las proteínas D1 y D2 junto a la CP43, CP47, citocromo b_{559} y c_{550} y PsbO, entre otras, y una forma especial de chl a (P680, que absorbe a una longitud de onda máxima de 680 nm) asociada a más de 40 clorofilas enlazadas a la proteína D1, que actúan de donadores de electrones (Barceló *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2010; Taiz & Zeiger, 2010). La formación de ATP acoplada a la reducción de NADP^+ se denomina fotofosforilación no cíclica (Fig. 1.3.3a). La energía de excitación que llega al centro de reacción del PSII se transforma en energía electroquímica redox y se produce la liberación de un electrón. En el PSII tiene lugar la oxidación del agua en el complejo productor de O_2 (OEC, “Oxygen-Evolving Complex”) en presencia de Mn, que facilita la liberación de O_2 , protones (H^+) y electrones en el lumen tilacoidal (Baker *et al.*, 2007; Rochaix, 2011).

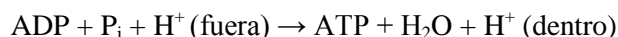


La CTEF lineal (esquema en Z), se inicia con la transferencia de los electrones provenientes de la fotólisis del agua mediante un transportador Y_z al P680 y, posteriormente, a la feofitina (Feo; chl en la que el Mg central ha sido reemplazado por dos H) y al complejo formado por las plastoquinonas Q_A y Q_B (Baker *et al.*, 2007; Taiz & Zeiger, 2010; Rochaix, 2011) (Fig. 1.3.3a). La translocación de dos electrones a la Q_B la reduce a PQ_B^{2-} , que al tomar dos H^+ del estroma genera la PQH_2 (Baker *et al.*, 2007). Esta plastohidroquinona, transportador móvil de la bicapa lipídica, se disocia del centro de reacción para salir del PSII y oxidarse en el complejo citocromo b_6f (Cytb $_{6f}$, EC 1.10.9.1), donde cede sus electrones (Baker *et al.*, 2007; Rochaix, 2011). El Cytb $_{6f}$ es un complejo proteico constituido por cuatro subunidades grandes (citocromos f y b_6 , la proteína ferrosulfurada Rieske y una proteína de 17 kDa), cuatro pequeñas (PetG, PetL, PetM y PetN) y ciertos cofactores, que incluyen grupos hemo, clorofilas y carotenoides (Smith *et al.*, 2004; Taiz & Zeiger, 2010). La oxidación de la PQH_2 en el sitio Q_0 vía el ciclo Q libera dos H^+ al lumen y dos electrones. Uno de ellos se acumula y, cuando hay dos, siguen un proceso cíclico que pasa por el cyt_L y cyt_H dentro del complejo Cytb $_{6f}$ hasta la reducción de la PQ a PQH_2 en el sitio Q_1 (Baker *et al.*, 2007; Rochaix, 2011). Mientras, el otro electrón continúa por la proteína Rieske y el citocromo f hasta la plastocianina (PC), transportador móvil del lumen (Baker *et al.*, 2007; Rochaix, 2011). Los electrones pasan de la PC al P700 del PSI, y se reduce, transfiriéndose a continuación entre los aceptores de electrones del PSI, que incluyen un par de moléculas de chl (A_0), una filoquinona o vitamina K_1 (A_1) y una serie de proteínas que contienen Fe y S (F_X , F_A y F_B) (Baker *et al.*, 2007; Taiz & Zeiger, 2010). Los electrones terminan por llegar a la ferredoxina (Fd), proteína móvil localizada en el estroma, que se reduce (Fd_{red}) y puede ser utilizada en procesos metabólicos como la asimilación de N y S y en la regulación de enzimas de la fijación de C por el sistema formado por la Fd y las tiorredoxinas (Trx) (Taiz & Zeiger, 2010; Rochaix, 2011). A su vez, puede también participar en la transferencia de electrones a otros aceptores, como el NADP, en la reacción catalizada por la Fd-NADP reductasa (FNR, EC 1.18.1.2) (Baker *et al.*, 2007).



La FNR se encuentra presente en las mitocondrias y los plastos de plantas superiores y cataliza la transferencia reversible de electrones entre la Fd o flavodoxina y el NAD(P)H (Moolna & Bowsher, 2010; Mulo, 2011). El poder reductor generado es utilizado en la fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin-Benson, en la síntesis de aminoácidos, lípidos y clorofilas y en la reducción de componentes del

estroma (Moolna & Bowsher, 2010; Mulo, 2011). La FNR cloroplástica es codificada por una pequeña familia de genes del núcleo y puede encontrarse tanto en la membrana tilacoidal como en forma soluble en el estroma, siendo esta última la menos activa (Mulo, 2011). Asociado a la CTEF lineal se encuentra la formación de ATP o fotofosforilación no cíclica, que permite que la energía lumínica sea almacenada como energía química en los enlaces fosfato-energéticos de la molécula de ATP (Rochaix, 2011):



Este proceso es catalizado por la ATP sintasa (ATPasa cloroplástica/mitocondrial, EC 3.6.3.14). se trata de un complejo enzimático que consta de una parte hidrofóbica unida a la membrana que permite la translocación de protones (CF₀: subunidades a, b y c), y de otra parte inmersa en el estroma que facilita la síntesis de ATP (CF₁: subunidades α, β, γ, δ y ε) (Taiz & Zeiger, 2010). Durante la CTEF lineal, el aumento de la [H⁺] en el lumen produce su acidificación y la alcalinización del estroma, lo cual crea un gradiente de potencial electroquímico a lo largo de la membrana tilacoidal que es utilizado por la ATPasa como fuente de energía para generar ATP (Baker *et al.*, 2007; Taiz & Zeiger, 2010; Foyer *et al.*, 2012). En la mitocondria, el gradiente de protones se genera en la cadena respiratoria. La ATPasa vacuolar tiene una estructura similar pero su actividad se relaciona más con el bombeo de protones que con la síntesis de ATP.

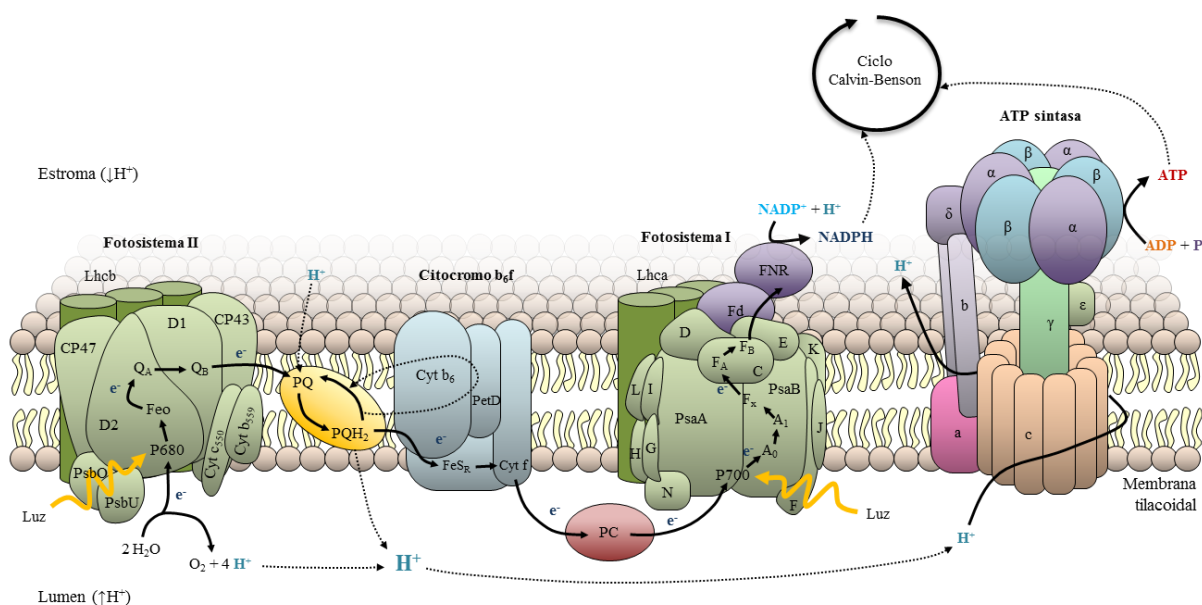


Fig. 1.3.3a. Transporte electrónico fotosintético lineal y fotofosforilación en los tilacoides de plantas superiores. Esquema basado en Baker *et al.* (2007), Taiz & Zeiger (2010), Rochaix (2011) y Foyer *et al.* (2012). En la absorción de la luz y la generación final de NADPH y ATP (además de Fd_{red}) participan cuatro complejos integrados en la membrana tilacoidal: el fotosistema I, el fotosistema II, el citocromo b₆f y la ATPasa, junto a una serie de moléculas de naturaleza lipídica (plastoquinonas) y proteica (PC, Fd y FNR) que actúan de conectores de dichos complejos.

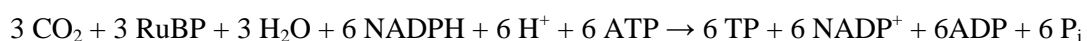
Además de la CTEF lineal, existe un flujo cíclico de electrones que permite utilizar la energía lumínica para producir ATP sin generar poder reductor como NADPH o Fd_{red} (Ifuku *et al.*, 2011; Foyer *et al.*, 2012), que representa menos de un 10% del transporte electrónico fotosintético lineal en plantas C₃ (Foyer *et al.*, 2012). El flujo cíclico de electrones tiene lugar entre los componentes del PSI, cuando la Fd en lugar de transferir electrones al NADPH, lo hace hacia el complejo b₆f, con el

consiguiente bombeo de H^+ al lumen y la reducción de la PC, que al ser oxidada por el PSI cierra el ciclo (Fig. 1.3.3a). Esta fotofosforilación cíclica del ATP es menos eficiente energéticamente que la obtenida con el flujo lineal (Baker *et al.*, 2007; Ifuku *et al.*, 2011; Rochaix, 2011; Foyer *et al.*, 2012), ya que una parte importante de la energía puede ser disipada en forma de fluorescencia o como energía térmica. Estos flujos cíclicos se consideran que contribuyen a la disipación de la energía (Rochaix, 2011) y en ocasiones pueden no ser suficientes para eliminar la elevada energía de excitación, dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el oxígeno singlete (1O_2), el ión superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Foyer *et al.*, 2012).

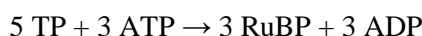
Se han descrito diferentes mecanismos de regulación que permiten coordinar la generación de ATP, Fd_{red} y NADPH en el aparato fotosintético con la demanda requerida por la planta, además de mantener un balance óptimo entre la síntesis de ATP y poder reductor (Foyer *et al.*, 2012). Éstos previenen que se lleguen a alcanzar aumentos de las razones ATP:ADP y NAD(P)H:NAD(P) que desactiven los componentes de la CTEF y/o disipen el exceso de energía en forma de calor (Foyer *et al.*, 2012). Así, ciertos componentes de la CTEF están sometidos a procesos de fosforilación/desfosforilación mediados por la luz que permiten equilibrar la excitación diferencial entre el PSI y el PSII (Rochaix, 2011). La expresión génica en los cloroplastos y el núcleo es controlada por una cascada de señalización retrógrada del cloroplasto al núcleo mediada por quinasas (Foyer *et al.*, 2012). La luz es el principal factor que regula la expresión de genes fotosintéticos que están sujetos a un control circadiano mediado por fotorreceptores (Rochaix, 2011; Foyer *et al.*, 2012), cambios diurnos que muestran una mayor abundancia de transcritos de proteínas fotosintéticas al final de la noche y comienzo del periodo luminoso y descenso a medida que avanza el fotoperiodo (Bläsing *et al.*, 2005). Se han mostrado evidencias de que la expresión de genes *CAB* (*LHCP*), que codifican las proteínas cosechadoras de luz del PSII asociadas a clorofilas, está modulada por ciertos factores de transcripción, como se ha comprobado con *CCA1* y *LHY* en *Arabidopsis* (Churin *et al.*, 2003). La *FNR* no está sujeta a una regulación circadiana, aunque la luz y el nitrato (NO_3^-) inducen su expresión, excepto para las isoformas más ácidas, y se ha comprobado *in vitro* que la *HSP70* y *cpn60* participan en su plegamiento (Moolna & Bowsher, 2010; Mulo, 2011). La transferencia de electrones desde la plastoquinona PQ/PQH_2 al $Cytb_6/f$ se considera el paso limitante de la CTEF lineal (Rochaix, 2011). La plastoquinona actúa como un centro integrador de regulación redox que controla tanto la eficiencia de la CTEF, como la expresión de genes nucleares por señalización retrógrada y la fosforilación de ciertas proteínas fotosintéticas (Rochaix, 2011; Foyer *et al.*, 2012).

1.3.4. Ciclo de Calvin-Benson

El ciclo de Calvin-Benson o ciclo reductivo de las pentosas fosfato tiene lugar en el estroma del cloroplasto y comprende 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas, que utilizan el ATP y el NADPH generados a partir de la luz solar (Taiz & Zeiger, 2010; Uematsu *et al.*, 2012) (Fig. 1.3.4a). En el ciclo se distinguen tres procesos: (i) la fijación de CO_2 sobre la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) para generar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA); (ii) la reducción del 3PGA a triosas fosfato (TP) en dos transformaciones consecutivas que consumen ATP y NADPH, respectivamente:



y (iii) la regeneración del aceptor del CO_2 , la RuBP, a través de diez reacciones enzimáticas, una de las cuales requiere ATP (Taiz & Zeiger, 2010). De cada seis TP generadas, cinco se utilizan en la regeneración de la RuBP:



La TP restante es utilizada en la síntesis de productos finales, sacarosa y almidón, a través de rutas gluconeogénicas diferentes que tienen lugar en el citosol y el cloroplasto, respectivamente, a la vez que sirven como fuente de C en otros procesos metabólicos y para la síntesis de otros componentes celulares (Uematsu *et al.*, 2012). En conjunto, por cada tres moléculas de CO_2 fijadas para dar una TP se utilizan nueve moléculas de ATP y seis NADPH, por lo que la fijación de una molécula de CO_2 requiere el consumo de tres ATP y dos NADPH.

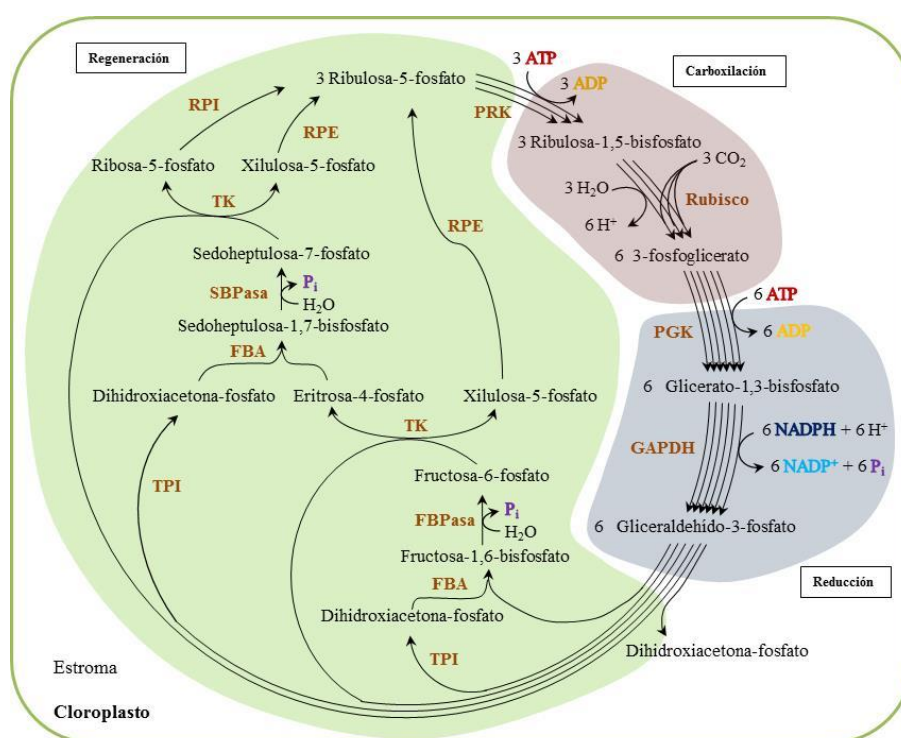


Fig. 1.3.4a. Ciclo de Calvin-Benson. Esquema basado en Raines *et al.* (1999), Martin *et al.* (2000) y Taiz & Zeiger (2010). El ciclo de Calvin-Benson comienza con la fijación de CO_2 atmosférico sobre la RuBP, reacción catalizada por la Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), y continúa con la fase de reducción y de regeneración del aceptor del CO_2 , la RuBP. Reacciones catalizadas por: PGK, 3-fosfoglicerato quinasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; TPI, triosa fosfato isomerasa; FBA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; FBPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; TK, transquetolasa; SBPasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa; RPE, ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; RPI, ribosa-5-fosfato isomerasa; PRK, fosforribulosa quinasa.

El enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39) es probablemente la proteína más abundante del planeta (Ellis, 1979; Portis & Parry, 2007), que cataliza la carboxilación de la RuBP, el primer paso del ciclo de Calvin-Benson. Puede también catalizar la oxigenación de la RuBP para producir una molécula de 3PGA y otra de 2-fosfoglicolato en la fotorrespiración (Suzuki & Makino, 2013) (Fig. 1.3.4b). Ambas reacciones tienen lugar simultáneamente, y tanto el CO_2 como el O_2 compiten por el mismo centro activo de la proteína (Suzuki & Makino, 2013). La actividad carboxilasa de la Rubisco puede verse comprometida por: (i) la actividad oxigenasa en el proceso competidor con la fotosíntesis, (ii) una baja afinidad por el CO_2 , ya que la carboxilación y oxigenación

de la RuBP depende de la razón entre la presión parcial de CO₂ y O₂ (Makino & Mae, 1999), y (iii) una lenta velocidad catalítica, de unos 3,5 s⁻¹ (Douce & Neuburger, 1999). Para compensar esa baja actividad catalítica y mantener la actividad fotosintética, se necesitan grandes cantidades del enzima, llegando a representar hasta el 50% de la proteína soluble en plantas C₃ y el 20% en plantas C₄ (Ellis, 1979; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Se estima que la Rubisco contiene el 15-35% de todo el N foliar en las plantas C₃ y constituye una reserva de N en la planta (Evans, 1983; Suzuki *et al.*, 2009).

En la naturaleza se distinguen cuatro formas de Rubisco, siendo la forma I la que está presente en plantas, algas, cianobacterias y proteobacterias autótrofas (Portis & Parry, 2007) (Fig. 1.3.4b). Se trata de un holoenzima hexadecamérico localizado en el estroma del cloroplasto, constituido por ocho subunidades grandes (LSU, 50-55 kDa) y otras ocho pequeñas (SSU, 12-18 kDa) (Andersson & Backlund, 2008). El enzima tiene como unidad estructural y catalítica el dímero L₂ (dos LSU), donde se localiza el centro activo, no siendo esencial para la catálisis la SSU (Andersson, 2008). La LSU es codificada por un único gen en el cloroplasto (*rbcL*) y sintetizada en los ribosomas 70S del mismo, mientras que la SSU es codificada por una familia de genes del núcleo (*RBCS*) y sintetizada en los ribosomas 80S del citoplasma, en forma de precursor de alto peso molecular (Gutteridge & Gatenby, 1995; Spreitzer & Salvucci, 2002; Andersson, 2008; Suzuki & Makino, 2013). De los genes *rbcS* no existen evidencias de que puedan poseer diferentes funciones (Sasanuma, 2001). Si bien, se ha propuesto que la SSU puede influir en el balance síntesis-degradación de la proteína y en la discriminación por los substratos CO₂ y O₂ (Douce & Neuburger, 1999). El ensamblaje de las distintas subunidades del enzima requiere un control coordinado entre procesos cloroplásticos y citoplasmáticos, en el que participan proteínas conocidas como chaperoninas, principalmente la cpn60 y la cpn10 (Gutteridge & Gatenby, 1995; Andersson, 2008; Bonshtien *et al.*, 2009). La concentración foliar de Rubisco parece estar determinada por el balance entre su síntesis y degradación, y puede variar durante el desarrollo de las hojas (Suzuki *et al.*, 2001b; Irving & Robinson, 2006). El control estequiométrico entre ambas subunidades depende de la acumulación de subunidades no ensambladas, de manera que un exceso de LSU reprime su propia síntesis y un exceso de SSU se corrige a nivel de degradación proteica en el cloroplasto (Irving & Robinson, 2006).

La actividad catalítica de la Rubisco está regulada por un mecanismo que incluye la carbamilación reversible de un grupo ε-amino del residuo Lys201, localizado en el centro activo de la proteína, y la estabilización posterior del carbamato por la unión de Mg²⁺ (Gutteridge & Gatenby, 1995; Andersson, 2008). El estado de activación del enzima responde a cambios inducidos por la luz en el estado redox del estroma durante las transiciones de luz/oscuridad (Pérez *et al.*, 2005) y en el potencial de fosforilación determinado por la razón ATP:ADP en el estroma gracias a una proteína conocida como Rubisco activasa, RBA (Portis *et al.*, 2007). La RBA es un miembro de la familia de proteínas AAA⁺, con actividad ATPasa, que incluye proteínas con funciones homólogas a las chaperonas (Salvucci & Ogren, 1996; Portis, 2003). La Rubisco requiere de la acción de la RBA para ser activa. Ésta facilita la eliminación dependiente de ATP de la RuBP fuertemente unida al enzima (Salvucci & Ogren, 1996; Jensen, 2000; Portis, 2003) y de otros azúcares fosfato (Ristic *et al.*, 2009), induciendo un cambio conformacional que favorece la carbamilación y posterior catálisis de la Rubisco (Fig. 1.3.4c). Dicha proteína puede también liberar al enzima de otros inhibidores como el 2-carboxi-D-arabinitol-1-fosfato (inhibidor nocturno), la xilulosa-1,5-bisfosfato (análoga a la RuBP), el D-glicero-2,3-pentodiolosa-1,5-bisfosfato o el 3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato (Gutteridge & Gatenby, 1995; Taylor *et al.*, 1996; Spreitzer & Salvucci, 2002; Portis, 2003; Parry *et al.*, 2007; Andersson, 2008; Ristic *et al.*, 2009). Se ha indicado que el 2-carboxi-D-arabinitol-1-fosfato podría proteger a la Rubisco de la desactivación durante la noche preservándola de la proteólisis (Khan *et al.*, 1999; Parry *et al.*, 2007).

La RBA es altamente sensible a un estrés térmico moderado (Ristic *et al.*, 2009). La proteína cloroplástica cpn60 desempeña un papel importante, ya que protege a la RBA de la desnaturalización térmica (Salvucci, 2008).

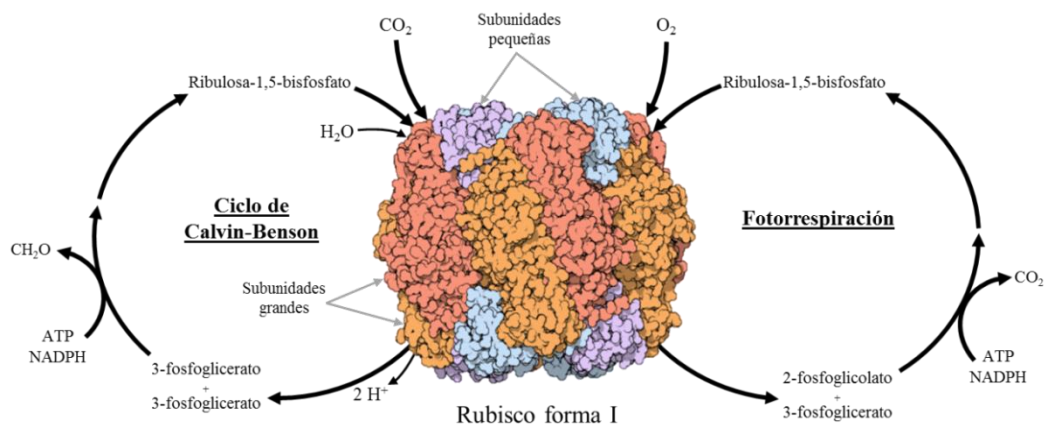


Fig. 1.3.4b. Estructura y función de la Rubisco forma I en plantas superiores. Estructura obtenida de la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

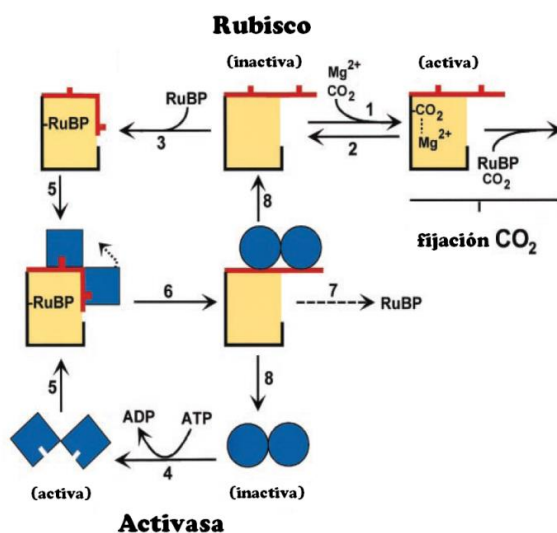


Fig. 1.3.4c. Activación de la Rubisco mediada por la Rubisco activasa (Jensen, 2000). Un centro activo de la Rubisco puede perder espontáneamente el CO_2 (paso 2), y unirse la RuBP fuertemente (paso 3), bloqueando al enzima. La activasa al interactuar con la Rubisco (paso 5) induce un cambio conformacional (paso 6) que facilita la liberación de la RuBP del centro activo (paso 7). La Rubisco puede activarse por unión de CO_2 y Mg^{2+} (paso 1), o bien puede bloquearse de nuevo por unión de la RuBP después de la disociación de la activasa (paso 8).

La Rubisco es considerada el enzima limitante del ciclo de Calvin-Benson y de la fotorrespiración (Suzuki & Makino, 2013), en particular, de la fotosíntesis a las $[\text{CO}_2]$ ambientales actuales. Son tres los factores que determinan el balance entre asimilación de CO_2 y fotorrespiración *in vivo*, e incluyen (i) las propiedades cinéticas de la Rubisco, inherente a la planta, (ii) la temperatura y (iii) la concentración de los sustratos CO_2 y O_2 . En relación a este último aspecto, el enzima anhidrasa carbónica (CA, EC 4.2.1.1) desempeña un papel fundamental en la conductancia del CO_2 en el mesófilo (Aranjuelo *et al.*, 2011a) al catalizar la conversión reversible de CO_2 en HCO_3^- (Moroney *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2007). Existen varias familias de CAs que catalizan la misma reacción (Moroney *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2007), y están involucradas en una amplia variedad de procesos biológicos como la regulación de pH, la transferencia de CO_2 , el intercambio iónico, la respiración, la biosíntesis y la fijación fotosintética de CO_2 (Moroney *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2007). En plantas C_3 , los mayores niveles de la CA se localizan en el estroma de los cloroplastos del mesófilo donde modula el pH del estroma y facilita la difusión del CO_2 a lo largo de la membrana cloroplástica (Moroney *et al.*, 2001;

Yu *et al.*, 2007). La concentración de CO₂, la densidad del flujo de fotones y la disponibilidad de Zn regulan la síntesis de CAs (Yu *et al.*, 2007).

En la fase reductiva del ciclo de Calvin-Benson intervienen los enzimas fosfoglicerato quinasa (PGK, EC 2.7.2.3) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mientras que en la fase de regeneración de la RuBP intervienen la triosa fosfato isomerasa (TPI, EC 5.3.1.1), la aldolasa o fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBA, EC 4.1.2.13), la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11), la transquetolasa (TK, EC 2.2.1.1), la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa, EC 3.1.3.37), la ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa (RPE, EC 5.1.3.1), la ribosa-5-fosfato isomerasa (RPI; EC 5.3.1.6) y la fosforribuloquinasa o ribulosa-5-fosfato quinasa (PRK, EC 2.7.1.19) (Fig. 1.3.4a). Muchos de estos enzimas presentan isoformas con distinta localización subcelular e incluso diferente función. Así, la PGK, GAPDH, TPI, FBA y FBPasa participan no sólo en la fijación fotosintética del CO₂, sino también en la síntesis de carbohidratos o la glicólisis, y la TK, RPE y RPI en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (OPPP, "Oxidative Pentose Phosphate Pathway"). La PGK presenta una isoforma que se localiza en los plastos y cataliza la conversión dependiente de ATP del 3PGA a glicerato-1,3-bisfosfato en el ciclo de Calvin-Benson (Jones *et al.*, 1995), y otra isoforma en el citosol que participa en la generación de ATP en la glicólisis (Huang *et al.*, 2002). De la GAPDH se han encontrado tres enzimas diferentes, dos de las cuales catalizan la oxidación reversible dependiente de P_i del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) a glicerato-1,3-bisfosfato (GAPC, EC 1.2.1.12; GAPA & GAPB, EC 1.2.1.13), mientras que la GAPDH no fosforilante cataliza la oxidación irreversible de GAP a 3PGA generando NADPH (GAPN, EC 1.2.1.9) (Bustos & Iglesias, 2003). La GAPA o GAPB bien puede utilizar NADH o NADPH, preferentemente este último. Está confinada en los cloroplastos e interviene en el ciclo de Calvin-Benson (Bustos & Iglesias, 2003). Está regulada por el sistema Fd/Trx y la proteína CP12 (Fermani *et al.*, 2007; Marri *et al.*, 2010). La GAPC utiliza específicamente NADH y se encuentra en el citoplasma de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Bustos & Iglesias, 2003), expresándose principalmente en estos últimos (Marri *et al.*, 2010). En tejidos fotosintéticos juega un papel importante en el transporte de NADPH del cloroplasto al citosol y, en tejidos no fotosintéticos (endospermo, cotiledones y raíces), compite con GAPC en la glicólisis (Bustos & Iglesias, 2002).

La TPI cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el GAP, proceso involucrado en múltiples rutas como la glicólisis, la gluconeogénesis, el ciclo de Calvin-Benson y la síntesis de ácidos grasos (Xu & Hall, 1993). En plantas superiores, se han encontrado dos isoformas, una presente en el citosol y otra en los plastos (Xu & Hall, 1993). La FBA bien cataliza la conversión reversible del GAP y la DHAP a fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), o bien la transformación de la eritrosa-4-fosfato (E4P) y la DHAP a sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (SBP) (Haake *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010; Uematsu *et al.*, 2012). En plantas de tabaco, Uematsu *et al.* (2012) observaron que la sobreexpresión de la FBA plastídica aumentó la fijación fotosintética de C y la acumulación de biomasa por una inducción de la regeneración de la RuBP, especialmente a una [CO₂] alta. Mientras que Haake *et al.* (1998) mostraron que un descenso de la actividad aldolasa inhibió la fotosíntesis y redujo el contenido de azúcares y el crecimiento en plantas de patata. Se ha encontrado también una isoforma de la FBA citosólica que está involucrada en la glicólisis/gluconeogénesis (Wang *et al.*, 2010). La FBPasa cataliza la conversión irreversible de la FBP a fructosa-6-fosfato (F6P) y P_i (Chueca *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008). Existe una isoforma en el cloroplasto que participa en la asimilación de CO₂, junto a una isoforma citosólica que participa en la síntesis de sacarosa (Chueca *et al.*, 2002) y desempeña un papel clave en la regulación de dicha ruta biosintética (Arrivault *et al.*, 2009). La FBPasa citosólica es inhibida por un exceso de sustrato y está sujeta a una inhibición alostérica mediada por la fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP) y el AMP (Chueca *et al.*, 2002; Trevanion *et al.*,

2004; Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, la isoforma cloroplástica no es inhibida por estos metabolitos, y está regulada transcripcionalmente por la luz (Chueca *et al.*, 2002). A nivel de actividad del enzima, la FBPasa está modulada por varios factores, tales como Ca^{2+} , FBP, pH, Mg^{2+} y el sistema Fd/Trx (Raines *et al.*, 1992; Chueca *et al.*, 2002).

La TK cataliza la transferencia de un grupo de dos átomos de C (glicolaldehído) desde una cetosa a una aldosa, lo cual facilita la interconversión reversible de hexosas, pentosas, tetrasas y TP (Henkes *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2003). Los sustratos y productos de esta reacción son precursores del metabolismo de fenilpropanoides (E4P), la síntesis de nucleótidos (pentosas fosfato), la síntesis de carbohidratos (F6P) y la glicólisis (GAP), involucrados en el metabolismo respiratorio y la biosíntesis de aminoácidos y lípidos (Henkes *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2003). Dicho enzima interviene también en el ciclo oxidativo y reductivo de las pentosas fosfato, convirtiendo tanto el GAP y la F6P a xilulosa-5-fosfato (Xu5P) y E4P, como el GAP y la sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) a ribosa-5-fosfato (R5P) y Xu5P (Flechner *et al.*, 1996; Henkes *et al.*, 2001). Las plantas poseen una TK plastídica predominantemente (Henkes *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2003). En plantas de tabaco se ha observado que un pequeño cambio en la expresión y la actividad de la TK afectó sensiblemente al ciclo de Calvin-Benson y a la síntesis de sacarosa y almidón, entre otros procesos (Henkes *et al.*, 2001).

La SBPasa es un enzima único del ciclo de Calvin-Benson que cataliza la desfosforilación irreversible de la SBP a S7P (Raines *et al.*, 1992; Willingham *et al.*, 1994; Raines *et al.*, 1999). La expresión génica de la SBPasa es dependiente de la luz, el estadio de desarrollo y el estado metabólico (hexosas) de la planta. Su actividad está modulada por el sistema Fd/Trx dependiente de la luz, así como por el pH del estroma, Mg^{2+} y la concentración de sustrato y productos de la reacción (Raines *et al.*, 1992; Raines *et al.*, 1999). Una reducción de la cantidad de proteína y actividad SBPasa limita la fotosíntesis y la producción de carbohidratos en tabaco (Harrison *et al.*, 1997). Por ello, se considera que la SBPasa juega un papel importante en la regulación del flujo de intermediarios en el ciclo de Calvin-Benson. La RPE y la RPI son dos enzimas que participan en el ciclo oxidativo y reductivo de las pentosas fosfato en el cloroplasto, facilitando la distribución de pentosas fosfato a una ruta u otra según las necesidades metabólicas y el estado redox de la célula (Chen *et al.*, 1998). La RPE cataliza la conversión reversible de la ribulosa-5-fosfato (Ru5P) a Xu5P (Chen *et al.*, 1998), y la RPI la transformación reversible de la R5P a Ru5P (Howles *et al.*, 2006). Estas enzimas pueden participar en el OPPP del citosol, como se ha comprobado en distintas especies vegetales (Kopriva *et al.*, 2000; Howles *et al.*, 2006). La PRK es un enzima único del ciclo de Calvin-Benson que cataliza la síntesis irreversible de la RuBP a partir de Ru5P (Lloyd *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2004). La actividad de dicho enzima está regulada por la luz (al igual que su expresión), la razón NADP:NADPH, el Mg^{2+} , el sistema Fd/Trx y la proteína CP12 (Lloyd *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado con anterioridad, algunos enzimas del ciclo de Calvin-Benson, junto a otros enzimas del cloroplasto, experimentan una activación por la luz o bien su estado de activación varía dependiendo del pH del estroma, el estado redox y la concentración de metabolitos y Mg^{2+} del cloroplasto (Howard *et al.*, 2011). Dicho proceso se conoce como regulación redox mediada por el sistema Fd/Trx. Así, cuando la CTEF es activada por la luz se produce la entrada de protones desde el estroma al interior de los tilacoides que se acompaña de una salida de Mg^{2+} al estroma. A la vez, el flujo fotosintético de electrones llega a la Fd y, por mediación de la Fd:Trx reductasa (FTR, EC 1.8.7.2), se transfieren a las Trx que se reducen y activan diversos enzimas por reducción de sus puentes disulfuro (Buchanan, 1980; Wang *et al.*, 2014), en concreto los enzimas GAPDH, FBPasa, SBPasa y PRK (Kamber & Feller, 1998; Fermani *et al.*, 2007). Este sistema permite mantener un

equilibrio entre la fijación de CO₂ y la producción de energía al activar los enzimas durante el día y desactivarlos por la noche (Fermani *et al.*, 2007). Otros enzimas del ciclo de Calvin-Benson están regulados por la formación reversible de complejos supramoleculares con otros componentes del cloroplasto. Éste es el caso del complejo multienzimático PRK/GAPDH/CP12, formado por los dos enzimas con la proteína CP12, que se ha observado en cloroplastos de plantas de *Arabidopsis*, espinaca, guisante y maíz (Marri *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2011). Dicho complejo se forma bajo el control del sistema Fd/Trx, los nucleótidos piridínicos, ATP y glicerato-1,3-bisfosfato (Marri *et al.*, 2010), y se ha observado que cuando las hojas reciben luz tiene lugar la disociación del complejo formado en la oscuridad, permitiendo el aumento de la actividad de los enzimas (Howard *et al.*, 2011).

1.3.5. Fotorrespiración

La Rubisco puede catalizar la oxigenación de la RuBP y producir una molécula de 3PGA y otra de 2-fosfoglicolato en el proceso conocido como fotorrespiración o ciclo C₂ oxidativo del C fotosintético (Fig. 1.3.5a). En plantas C₃, la fotorrespiración comporta el tráfico masivo de moléculas entre diferentes orgánulos (cloroplasto, peroxisoma y mitocondria) de las células del mesófilo fotosintéticamente activas (Douce & Neuburger, 1999) mediante proteínas transportadoras. La molécula de 3PGA generada se metaboliza directamente en el ciclo de Calvin-Benson (Truszkiewicz & Paszkowski, 2004). También en el cloroplasto, el 2-fosfoglicolato es desfosforilado a glicolato en la reacción catalizada por la 2-fosfoglicolato fosfatasa (PGLP, EC 3.1.3.18) (Schwarte & Bauwe, 2007). La expresión del gen que codifica dicha proteína está regulada por la luz, mientras que el enzima posee una elevada especificidad por su sustrato y requiere Cl⁻ y Mg²⁺ para su completa activación (Schwarte & Bauwe, 2007). El glicolato pasa al peroxisoma y es oxidado a glioxilato por la glicolato oxidasa (GO, EC 1.1.3.15), produciendo H₂O₂ (Douce & Neuburger, 1999; Rojas *et al.*, 2012). El H₂O₂ generado, que es una de las principales moléculas señalizadoras en el control del crecimiento y la respuesta a diferentes estreses (Foyer *et al.*, 2009), se descompone en H₂O y O₂ por acción de la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6). La CAT desempeña un papel importante como respuesta de defensa de la planta frente al daño oxidativo (Azevedo *et al.*, 1998; Luna *et al.*, 2005). El enzima presenta cambios rápidos en el balance síntesis-degradación a nivel de expresión génica, traducción y/o proteína (Luna *et al.*, 2005). La expresión del gen *cat1* en trigo está sujeta a un importante control circadiano, con un nivel máximo en la luz en correlación con la formación de H₂O₂ en la fotorrespiración (Luna *et al.*, 2005). Posteriormente, el glioxilato se convierte a glicina (Gly) por transaminación con Glu catalizado por la glutamato:glioxilato aminotransferasa (GGAT, EC 2.6.1.4) (Igarashi *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2006).

La Gly es transportada a la mitocondria y por la acción conjunta del complejo glicina descarboxilasa (GDC, EC 1.4.4.2, 2.1.2.10 y 1.8.1.4) y la serina hidroximetiltransferasa (SHMT, EC 2.1.2.1) es transformada en serina (Ser) (Douce & Neuburger, 1999; Engel *et al.*, 2007; Rajinikanth *et al.*, 2007; Jamaï *et al.*, 2009). El proceso requiere dos Gly, una de las cuales es descarboxilada por la GDC, generando la liberación de CO₂, amonio (NH₄⁺) y 5,10-metilen-tetrahidrofolato (CH₂-THF), a la vez que se reduce el NAD⁺ a NADH (Engel *et al.*, 2007). Posteriormente, la SHMT utiliza el CH₂-THF y una segunda molécula de Gly para sintetizar Ser (Engel *et al.*, 2007). Los dos enzimas que participan en el proceso suministran también compuestos de un átomo de C a otras rutas como la biosíntesis de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos secundarios (Engel *et al.*, 2007; Rajinikanth *et al.*, 2007). Ambos enzimas representan la mitad del contenido de proteínas solubles de la matriz mitocondrial (Douce & Neuburger, 1999; Rajinikanth *et al.*, 2007). Mientras que el GDC está presente únicamente

en la mitocondria y consta de cuatro isoformas, H, P, T y L (Douce & Neuburger, 1999; Engel *et al.*, 2007; Rajinikanth *et al.*, 2007), se han encontrado isoformas de SHMT en el citosol, el cloroplasto y el núcleo (Engel *et al.*, 2007). En *Populus* se ha observado una regulación circadiana de los promotores de los genes *GDC* (Rajinikanth *et al.*, 2007).

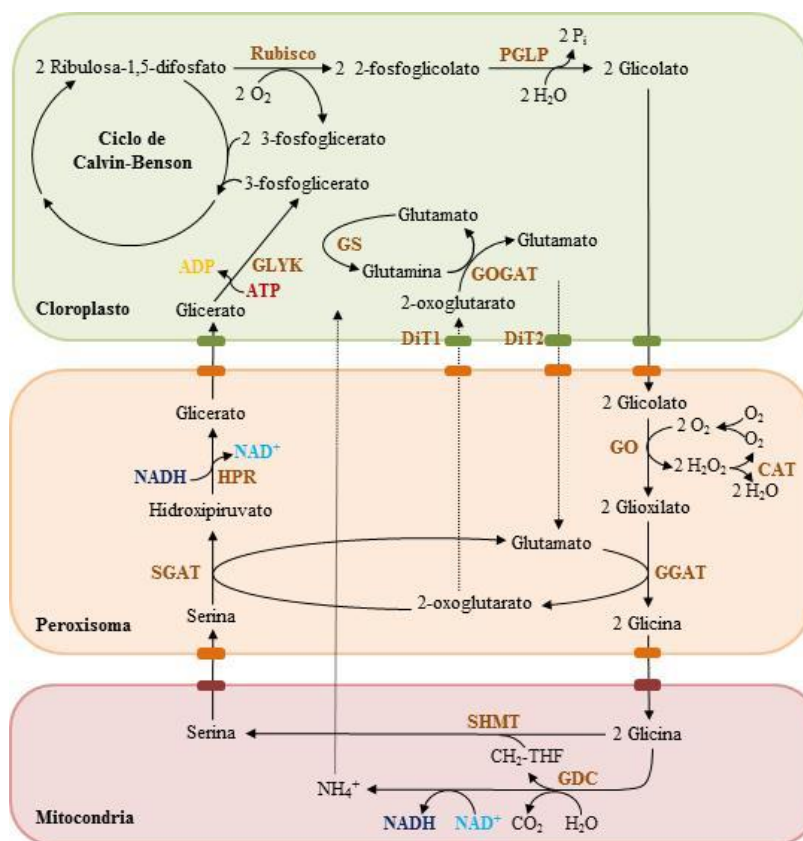


Fig. 1.3.5a. Fotorrespiración o ciclo C_2 . Esquema basado en Masclaux-Daubresse *et al.* (2006), Foyer *et al.* (2009) y Taiz & Zeiger (2010). Las reacciones que tienen lugar en este proceso son catalizadas por: Rubisco, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa; PGLP, fosfoglicolato fosfatasa; GO, glicolato oxidasa; CAT, catalasa; GGAT, glutamato:glioxilato aminotransferasa; GDC, glicina descarboxilasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa; SGAT, serina:glioxilato aminotransferasa; HPR, hidroxipiruvato reductasa; GLYK, glicerato quinasa; GS, glutamina sintasa; GOGAT, glutamato sintasa; DiT1, translocador 2-oxoglutarato/malato; DiT2, translocador glutamato/malato.

La Ser es transportada al peroxisoma y, por transaminación mediada por la serina:glioxilato aminotransferasa (SGAT, EC 2.6.1.45), es convertida en hidroxipiruvato. Dicho enzima puede catalizar la transaminación de otros substratos, como la Ser a glioxilato, la alanina a glioxilato y la Ser a piruvato (Igarashi *et al.*, 2003). En mutantes de *Arabidopsis* se ha comprobado que las aminotransferasas GGAT y SGAT son importantes reguladores del contenido de aminoácidos y, por tanto, del metabolismo del N (Igarashi *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2006). El hidroxipiruvato se convierte a glicerato en la reacción catalizada por la hidroxipiruvato reductasa (HPR1, EC 1.1.1.29; HPR2, EC 1.1.1.81) que conlleva la oxidación de NAD(P)H. De dicho enzima se han descrito dos isoformas, una dependiente de NADH en el peroxisoma (HPR1) y otra dependiente de NAD(P)H en el citosol (HPR2) (Timm *et al.*, 2008). La actividad y expresión génica del enzima varían con la luz y la fase de desarrollo de las plantas, siendo el patrón de expresión similar al de otros genes fotosintéticos (Schwartz *et al.*, 1991). La fotorrespiración finaliza cuando el glicerato es transportado al cloroplasto y es fosforilado a 3PGA por la glicerato quinasa (GLYK, EC 2.7.1.31) dependiente de ATP, producto que es incorporado al ciclo de Calvin-Benson (Boldt *et al.*, 2005).

En plantas C_3 , la fotorrespiración conlleva a una pérdida constante de RuBP y a un consumo de ATP y NADPH (Stitt et al., 2010). Además, el CO_2 liberado tiene que ser reasimilado por la Rubisco y el NH_4^+ por la glutamina sintetasa y glutamato sintasa en el cloroplasto, con la consiguiente pérdida de ATP y poder reductor (Douce & Neuburger, 1999; Jamai et al., 2009). Por ello, se considera un proceso derrochador de energía que disminuye la eficiencia de la fotosíntesis y limita el rendimiento de los cultivos (Foyer et al., 2009). En ciertas circunstancias puede tener un efecto beneficioso, disipando el exceso de energía en condiciones fotoinhibitorias a altas intensidades luminosas o cuando la disponibilidad de CO_2 es limitada (Kozaki & Takeba, 1996; Jamai et al., 2009), aliviando el daño producido por ROS (Douce & Neuburger, 1999).

1.3.6. Metabolismo de carbohidratos

Los productos directos de la asimilación fotosintética del C en las hojas de la mayoría de las plantas son la sacarosa y el almidón, que se sintetizan en el citosol y el cloroplasto, respectivamente (Fig. 1.3.6a). La sacarosa constituye la forma principal en la que el C es transportado desde las hojas (fuente) a otros órganos (sumideros) para mantener el crecimiento, mientras que el almidón representa una forma de almacenaje de C transitoria (Stitt & Zeeman, 2012). En cereales y otras especies vegetales, la fijación del C permite la síntesis de fructanos en la vacuola a partir de sacarosa (Smith & Stitt, 2007). Los carbohidratos no sólo funcionan como fuentes metabólicas y componentes estructurales de las células, sino que también actúan como moléculas reguladoras que controlan la expresión génica y los procesos metabólicos (Jang et al., 1997; Sheen et al., 1999; Paul et al., 2008), contribuyendo a la homeostasis de la planta (Kleczkowski et al., 2004).

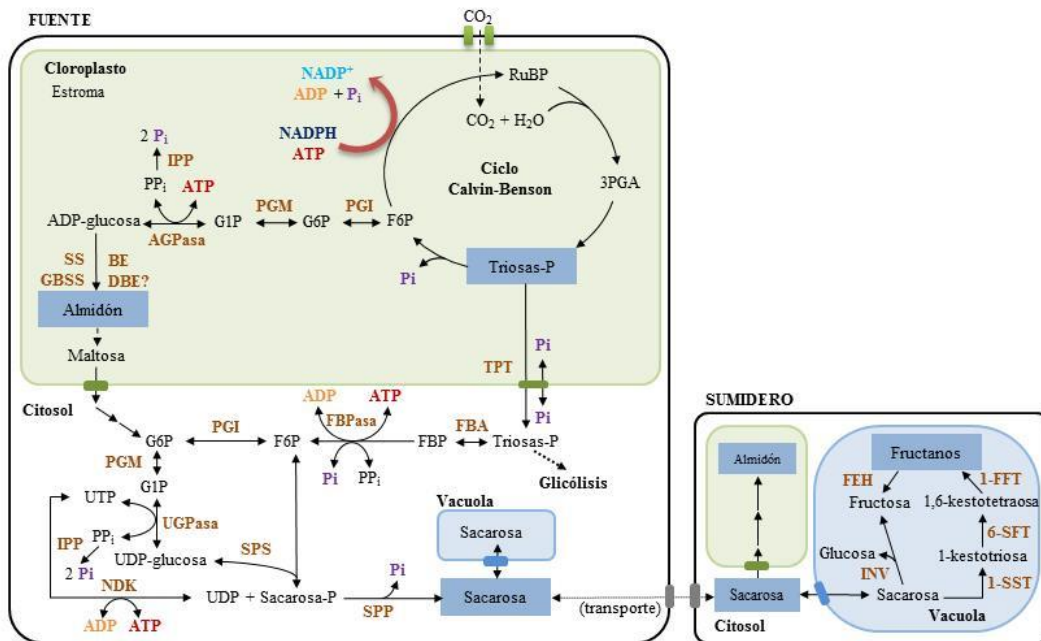


Fig. 1.3.6a. Metabolismo de carbohidratos en la célula vegetal. Esquema basado en Vijn & Smeekens (1999) y Nielsen et al. (2004). PGI, fosfoglucoisomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; IPP, pirofosfatasa inorgánica; SS, almidón sintasa; GBSS, almidón sintasa unida a gránulo; BE, enzima ramificante; DBE, enzima desramificante; TPT, translocador de triosas fosfato; FBA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; FBPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; UGPasa, UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa; SPS, sacarosa 6-fosfato sintasa; SPP, sacarosa 6-fosfato fosfatasa; NDK, nucleósido bisfosfato kinasa; INV, invertasa ácida; 1-SST, sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa; 6-SFT, sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa; 1-FFT, fructano:fructano 1-fructosiltransferasa; FEH, fructano hexohidrolasas.

1.3.6.1. Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en la mayoría de las plantas (Leterrier *et al.*, 2008). Constituye el 70% del peso seco del grano en trigo (Huang & Brûlé-Babel, 2010). Es un polisacárido insoluble formado por amilosa, un polímero lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces $\alpha(1-4)$, y amilopectina, polímero altamente ramificado en el que entre las uniones $\alpha(1-4)$ se intercalan ramificaciones con enlaces $\alpha(1-6)$ (Grennan, 2006; Leterrier *et al.*, 2008; Orzechowski, 2008). La amilopectina suele constituir el 75% del almidón y la amilosa el 25% restante (Huang & Brûlé-Babel, 2010). El almidón se deposita en gránulos semicristalinos en los cloroplastos (Grennan, 2006; Geigenberger, 2011) y constituye un depósito transitorio de C que es degradado durante la noche para facilitar la síntesis de sacarosa y mantener el metabolismo de la hoja y la exportación a otros órganos de la planta (Stitt & Zeeman, 2012).

En órganos fotosintéticos, la síntesis de almidón tiene lugar en los cloroplastos (Fig. 1.3.6a). Se inicia con la formación de ADP-glucosa a partir de la glucosa-1-fosfato (G1P) y ATP en la reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa, EC 2.7.7.27) (Ainsworth *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 2002). Posteriormente, la ADP-glucosa actúa como donador de grupos glucosilos para la formación de los polímeros que componen el gránulo de almidón (Geigenberger, 2011). La G1P procede de la conversión de la F6P, generada en el ciclo de Calvin-Benson, en glucosa-6-fosfato (G6P), que es transformada en su isómero G1P por la acción consecutiva de la fosfoglucosa isomerasa (PGI, EC 5.3.1.9) y la fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2). Dichos enzimas catalizan reacciones reversibles y se han descrito isoformas citosólicas de ambos que parecen estar involucradas en la glicólisis y la síntesis de carbohidratos (Stitt & Zeeman, 2012). En órganos no fotosintéticos, la síntesis de almidón se produce en los amiloplastos a expensas de la energía procedente de la respiración mitocondrial y de la sacarosa transportada, que debe ser previamente hidrolizada a glucosa y fructosa en el apoplasto por la acción de invertasas o en el simplasto por la sacarosa sintasa (Geigenberger, 2011). La reacción catalizada por la AGPasa se considera el paso limitante en esta ruta biosintética al estar altamente regulada en todas las especies vegetales estudiadas (Grennan, 2006; Orzechowski, 2008). La AGPasa es un heterotetrámero formado por dos subunidades grandes y dos pequeñas (Fig. 1.3.6.1a), cada una de las cuales es codificada por genes específicos según el órgano, tejido o localización celular (Ainsworth *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 2002). Mientras que las subunidades pequeñas poseen propiedades catalíticas y reguladoras, las grandes desempeñan un papel regulador. Junto a la AGPasa plastídica puede existir una citosólica, mayoritariamente en el endospermo de cereales como el trigo (Burton *et al.*, 2002; Geigenberger, 2011).

La AGPasa está sujeta a una regulación alostérica mediada por metabolitos, siendo el 3PGA un activador del enzima y el P_i un inhibidor (Ainsworth *et al.*, 1995), y a una regulación redox post-traducciona en respuesta a la luz y los niveles de azúcares (Rolland *et al.*, 2006; Stitt & Zeeman, 2012) (Fig. 1.3.6.1a). Ambos mecanismos de regulación conducen a la activación del enzima durante el día y a su inactivación durante la noche (Geigenberger, 2011). Se ha propuesto que la trehalosa-6-fosfato (T6P) podría ser la molécula señalizadora en la ruta de transducción que media la activación redox de la AGPasa dependiente de sacarosa, además de estar involucrada en la comunicación entre el citosol y el cloroplasto modulando el estado de C de la planta (Stitt & Zeeman, 2012). La AGPasa puede estar también regulada a nivel transcripcional dependiendo del estado nutricional de la planta. Así, se ha mostrado que la sacarosa y la glucosa aumentan la expresión de varios de los genes que la codifican (Tiessen *et al.*, 2013). La trehalosa induce la expresión de uno de los genes que codifica la subunidad grande del enzima en *Arabidopsis* (Wingler *et al.*, 2000), mientras que el NO_3^- y el fosfato

disminuyen su expresión (Geigenberger, 2011). La reacción catalizada por la AGPasa es reversible siempre que el pirofosfato (PP_i) liberado no sea hidrolizado a P_i por una pirofosfatasa alcalina plastídica (Stitt & Zeeman, 2012), conocida como pirofosfatasa inorgánica (IPP, EC 3.6.1.1) (Schulze *et al.*, 2004). Recientemente, se ha identificado una proteína que cataliza la hidrólisis de la ADP-glucosa (u otros substratos) en AMP y G1P, la ADP-glucosa pirofosfatasa (AGPPasa, EC 3.1.4.?), y controla los niveles de ADP-glucosa y los productos de su hidrólisis en los plastos (Rodríguez-López *et al.*, 2000). La actividad *in vivo* del enzima está regulada por el pH del estroma en los tejidos fotosintéticos, siendo más activa en la oscuridad a pH neutro que durante el día a pH alcalino.

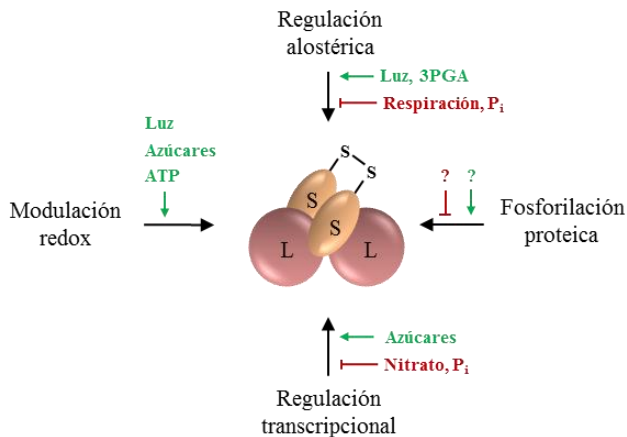


Fig. 1.3.6.1a. Regulación de la AGPasa plastídica. Esquema basado en Geigenberger (2011). El enzima AGPasa es un heterotetrámero formado por dos subunidades grandes (L) y dos subunidades pequeñas (S).

La almidón sintasa cataliza la elongación de las cadenas de glucosa de la amilosa y la amilopectina por transferencia del grupo glucosilo de la ADP-glucosa al extremo no reductor del polímero de glucosa en crecimiento con enlaces $\alpha(1-4)$ (Leterrier *et al.*, 2008; Orzechowski, 2008). Se han identificado cinco isoformas localizadas en cloroplastos y/o amiloplastos, que bien pueden encontrarse unidas a gránulos (GBSS, EC 2.4.1.242), solubles (SS, EC 2.4.1.21), en el estroma (SSIII y SSIV) o de ambos tipos (SSI y SSII) (Leterrier *et al.*, 2008). De forma conjunta actúan los enzimas ramificantes de almidón (BE), que catalizan la fragmentación de la molécula de amilopectina por el enlace $\alpha(1-4)$ para volver a unir el fragmento a una molécula de glucosa por el enlace $\alpha(1-6)$ y originar así una ramificación. Existen también los enzimas desramificantes de almidón (DBE) (Orzechowski, 2008) que hidrolizan los enlaces $\alpha(1-6)$ (Grennan, 2006; Geigenberger, 2011), de los que se diferencian las isoamilasas (ISO, EC 3.2.1.68) y las pululanastas (EC 3.2.1.41) según la especificidad por el substrato (Genschel *et al.*, 2002; Grennan, 2006; Orzechowski, 2008). Se ha propuesto una ruta alternativa al modelo clásico de síntesis de almidón no exenta de cierta controversia (Geigenberger, 2011), que propone que la síntesis de ADP-glucosa tiene lugar en el citosol por la sacarosa sintasa, continuando la síntesis final de almidón en el cloroplasto (Muñoz *et al.*, 2005). La degradación de almidón es un proceso complejo con múltiples pasos en los que intervienen distintos enzimas: glucano-agua diquinasa (GWD), fosfoglucono-agua diquinasa (PWD), α - y β -amilasas, “disproportionating enzyme”, DBE, etc. (Orzechowski, 2008; Stitt & Zeeman, 2012).

1.3.6.2. Sacarosa

La mayor parte del C fijado fotosintéticamente se utiliza en la síntesis de sacarosa. La sacarosa es el carbohidrato más comúnmente transportado en plantas y proporciona la mayor parte de la energía y el C necesario para el crecimiento y desarrollo de los órganos no fotosintéticos (Sheen *et al.*, 1999; Lunn,

2003). Además, actúa como una molécula señal que regula la expresión de una amplia variedad de genes que están involucrados en diferentes rutas metabólicas y funciones celulares (Sheen *et al.*, 1999; Osuna *et al.*, 2007). La sacarosa es un disacárido formado por una molécula de fructosa y otra de glucosa unidas por sus carbonos 1 y 2 ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$), respectivamente. La síntesis de sacarosa tiene lugar en el citosol a partir de las TPs exportadas desde el estroma del cloroplasto (Fig. 1.3.6a) en intercambio estequiométrico con P_i a través del translocador de triosas fosfato/fosfato (TPT), un complejo proteico localizado en la membrana interna del cloroplasto (Wang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008). La expresión génica del TPT está regulada en respuesta a la luz en plantas de patata, pero no en tabaco (Sun *et al.*, 2006). En trigo, se ha mostrado que un aumento de la concentración de sacarosa, glucosa y/o fructosa disminuye su expresión e inhibe el flujo de fotosintatos al citosol, proceso que podría estar mediado por la hexoquinasa (HXK) (Sun *et al.*, 2006). Se han descrito otros transportadores en la membrana cloroplástica (Noguchi & Yoshida, 2008), como el translocador de glucosa-6-fosfato/fosfato (GPT) que importa G6P al plasto para ser utilizada en la síntesis de almidón o ácidos grasos o en el OPPP en tejidos heterotróficos (Niewiadomski *et al.*, 2005).

La síntesis de sacarosa se inicia con la conversión de las TPs exportadas al citosol en FBP por la acción de la FBA citosólica, cuya posterior desfosforilación catalizada por la FBPasa citosólica da lugar a la formación de F6P, uno de los precursores necesarios para la síntesis de sacarosa junto a la UDP-glucosa (Fig. 1.3.6a). La formación de esta última tiene lugar por transformación de la uridina trifosfato (UTP) y la G1P, generada a partir de otra molécula de F6P por acción de la PGI y PGM citosólicas, en UDP-glucosa y PP_i en la reacción reversible catalizada por la UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGPasa, EC 2.7.7.9) (Eimert *et al.*, 1996; Kleczkowski *et al.*, 2004). Posteriormente, la sacarosa-fosfato sintasa (SPS, EC 2.4.1.14) cataliza la conversión de la F6P y la UDP-glucosa en sacarosa-6-fosfato (S6P) (Sharma *et al.*, 2010), cuya hidrólisis mediada por la sacarosa-fosfato fosfatasa (SPP, EC 3.1.3.24) permite la síntesis de sacarosa y la liberación de P_i (Lunn, 2003). La UGPasa presenta una localización predominantemente citosólica, aunque se ha encontrado también en los amiloplastos y el aparato de Golgi (Kleczkowski *et al.*, 2004). En hojas, la UGPasa suministra UDP-glucosa para la síntesis de sacarosa, mientras que en tejidos no fotosintéticos parece estar involucrada en la hidrólisis de la UDP-glucosa generada, junto con fructosa, a partir de sacarosa por acción de la sacarosa sintasa (SUS, EC 2.4.1.13) (Kleczkowski *et al.*, 2004). La actividad SUS se asocia a una función degradativa de sacarosa, similar a la de las invertasas, que proporciona intermediarios para la síntesis de almidón durante el desarrollo del endospermo, además de participar en la síntesis de polisacáridos de pared celular (Sturm *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2011) (Fig. 1.3.6.2a). En este caso, proporciona UDP-glucosa al complejo celulosa sintasa (complejo CesA, EC 2.4.1.12) que permite la extensión de la cadena de celulosa, constituida por glucosas con enlaces $\beta(1-4)$ (Endler & Persson, 2011). En el endospermo de cereales, las actividades UGPasa y AGPasa citosólica están coordinadas para sintetizar la ADP-glucosa necesaria para la producción de almidón una vez importada al interior de los plastos (Eimert *et al.*, 1996; Kleczkowski *et al.*, 2004). La sacarosa y ciertos estreses abióticos, como el frío y la deficiencia de fósforo (P), inducen la expresión génica de la UGPasa (Kleczkowski *et al.*, 2004). La SPS es uno de los enzimas claves en la regulación de la síntesis de sacarosa en trigo y otras especies vegetales, junto a la FBPasa citosólica (Trevanion *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2010). La SPS está regulada por efectores alostéricos, siendo activada por G6P e inhibida por P_i (Nielsen *et al.*, 2004), y está sujeta a un complejo sistema de regulación transcripcional y post-traduccional (Sharma *et al.*, 2010). Durante el día, se activa por desfosforilación mediada por una fosfatasa, la cual es inhibida por P_i , y durante la noche, se desactiva por fosforilación dependiente de la quinasa SnRK1, la cual es inhibida por G6P (Trevanion *et al.*, 2004).

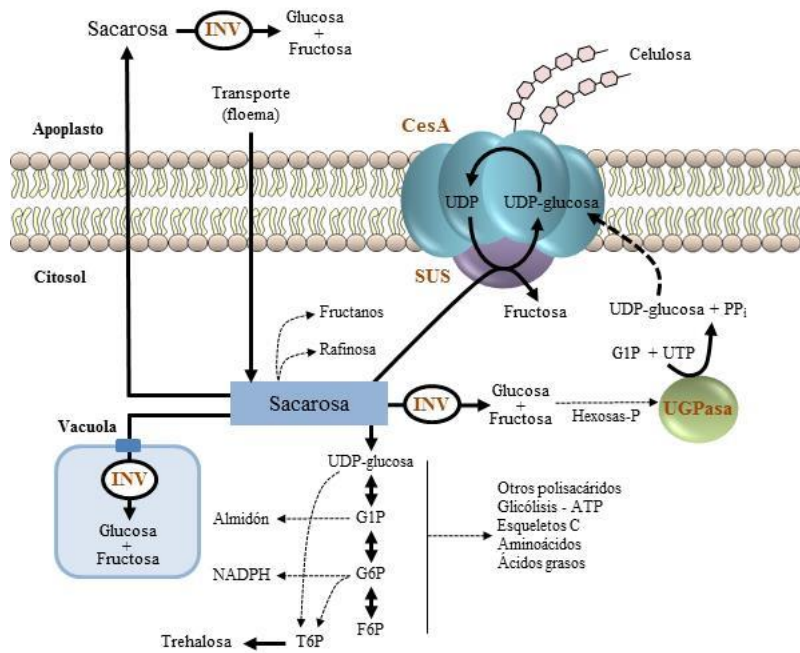


Fig. 1.3.6.2a. Esquema representativo de la utilización de sacarosa como fuente de carbono y energía. Basado en Sturm (1999), Paul *et al.* (2008), y Endler & Persson (2011). La propia sacarosa, a través de la reacción catalizada por la sacarosa sintasa (SUS), o sus subproductos, a través de la reacción catalizada por la UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UGPasa), pueden ser empleados para proporcionar UDP-glucosa para la síntesis de celulosa por la celulosa sintasa (CesA), o participar en otros múltiples procesos, como la síntesis de almidón, fructanos, rafinosa, trehalosa, etc.

La sacarosa es un carbohidrato soluble que puede transportarse al resto de la planta vía floema y, en los órganos sumideros, es importada a las células por medio de los plasmodesmos (transporte simplástico) o a través de la pared celular (transporte apoplástico) (Rolland *et al.*, 2006). La sacarosa puede ser degradada (i) en el citosol en glucosa y fructosa por las invertasas citosólicas o en fructosa y UDP-glucosa por la SUS; (ii) en la vacuola en glucosa y fructosa por las invertasas vacuolares, y (iii) en el apoplasto en glucosa y fructosa por las invertasas de pared celular (Rolland *et al.*, 2006) (Fig. 1.3.6.2a). Las invertasas vacuolares y de pared celular se denominan invertasas ácidas por degradar la sacarosa, además de otros oligosacáridos como la rafinosa, a un pH ácido (Vargas *et al.*, 2007). Existen al menos dos isoformas de invertasas citosólicas capaces de degradar únicamente sacarosa a un pH neutro o alcalino (Sturm, 1999; Vargas *et al.*, 2007). Las invertasas desempeñan múltiples funciones, puesto que además de proporcionar hexosas para la respiración, actúan como fuente de C y energía para la síntesis de numerosos compuestos. Su expresión está modulada en respuesta a distintos estreses ambientales (Sturm, 1999; Vargas *et al.*, 2007).

1.3.6.3. Fructanos

La mayoría de las plantas almacenan almidón y sacarosa como carbohidratos de reserva (Trevanion *et al.*, 2004), pero alrededor de un 15% de las angiospermas almacenan fructanos (Hendry, 1993). Entre ellas destacan las familias Poaceae, Asteraceae y Liliaceae (Kawakami *et al.*, 2005). Se trata de polímeros solubles lineales o ramificados de fructosa, constituidos por una molécula de sacarosa con fructosas unidas por enlaces $\beta(2-1)$ y/o $\beta(2-6)$. En plantas superiores se han identificado cinco tipos de fructanos que se distinguen por sus enlaces glucosídicos: inulina, neoinulina, levano, neolevano y levano mixto (Vijn & Smeekens, 1999; van den Ende, 2013) (Fig. 1.3.6.3a). Los fructanos del tipo

levano mixto están formados por cadenas lineales de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-6)$ con ramificaciones con uniones $\beta(2-1)$. Se encuentran presentes en gramíneas como el trigo (Vijn & Smeekens, 1999) y se conocen comúnmente como fructanos de “tipo gramíneas”, aunque se han encontrado también en dicotiledóneas (van den Ende *et al.*, 2011).

Los fructanos se sintetizan en la vacuola a partir de sacarosa (Figs. 1.3.6a y 1.3.6.3a) por la acción de enzimas específicos denominados fructosiltransferasas (FT) (Vijn & Smeekens, 1999; Xue *et al.*, 2011). En trigo, se han identificado tres tipos de FTs, cuya acción combinada permite la síntesis de fructanos del tipo gramíneas (Kawakami & Yoshida, 2005). La sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99) transfiere un residuo fructosilo de una molécula de sacarosa a otra para generar 1-kestotriosa y glucosa (Kawakami & Yoshida, 2002; Gao *et al.*, 2010). La sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT, EC 2.4.1.10) transfiere también el residuo fructosilo de una sacarosa donadora a la 1-kestotriosa para formar la 1,6-kestotetraosa o bien a otro fructano introduciendo las uniones $\beta(2-6)$ (Kawakami & Yoshida, 2005; van den Ende, 2013). La fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT, EC 2.4.1.100) permite alargar la cadena de fructosilos y cataliza la transferencia de un residuo de fructosa de un fructano a otro o a la sacarosa formando las uniones $\beta(2-1)$ (Kawakami & Yoshida, 2005; Xue *et al.*, 2011). Existe otra FT, la fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT, EC 2.4.1.243), que transfiere la fructosa de la 1-kestotriosa a la sacarosa para formar 6G-kestotriosa (Kawakami & Yoshida, 2005), aunque rara vez se ha encontrado en plantas de la tribu Triticeae (Gao *et al.*, 2010).

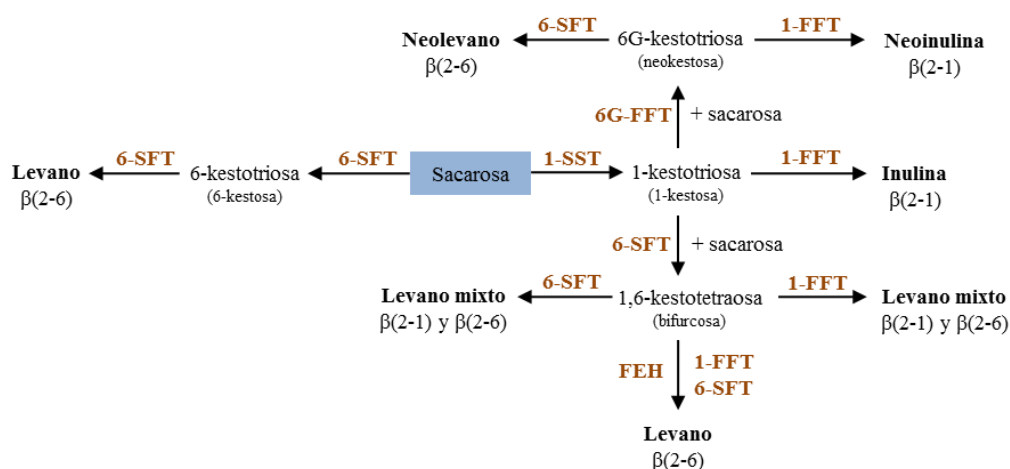


Fig. 1.3.6.3a. Esquema representativo de la síntesis de fructanos en plantas. Basado en los modelos de Vijn & Smeekens (1999) y van den Ende (2013), y en el propuesto inicialmente por Edelman & Jefford (1968). 1-SST, sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa; 1-FFT, fructano:fructano 1-fructosiltransferasa; 6-SFT, sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa; 6G-FFT, fructano:fructano 6-glucosa-fructosiltransferasa; FEH, fructano exohidrolasas.

Las fructano exohidrolasas (FEH) son los enzimas responsables de la degradación de fructanos y actúan liberando residuos terminales de fructosa de la cadena (Gao *et al.*, 2010). La degradación de fructanos complejos del tipo gramíneas requiere la acción combinada de enzimas que rompan los enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ (Kawakami *et al.*, 2005; van Riet *et al.*, 2006). La fructano 1-exohidrolasa (1-FEH, EC 3.2.1.153) hidroliza los enlaces $\beta(2-1)$ presentes en inulinas y en las ramificaciones de los fructanos con uniones $\beta(2-1)$ (van den Ende *et al.*, 2003a; van Riet *et al.*, 2008). Mientras que la fructano 6-exohidrolasa (6-FEH, EC 3.2.1.154) hidroliza los enlaces $\beta(2-6)$ característicos de los levanos (van Riet *et al.*, 2006). En trigo, además de las FEHs descritas, se ha identificado alguna otra

como la 6-kestotriosa exohidrolasa (6-KEH) que degrada fructanos en el apoplasto, preferentemente la 6-kestotriosa (van den Ende *et al.*, 2005), junto a la fructano 6&1-exohidrolasa (6&1-FEH), que participa en la degradación de la 1,6-kestotetraosa u otros fructanos de bajo grado de polimerización rompiendo los enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ (Kawakami *et al.*, 2005). El mecanismo de degradación propuesto para los fructanos del tipo gramíneas parece empezar con la acción de la 6-FEH y continúa con la 6&1-FEH, la 1-FEH y la 6-KEH (Kawakami *et al.*, 2005; van den Ende *et al.*, 2005). Recientemente, Kawakami & Yoshida (2012) mostraron que una 6-FEH con baja actividad 1-FEH puede degradar casi todos los fructanos en plantas de trigo. Además, estudios filogenéticos han puesto de manifiesto que las FTs derivan de las invertasas vacuolares y las FEHs de invertasas apoplásticas (van den Ende *et al.*, 2005; van Riet *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010). No obstante, aun cuando existen evidencias de que algunas invertasas ácidas pueden degradar fructanos (Verspreet *et al.*, 2013), ninguna FEH parece degradar sacarosa (Kawakami *et al.*, 2005; van Riet *et al.*, 2006).

En trigo y otros cereales, los fructanos pueden almacenarse tanto en el grano como en órganos vegetativos, hojas, tallos y raíces, dependiendo de la fase de desarrollo y de las condiciones de crecimiento (Morcuende *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2005). A diferencia de otras especies vegetales, en el trigo y la cebada predominan los fructanos de bajo grado de polimerización como la 1,6-kestotetraosa (van den Ende *et al.*, 2003a; Kawakami *et al.*, 2005). La síntesis de fructanos es dependiente de la acumulación de sacarosa y se ha demostrado que existe una concentración umbral de ésta para la producción de fructanos, que se acompaña de una inducción de la expresión génica y la actividad de las FTs (Kawakami & Yoshida, 2002; Pollock *et al.*, 2003; Kawakami & Yoshida, 2005). La acumulación de fructanos aumenta con la iluminación (Morcuende *et al.*, 2004), la sequía (Méndez *et al.*, 2011), las temperaturas bajas (Pérez *et al.*, 2001) y la deficiencia de N por inducción de la actividad de los enzimas de su síntesis, en especial la 1-SST y la 6-SFT (Kawakami & Yoshida, 2002; Morcuende *et al.*, 2004; Kawakami & Yoshida, 2005). La trehalosa también aumenta los niveles de fructanos ya que induce la actividad y, en menor extensión, la expresión de la 6-SFT (Müller *et al.*, 2000), mientras que el NO_3^- y el fosfato los disminuyen (Morcuende *et al.*, 2004; Morcuende *et al.*, 2005). El NO_3^- es una señal negativa para la expresión de la 6-SFT (Morcuende *et al.*, 2004) y el fosfato disminuye la actividad SPS y, por tanto, reduce los niveles de sacarosa, el sustrato para la síntesis de fructanos (Morcuende *et al.*, 2005). La expresión de los enzimas de la síntesis de fructanos parece estar regulada por una ruta específica mediada por la sacarosa que no depende de las HXKs (Xue *et al.*, 2011; van den Ende, 2013), en la que las proteínas quinasas y las fosfatasa parecen estar involucradas (Xue *et al.*, 2011). Se ha identificado en trigo un factor de transcripción, el MYB13 (Xue *et al.*, 2011), que actúa sobre el promotor de los genes *1-SST*, *6-SFT* y *1-FFT* activando su expresión (Kooiker *et al.*, 2013). Por otro lado, la sacarosa parece estar involucrada en el control de la actividad de las FEHs y muy posiblemente de su expresión (van den Ende *et al.*, 2003a; van den Ende, 2013), aunque no existen evidencias para la 6-FEH (van Riet *et al.*, 2006).

Aun cuando la síntesis de fructanos y sus enzimas se encuentran confinados en la vacuola, se ha detectado la presencia de fructanos y FEHs en el apoplasto y un transporte de fructanos por los tejidos vasculares (Valluru & van den Ende, 2008). Las FEHs apoplásticas podrían desempeñar una función de defensa al degradar los fructanos exógenos formados por fitopatógenos (van Riet *et al.*, 2006), ya que se han encontrado incluso en plantas que no producen fructanos (van den Ende *et al.*, 2003b). Se desconoce el mecanismo de transporte de los fructanos desde la vacuola, aunque se especula que podría tener lugar por exocitosis a través de vesículas del tonoplasto (Valluru & van den Ende, 2008). Junto a su papel como carbohidratos de reserva, se atribuye a los fructanos otras funciones: confieren tolerancia a la sequía o las temperaturas bajas y contribuyen a mantener el potencial osmótico de las

células, participan en la estabilización de las membranas, proporcionan C y energía en tejidos no fotosintéticos, actúan como antioxidantes y moléculas señal, etc. (Vijn & Smeekens, 1999; Kawakami *et al.*, 2005; Valluru & van den Ende, 2008; Xue *et al.*, 2011; van den Ende, 2013).

1.3.6.4. Trehalosa

La trehalosa es un disacárido soluble compuesto por dos glucosas, cuya síntesis tiene lugar por condensación de la UDP-glucosa y la G6P para formar la T6P en la reacción catalizada por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS, EC 2.4.1.15) (Paul *et al.*, 2008; Tsai & Gazzarrini, 2014) (Fig. 1.3.6.4a). En un paso posterior, la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP, EC 3.1.3.12) desfosforila la T6P para generar trehalosa y P_i. El metabolismo de la trehalosa incluye su hidrólisis por acción de la trehalasa (TRE, EC 3.2.1.28) para dar lugar a dos moléculas de glucosa (Paul *et al.*, 2008).

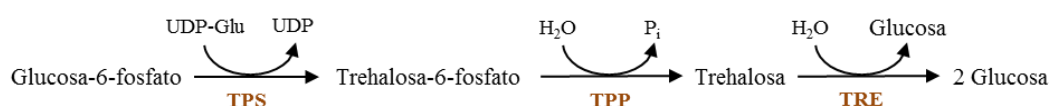


Fig. 1.3.6.4a. Metabolismo de la trehalosa. Esquema basado en Paul *et al.* (2008) y Tsai & Gazzarrini (2014). TPS, trehalosa-6-fosfato sintasa; TPP, trehalosa-6-fosfato fosfatasa; TRE, trehalasa.

La trehalosa es utilizada por la planta como fuente de energía, carbohidrato de transporte y almacenamiento, y parece desempeñar un papel importante como compuesto señalizador (Paul *et al.*, 2008; Tsai & Gazzarrini, 2014). La mayoría de las plantas contienen pequeñas cantidades de trehalosa (El-Bashiti *et al.*, 2005), excepto las conocidas comúnmente como “plantas de resurrección” que acumulan cantidades importantes. En dichas plantas, la trehalosa actúa como osmoprotector previniendo la desnaturalización de proteínas y contribuyendo al mantenimiento de la integridad de las membranas en condiciones de extrema desecación (El-Bashiti *et al.*, 2005). Investigaciones recientes muestran evidencias del papel señalizador en plantas de un intermediario de la biosíntesis de trehalosa, la T6P (El-Bashiti *et al.*, 2005). Aun cuando su función exacta *in vivo* es desconocida, se ha descrito su participación en diferentes procesos tales como el desarrollo embrionógico y vegetativo, la floración, la diferenciación meristemática y la especificación celular (Tsai & Gazzarrini, 2014). Los niveles de T6P parecen estar correlacionados con los de otros azúcares, indirectamente con los de glucosa y fructosa o bien directamente con los de sacarosa (Lunn *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2014), cuyos aumentos se acompañan de un incremento de T6P que promueve el crecimiento y desarrollo (Tsai & Gazzarrini, 2014). Existen evidencias de la relación entre la T6P y la señalización por nutrientes, ya que la expresión de los genes que codifican la TPS y TPP responden a cambios en la disponibilidad de azúcares (Tsai & Gazzarrini, 2014) y a la deficiencia de NO₃⁻ y readición de dicho nutriente (Wang *et al.*, 2003). Estas respuestas están relacionadas con cambios en el contenido de sacarosa (Yadav *et al.*, 2014). Aunque se desconoce el mecanismo de actuación de la T6P, se ha mostrado que inhibe la actividad SnRK1 (“SNF1-related protein kinase-1”), una serina/treonina proteína quinasa que controla la distribución de C en la planta al regular la activación y expresión de un número todavía indeterminado de proteínas y genes, respectivamente (véase Fig. 1.5.2a). La SnRK1 se activa por una deficiencia de energía o azúcares, lo cual inhibe el crecimiento y permite conservar la energía para la supervivencia de la célula (Tsai & Gazzarrini, 2014). Además, se ha mostrado que la SnRK1 regula la fosforilación de algunas TPS de *Arabidopsis*, indicativo de una

regulación por retroalimentación entre la T6P y SnRK1 (Tsai & Gazzarrini, 2014; Yadav *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la T6P está implicada en la ruta de transducción de señal mediada por sacarosa que conduce a la activación redox dependiente de Trx de la AGPasa, desempeñando un papel importante en el control del flujo a través de la ruta de síntesis de almidón (Lunn *et al.*, 2006). La expresión de los genes *AtTPS* y *AtTPP* está sujeta a una regulación diurna modulada por la luz, los azúcares, el NO_3^- y las CKs (Paul *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2014).

1.3.7. Respiración

1.3.7.1. Glicólisis

La respiración es un proceso complejo que permite la liberación de la energía almacenada en compuestos carbonados y la provisión de intermediarios metabólicos para diferentes rutas biosintéticas. Comienza con la glicólisis, cuya principal función es la degradación de glucosa y otros monosacáridos hasta piruvato para la obtención de energía en forma de ATP y poder reductor en forma de NADH (Plaxton, 1996; Taiz & Zeiger, 2010). Alternativamente, el proceso que conduce a la síntesis de glucosa a partir de compuestos orgánicos no glucídicos se conoce como gluconeogénesis. En la glicólisis, los carbohidratos generados a partir de sacarosa por hidrólisis mediada por invertasas (glucosa y fructosa) o sacarosa sintasa (fructosa y UDP-glucosa) son transformados en hexosas fosfato (HPs) por la HXK (EC 2.7.1.1), a excepción de la UDP-glucosa que requiere la acción de la UGPasa y la PGM (Fig. 1.3.7.1a). La HXK cataliza la fosforilación no sólo de glucosa y fructosa sino también de otras hexosas como galactosa y manosa, además de actuar como sensor de la cantidad de azúcares en las células (Jang *et al.*, 1997; Smeekens, 2000; Sun *et al.*, 2006), regulando la expresión génica (véase apartado 1.5.2, Fig. 1.5.2a). Posteriormente, las HPs son transformadas en TP_s mediante la fosfofructoquinasa dependiente de PP_i (PFP, EC 2.7.1.90), que cataliza la conversión reversible de la F6P en FB_s usando como donador de fosfato el PP_i, o bien por la fosfofructoquinasa dependiente de ATP (PFK, EC 2.7.1.11), que a diferencia de la PFP cataliza una reacción irreversible con consumo de ATP (Mustroph *et al.*, 2007). La FB_s así generada es transformada por la FBA en TP_s, las cuales pueden también proceder del ciclo de Calvin-Benson (Fig. 1.3.7.1a). Conviene indicar que de la PFP y la PFK se han descrito isoformas citosólicas y plastídicas (Mustroph *et al.*, 2007).

El proceso continúa con la conversión del GAP en 3PGA en dos reacciones consecutivas catalizadas por los enzimas GAPDH o GAPN y PGK (Fig. 1.3.7.1a). A continuación, la fosfoglicerato mutasa (PGAM, EC 5.4.2.11) cataliza la conversión reversible del 3PGA en 2-fosfoglicerato (2PGA) (Zhao & Assmann, 2011) que, por acción de la enolasa o 2-fosfoglicerato deshidratasa (ENO, EC 4.2.1.11), es transformado en PEP (Sharma *et al.*, 2013). En un último paso catalizado por la piruvato quinasa (PK, EC 2.7.1.40), el PEP junto con ADP produce piruvato y ATP en presencia de los cationes Mg^{2+} , Mn^{2+} y K^+ (Ambasht & Kayastha, 2002; Zhang *et al.*, 2012). De dicho enzima se han descrito dos isoformas, una citosólica que desempeña un papel clave en la integración del metabolismo del C y la energía, y otra plastídica involucrada en la síntesis de ácidos grasos (Ambasht & Kayastha, 2002; Zhang *et al.*, 2012). Además, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) cataliza la carboxilación del PEP utilizando HCO_3^- para producir oxaloacetato (OAA) y P_i (González *et al.*, 2002). La PEPC permite el reabastecimiento de intermediarios al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), bien como OAA o como malato previa conversión catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.82). El suministro de esqueletos carbonados al ciclo TCA tiene lugar en paralelo por la PEPC y PK, aunque en la mayoría de tejidos predomina este último (Taiz & Zeiger, 2010).

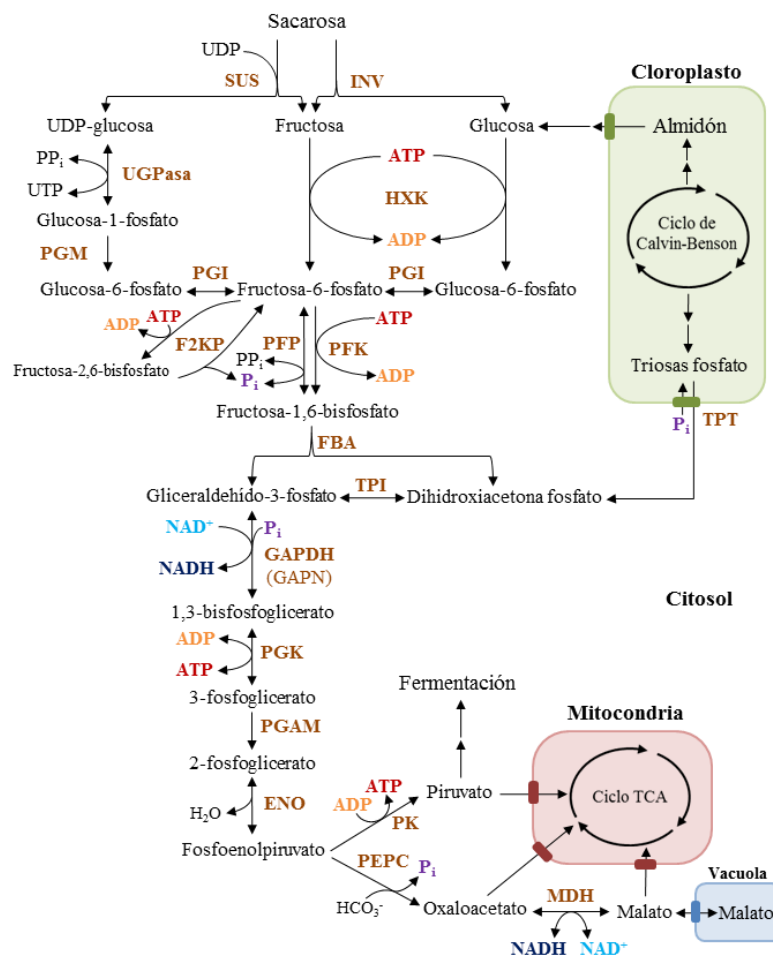


Fig. 1.3.7.1a. Glicólisis. Esquema basado en Nielsen *et al.* (2004) y Taiz & Zeiger (2010). SUS, sacarosa sintasa; INV, invertasa citosólica; UGPasa, UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa; HXK, hexoquinasa; PGM, fosfoglucomutasa; PGI, fosfoglucomutasa; F2KP, fructosa-2,6-bisfosfatasa; PFP, fosfofructoquinasa dependiente de PP_i; PFK, fosfofructoquinasa dependiente de ATP; FBA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; TPT, translocador de triosas fosfato; TPI, triosa fosfato isomerasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GAPN, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante; PGK, fosfoglicerato quinasa; PGAM, fosfoglicerato mutasa; ENO, enolasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; PK, piruvato quinasa.

La glicólisis opera en función de los niveles de intermediarios y es inducida por un aumento de expresión de los genes que codifican los enzimas que participan en ella (Taiz & Zeiger, 2010). Los principales puntos de regulación de la ruta parecen ser aquellos catalizados por la HXK, la fosfofructoquinasa y la PK (Plaxton, 1996; Ambasth & Kayastha, 2002; Zhang *et al.*, 2012). Varios de los enzimas están sujetos a una importante regulación alostérica mediada por metabolitos. Así, el PEP inhibe a la PFK y el P_i contrarresta dicho efecto (Taiz & Zeiger, 2010), mientras que la PFP es inducida por la F2,6BP (Plaxton, 1996) y la PFK es insensible (Mustroph *et al.*, 2007). Este último metabolito contribuye a la distribución de azúcares entre la respiración y la biosíntesis de sacarosa y almidón (Nielsen *et al.*, 2004; Taiz & Zeiger, 2010), ya que no sólo modula la PFP sino también la FBPasa citosólica como hemos mencionado anteriormente (apartado 1.3.4). Los niveles de F2,6BP dependen de un enzima bifuncional que cataliza su síntesis y degradación, la fructosa-6-fosfato-2-quinasa y la fructosa-2,6-bisfosfatasa, respectivamente (F2KP, EC 2.7.1.105 y EC 3.1.3.46) (Nielsen *et al.*, 2004), sujeto también a una compleja regulación alostérica. Mientras que la actividad fructosa-6-fosfato-2-quinasa es inducida por P_i, F6P y piruvato e inhibida por PEP, 3PGA, DHAP, 2PGA y PP_i; la fructosa-2,6-bisfosfatasa es inhibida por P_i, F6P, 6-fosfogluconato y FBP (Nielsen *et al.*, 2004).

Otros metabolitos como el ATP, la glucosa, la asparagina (Asn) y el citrato, entre otros, regulan la PK, cuya actividad depende de otros procesos como la fosforilación y ubiquitinación (Ambasht & Kayastha, 2002; Zhang *et al.*, 2012). Finalmente, la actividad PEPC es disminuida por malato e incrementada por G6P (González *et al.*, 2002).

1.3.7.2. Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato

En el OPPP tiene lugar la oxidación de azúcares para generar poder reductor (NADPH) e intermediarios metabólicos para varios procesos biosintéticos (Kruger & von Schaewen, 2003). En tejidos no fotosintéticos, el OPPP constituye la principal fuente de NADPH para la síntesis de ácidos grasos y la asimilación de N inorgánico (Kruger & von Schaewen, 2003). Además, protege frente al estrés oxidativo por mantenimiento del potencial redox y proporciona esqueletos carbonados, como la R5P y la E4P, para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos aromáticos, fenilpropanoides, lignina, etc. (Kopriva *et al.*, 2000; Kruger & von Schaewen, 2003). La primera secuencia de reacciones del ciclo comprende la oxidación de la G6P en Ru5P (Fig. 1.3.7.2a), que conlleva la pérdida de una molécula de CO₂ y la generación de dos moléculas de NADPH (Taiz & Zeiger, 2010). El resto del ciclo implica la conversión de la Ru5P en GAP y F6P, los intermediarios de la glicólisis que pueden ser utilizados para producir piruvato (Taiz & Zeiger, 2010). Los enzimas implicados en esta ruta se encuentran en el citosol y los plastos, por lo que parece que el ciclo puede tener lugar en ambos compartimentos (Kopriva *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos enzimas del citosol no han sido identificados, pero su carencia podría ser compensada por el transporte de intermediarios desde los plastos (Kruger & von Schaewen, 2003).

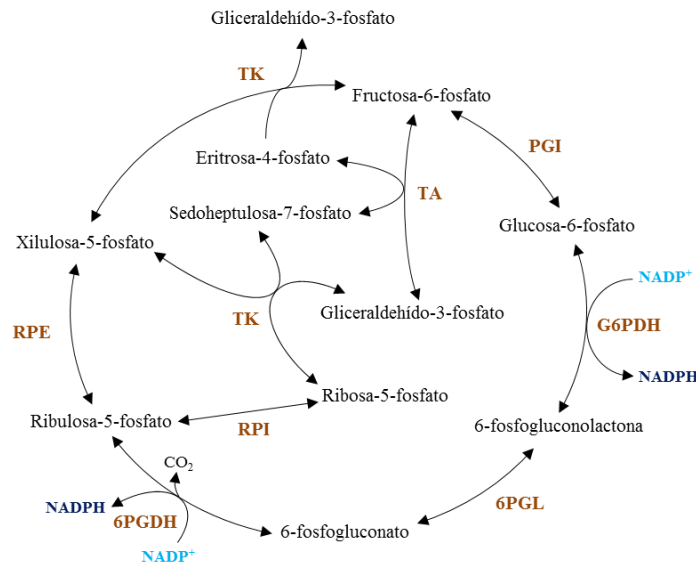


Fig. 1.3.7.2a. Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato. Esquema basado en Kruger & von Schaewen (2003) y Taiz & Zeiger (2010). G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 6PGL, 6-fosfogluconolactonasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; RPI, ribosa-5-fosfato isomerasa; RPE, ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; TK, transquetolasa; TA, transaldolasa.

El paso clave de ésta ruta es el catalizado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49), enzima que se inactiva en la luz por una reducción mediada por las Trx y por una razón alta NADPH:NADP⁺ (Née *et al.*, 2009). La actividad del OPPP del cloroplasto, que predomina sobre el

citoplásmico, se inhibe durante el fotoperíodo coincidiendo con la provisión de NADPH procedente de la CTEF (Née *et al.*, 2009). De este modo, las Trx regulan de forma opuesta los enzimas del ciclo de Calvin-Benson y la G6PDH (véase apartado 1.3.4), lo cual asegura una separación temporal eficiente del anabolismo y el catabolismo durante el día y la noche, respectivamente. En tejidos no fotosintéticos, la G6PDH parece ser menos sensible a la inactivación por dichos mecanismos (Taiz & Zeiger, 2010).

1.3.7.3. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos

El ciclo TCA, también conocido como ciclo del ácido cítrico o de Krebs (Fig. 1.3.7.3a), utiliza los intermediarios metabólicos de la glicólisis para la producción de energía y poder reductor junto a la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM) (Ferne *et al.*, 2004). El proceso tiene lugar en la matriz mitocondrial, por lo que los productos de la glicólisis, especialmente el piruvato, son transportados a su interior por una serie de transportadores (Ferne *et al.*, 2004). Antes de entrar al ciclo TCA, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa dando lugar al acetyl-CoA, CO₂ y NADH catalizado por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDC) (Millar *et al.*, 1998; Marillia *et al.*, 2003; Ferne *et al.*, 2004). Este complejo se encuentra presente en la matriz mitocondrial o en el estroma del cloroplasto, y consta de tres componentes: la piruvato deshidrogenasa (PDH-E1, EC 1.2.4.1), la dihidrolipoamida transacetilasa (E2, EC 2.3.1.12) y la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3, EC 1.8.1.4). El enzima E1 contiene dos subunidades, α y β , mientras que el E2 y E3 sólo una (Millar *et al.*, 1998). A continuación, el grupo acetyl del acetyl-CoA se transfiere al OAA y genera el citrato, reacción catalizada por la citrato sintasa (CS, EC 2.3.3.1) (Han *et al.*, 2009). De la CS existen otras isoformas en el citosol y el peroxisoma que participan en la β -oxidación de los ácidos grasos, la fotorrespiración y la quelación de iones tóxicos (Han *et al.*, 2009). El citrato se isomeriza a isocitrato por acción de la aconitasa (ACO, EC 4.2.1.3) y sufre una descarboxilación oxidativa catalizada por la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD (IDH, EC 1.1.1.41) y el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDC), que permite la liberación de CO₂ y la formación de NADH, respectivamente. En la primera reacción se forma 2-oxoglutarato, que bien puede continuar su transformación en el ciclo o bien ser exportado a los plastos para sintetizar Glu en el ciclo GS/GOGAT (Lemaitre *et al.*, 2007). En la segunda reacción, se forma succinil-CoA mediante la acción de tres enzimas que forman el complejo OGDC:2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDC-E1, EC 1.2.4.2), dihidrolipoamida succinil-transferasa (E2, EC 2.3.1.61) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3, EC 1.8.1.4) (Millar *et al.*, 1999). El succinil-CoA es oxidado hasta OAA en varias reacciones enzimáticas consecutivas que cierran el ciclo TCA y generan ATP, FADH₂ y NADH (Fig. 1.3.7.3a).

El complejo PDC actúa como nexo de unión entre la glicólisis y el ciclo TCA (Millar *et al.*, 1998; Marillia *et al.*, 2003) y se considera un paso crucial en la regulación del propio ciclo (Ferne *et al.*, 2004). Es sensible a la regulación por retroalimentación de productos como el NADH y el acetyl-CoA (Marillia *et al.*, 2003; Lemaitre *et al.*, 2007), y la isoforma mitocondrial es la única que puede inactivarse por fosforilación de la subunidad E1 α en la luz (Lemaitre *et al.*, 2007). Tanto la IDH como la ACO presentan isoformas en el citosol, siendo la isoforma citoplásmica de IDH dependiente de NADP en vez de NAD (ICDH, EC 1.1.1.42) (Lemaitre *et al.*, 2007). Esta ICDH se encuentra también presente en la mitocondria y los peroxisomas (Lancien *et al.*, 1999). La IDH posee una baja actividad y está sujeta a regulación mediada por metabolitos como NADH, AMP y ADP (Lemaitre *et al.*, 2007), siendo inactivada por una elevada razón NAD(P)H:NAD(P) durante el fotoperíodo (Ferne *et al.*, 2004). Ferne *et al.* (2004) propusieron que la ACO y la IDH contribuyen al mantenimiento de los

niveles de 2-oxoglutarato, el cual proporciona esqueletos carbonados para la asimilación del N (Ferne *et al.*, 2004). La expresión de los genes de los enzimas de la ruta está sujeta a pequeñas oscilaciones diurnas, por lo que la regulación post-traducciona puede ser un factor relevante en el control del ciclo (Lemaitre *et al.*, 2007).

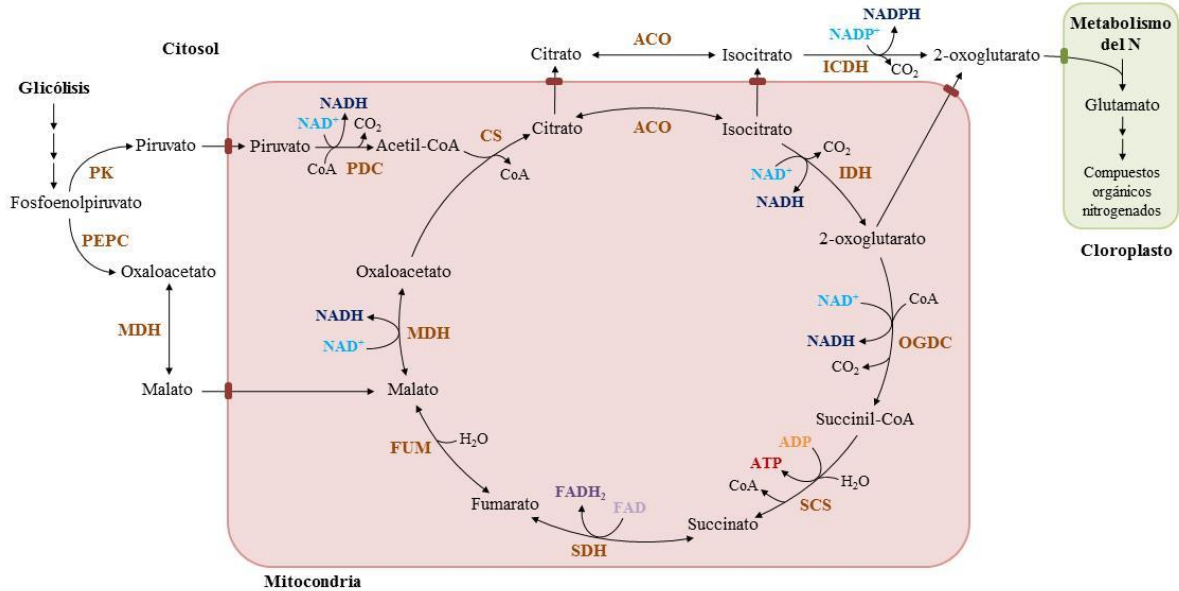


Fig. 1.3.7.3a. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esquema basado en Taiz & Zeiger (2010). PK, piruvato quinasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; CS, citrato sintasa; ACO, aconitasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD; ICDH, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP; OGDC, complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa; SCS, succinil-CoA sintetasa; SDH, succinato deshidrogenasa; FUM, fumarasa.

1.3.7.4. Transporte electrónico mitocondrial

Finalmente, el poder reductor generado en el ciclo TCA (NADH y FADH_2) es utilizado para producir energía en forma de ATP en el proceso de fosforilación oxidativa dependiente de O_2 , que tiene lugar en la membrana interna mitocondrial (Ferne *et al.*, 2004). El NADH y el FADH_2 son oxidados en la CTEM, que consta de varios transportadores que transfieren los electrones a favor de un gradiente electroquímico hasta el aceptor final, el O_2 , produciéndose H_2O . Las proteínas transportadoras se agrupan en cuatro complejos transmembrana multiproteicos: complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo bc_1) y complejo IV (citocromo c oxidasa) (Taiz & Zeiger, 2010). Los complejos I, III y IV participan en el bombeo de protones de la matriz al espacio intermembranoso y la transferencia de electrones a través de estos complejos al O_2 , proceso que está acoplado a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i por medio de una ATPasa (complejo V) (Taiz & Zeiger, 2010) similar a la descrita en la CTEF (véase apartado 1.3.3). Existen otros componentes enzimáticos unidos a la superficie de la membrana interna que no bombean protones, como las NAD(P)H deshidrogenasas y una oxidasa alternativa (Ferne *et al.*, 2004).

1.4. Asimilación de nitrógeno

El N es un nutriente inorgánico esencial para el crecimiento y la producción de biomasa de las plantas, cuyo contenido en materia seca oscila entre el 1 y el 5% (Hawkesford *et al.*, 2012). Es un constituyente fundamental de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, clorofilas, cofactores, fitohormonas y metabolitos secundarios, entre otros, y afecta a todas las funciones de la planta (Stitt & Krapp, 1999; Hawkesford *et al.*, 2012). Las diferentes especies vegetales, entre ellas el trigo, adquieren el N del medio, lo incorporan en compuestos orgánicos nitrogenados (Fig. 1.4a) y ajustan el desarrollo y el metabolismo a las concentraciones de N externas e internas (Castaings *et al.*, 2011) gracias a una serie de procesos como la absorción, la asimilación, el transporte y la removilización (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

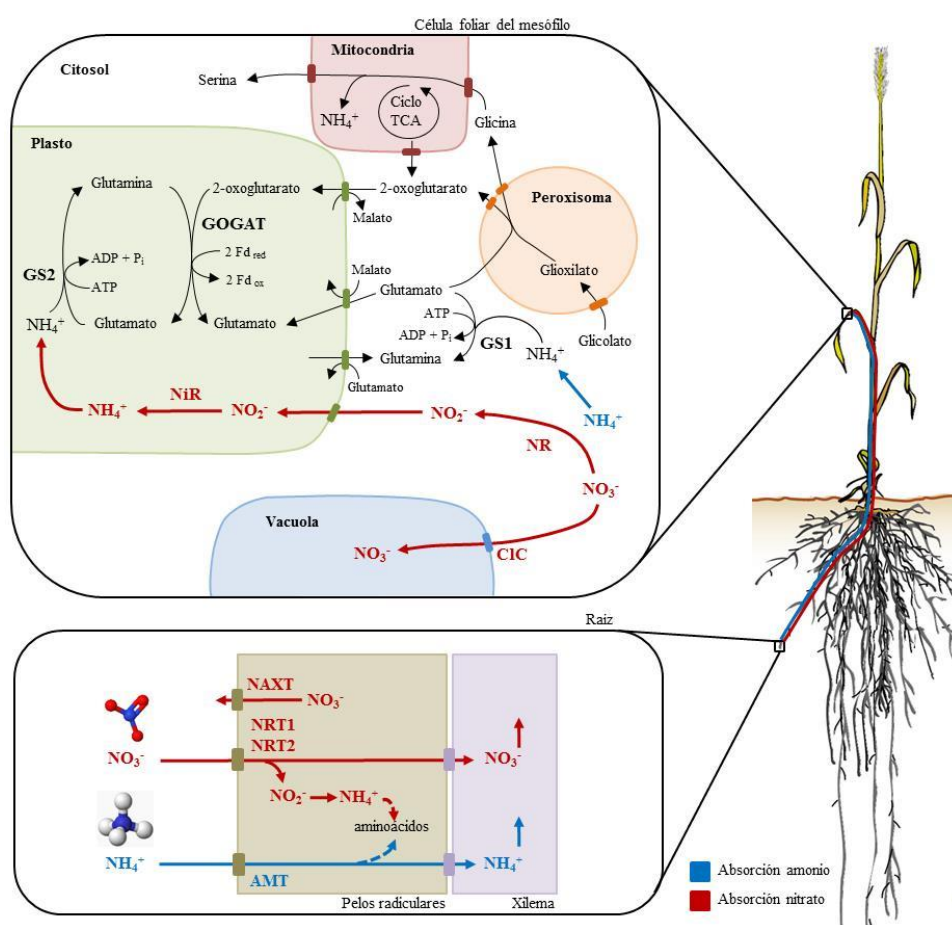


Fig. 1.4a. Metabolismo primario del nitrógeno: absorción y asimilación del nitrato y amonio del suelo. Esquema basado en Arsova *et al.* (2012) y Hawkesford *et al.* (2012). NRT, transportador de nitrato; AMT, transportador de amonio; NR, nitrato reductasa; NiR, nitrito reductasa; GS, glutamina sintasa; GOGAT, glutamato sintasa.

1.4.1. Absorción y transporte de nitrógeno del suelo

El N es cuantitativamente el nutriente inorgánico más importante para las plantas y su demanda mayor que la de ningún otro elemento mineral (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Ese mayor requerimiento se refleja en la gran cantidad de N invertido en Rubisco, cuyo contenido fluctúa durante el ciclo de vida de la

planta (Evans, 1983; Vicente *et al.*, 2011). Por ello, la disponibilidad de N constituye el principal factor nutricional limitante de la productividad de los cultivos agrícolas (Crawford, 1995). La mayoría de las especies vegetales absorben el N mineral existente en el suelo por medio del sistema radicular, por lo general, a partir de formas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) y, excepcionalmente, de formas orgánicas (Crawford, 1995; Dechorgnat *et al.*, 2011), aunque las leguminosas pueden fijar el N_2 atmosférico por simbiosis con bacterias. En suelos agrícolas aireados, el NO_3^- es la forma de N predominante con concentraciones que varían en un rango de μM -20 mM con respecto a 20-200 μM para el NH_4^+ (Dechorgnat *et al.*, 2011; Hawkesford *et al.*, 2012). Para adaptarse a la variabilidad en la disponibilidad de N en el medio, las plantas han desarrollado mecanismos específicos que incluyen cambios en la arquitectura de la raíz y diferentes sistemas de transportadores. En concreto, un sistema de transporte de alta afinidad (HATS, “High-Affinity Transport Systems”) que funciona a concentraciones externas de NO_3^- o NH_4^+ inferiores a 0,5-1 mM, y un sistema de transporte de baja afinidad (LATS, “Low-Affinity Transport Systems”) que funciona a concentraciones superiores (Crawford, 1995; Dechorgnat *et al.*, 2011; Hawkesford *et al.*, 2012). De ambos sistemas se han mostrado componentes constitutivos e inducibles por NO_3^- (Glass *et al.*, 2002).

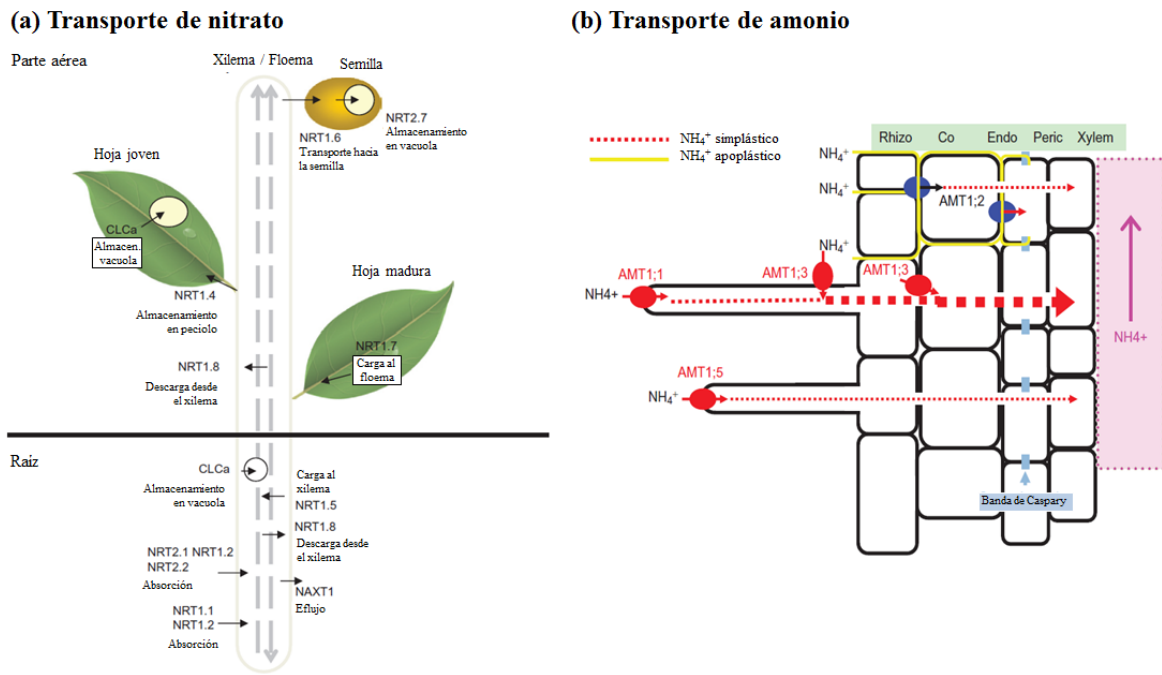


Fig. 1.4.1a. Sistema de absorción y transporte de (a) nitrato (Dechorgnat *et al.*, 2011) y (b) amonio (Yuan *et al.*, 2007) en plantas de Arabidopsis.

La absorción de NO_3^- del suelo a través de la membrana plasmática de las raíces tiene lugar por medio de proteínas transportadoras NRT1 y NRT2. Éstas realizan un simporte de NO_3^- y protones al interior celular que requiere el consumo de ATP para que la bomba de protones H^+ -ATPasa mantenga el gradiente de la membrana (Crawford, 1995; Forde, 2000). En plantas superiores, la familia de transportadores NRT1 pertenecen a LATS y la familia NRT2 a HATS (Tsay *et al.*, 2007). En Arabidopsis, el transportador AtNRT1.1 se expresa en el ápice de la raíz (Fig. 1.4.1a), actuando como transportador de NO_3^- (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014) y sensor de NO_3^- al activar la expresión de genes relacionados con dicho nutriente (Dechorgnat *et al.*, 2011). Está también involucrado en procesos de señalización que inducen cambios en el desarrollo radicular, la

germinación y en la represión del crecimiento de raíces laterales cuando el NO_3^- es deficiente (Dechorgnat *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014). Se ha mostrado que la misma proteína AtNRT1.1 es un transportador LATS y HATS, y que la fosforilación-desfosforilación de una treonina es responsable del cambio de baja a alta afinidad (Tsay *et al.*, 2007; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014). El transportador AtNRT1.2 de baja afinidad se expresa en el ápice y en las regiones maduras de la raíz y, a diferencia del AtNRT1.1, los transcritos del gen se acumulan sin exposición previa al NO_3^- por tratarse de un componente constitutivo (Tsay *et al.*, 2007; Dechorgnat *et al.*, 2011). Los transportadores AtNRT2.1 y AtNRT2.2 actúan en la absorción de alta afinidad de NO_3^- , aunque mayoritariamente es llevada a cabo por AtNRT2.1 (Li *et al.*, 2007b), cuya expresión es inducida por NO_3^- y azúcares, e inhibida por glutamina (Gln) y CKs (Krapp *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2007b; Dechorgnat *et al.*, 2011; Kiba *et al.*, 2011). La forma activa de los transportadores AtNRT2 se consigue tras su asociación con los componentes NAR2, también denominados NRT3 (Orsel *et al.*, 2006). La absorción neta de NO_3^- en la planta representa la diferencia entre la absorción activa descrita anteriormente y el eflujo pasivo, que supone un gasto energético para la planta y se desconoce su papel fisiológico. El eflujo se produce de forma pasiva a favor de gradiente cuando la $[\text{NO}_3^-]$ es baja mediante transportadores de la familia NRT1, de los que se ha caracterizado el transportador NAXT1 en *Arabidopsis* (Segonzac *et al.*, 2007).

El NO_3^- , además de un macronutriente esencial, es una molécula señal que modula muchos aspectos del metabolismo, la morfología, el crecimiento y la diferenciación de la planta (Scheible *et al.*, 1997a; Kaiser & Huber, 2001). Las concentraciones altas de NO_3^- promueven el desarrollo de la parte aérea e inhiben el desarrollo de raíces laterales, mientras que la deficiencia aumenta el crecimiento radicular (Campbell, 1999; Castaings *et al.*, 2011). La adición de NO_3^- induce genes responsables de su absorción (*NRT1.1*, *NRT2.1* y *NAR2*), reducción y asimilación en compuestos orgánicos nitrogenados, junto a otros involucrados en la síntesis de ácidos orgánicos, el metabolismo del C y la provisión de poder reductor, entre otros (Scheible *et al.*, 2004; Dechorgnat *et al.*, 2011). La absorción puede, a su vez, ser inhibida por retroalimentación negativa mediada por intermediarios del metabolismo posterior de dicho nutriente que sirven de señales del estado nitrogenado de la planta, como la Gln (Dechorgnat *et al.*, 2011; Hawkesford *et al.*, 2012). Después de su absorción en la raíz, el NO_3^- pasa del simplasto al apoplasto del xilema y es translocado a la parte aérea a través de la corriente de transpiración (Hawkesford *et al.*, 2012), y distribuido en la planta por medio de otros transportadores (Fig. 1.4.1a). En la célula, el NO_3^- citosólico (1-6 mM) puede almacenarse temporalmente en la vacuola (5-75 mM) y actuar como depósito transitorio hasta que sea requerido (Wege *et al.*, 2010; Hawkesford *et al.*, 2012). El NO_3^- también puede encontrarse en el cloroplasto (Hawkesford *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, se ha identificado una familia de canales de cloro involucrados en el transporte de NO_3^-/H^+ que se encuentran asociados a la H^+ -ATPasa vacuolar a través del tonoplasto (AtCLC-a, -b y -c), o bien asociados al aparato de Golgi, al cloroplasto o a las vesículas de Golgi (AtCLC-d, -e y -f, respectivamente) (de Angeli *et al.*, 2007; Wege *et al.*, 2010; Dechorgnat *et al.*, 2011).

La absorción del NH_4^+ del suelo está mediada por una familia de transportadores AMT, que incluye la subfamilia AMT1, que transporta NH_4^+ vía transporte uniporte de NH_4^+ o simporte de NH_3/H^+ , y la subfamilia AMT2 (Hawkesford *et al.*, 2012) (Fig. 1.4.1a). De esta última sólo se ha identificado el transportador AtAMT2;1 en *Arabidopsis* (Yuan *et al.*, 2007), que parece estar relacionado con el transporte de NH_3 y no con la absorción (Neuhäuser *et al.*, 2009). La expresión de los genes *AMT* aumenta con deficiencia de dicho nutriente o abundancia de azúcares, y se reduce cuando se suministra NH_4^+ . Dicha regulación transcripcional parece estar mediada por la concentración local de NH_4^+ o Gln (Loqué & von Wirén, 2004; Yuan *et al.*, 2007; Hawkesford *et al.*, 2012), y así evitar el

daño celular que podría causar la acumulación de NH_4^+ (Loqué & von Wirén, 2004). El NH_4^+ absorbido bien puede ser asimilado en la raíz o acumularse en la vacuola, o bien ser transportado a la parte aérea para ser asimilado, para lo que previsiblemente existan transportadores todavía desconocidos (Hawkesford *et al.*, 2012).

1.4.2. Reducción de nitrato a amonio

La asimilación de NO_3^- en compuestos orgánicos nitrogenados requiere la reducción previa del NO_3^- absorbido por la raíz a NH_4^+ (Nunes-Nesi *et al.*, 2010; Hawkesford *et al.*, 2012), que bien puede tener lugar directamente en la raíz o en las hojas después de que el NO_3^- sea transportado a la parte aérea. En plantas, hongos y bacterias, el proceso se inicia con la reducción del NO_3^- a nitrito (NO_2^-) en el citosol (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Dechorgnat *et al.*, 2011):



Esta reacción es catalizada por la NR, de la que se han descrito tres tipos: una dependiente de NADH que se encuentra en algas y plantas (EC 1.7.1.1), otra dependiente de NADPH en hongos (EC 1.7.1.3), y una última biespecífica dependiente de ambos en plantas superiores, algas y hongos (EC 1.7.1.2) (Kilian *et al.*, 1992; Campbell, 1999). Durante la catálisis, se transfieren dos electrones desde el NAD(P)H al NO_3^- para producir NO_2^- (Kaiser *et al.*, 2002; Lambeck *et al.*, 2012). La NR también puede catalizar la transferencia de un electrón del NAD(P)H al NO_2^- y producir óxido nítrico, o bien al O_2 y producir anión superóxido (Kaiser *et al.*, 2002). Se trata de un homodímero y cada monómero contiene tres grupos prostéticos o dominios estructurales unidos covalentemente entre sí por bisagras hidrófilas: el dominio FAD en el extremo C-terminal, el dominio del citocromo b de unión del Fe-hemo (Fe-hemo) y un cofactor de molibdeno (MoCo) en el extremo N-terminal (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Hawkesford *et al.*, 2012; Lambeck *et al.*, 2012) (Fig. 1.4.2a). La estructura dimérica se conforma a partir del cofactor de molibdeno (Campbell, 1999). La NR está codificada por dos tipos de genes, los genes *NIA* que codifican el apoenzima y los *Cnx* que codifican el cofactor MoCo, los cuales se expresan tanto en las células epidérmicas y corticales de la raíz como en las células del mesófilo de la parte aérea (Crawford, 1995; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). En trigo, aunque sólo existe una secuencia disponible en *T. monococcum*, se sabe que la NADH-NR tiene secuencias duplicadas en los genomas A, B y D que se localizan en distinto lugar que la NAD(P)H-NR (Kilian *et al.*, 1992). Dependiendo del lugar donde se produzca la reducción de NO_3^- influirá en la economía energética de la planta, siendo más costosa en las raíces que en las hojas (Hawkesford *et al.*, 2012). El poder reductor necesario proviene de la fotosíntesis en las hojas y de la oxidación de carbohidratos en órganos no fotosintéticos como las raíces (Pallardy, 2008).

La NR se considera el enzima clave limitante de la asimilación de N y está sujeta a distintos niveles de regulación: síntesis del enzima, degradación, inactivación reversible, regulación por efectores y concentración del sustrato (Campbell, 1999; Hawkesford *et al.*, 2012) (Fig. 1.4.2a). Este elevado grado de regulación permite adecuar la biosíntesis de aminoácidos con el aporte de esqueletos carbonados suministrado por la fotosíntesis y previene la acumulación de NO_2^- durante la noche, tóxico para la célula (Kaiser & Huber, 2001; Hawkesford *et al.*, 2012). La regulación a nivel transcripcional de la NR muestra que la luz induce la síntesis *de novo* de la proteína (Cheng *et al.*, 1992; Lea *et al.*, 2006; Rolland *et al.*, 2006), que el NO_3^- es un potente inductor de su expresión (Scheible *et al.*, 1997a; Scheible *et al.*, 2004), al igual que azúcares como la fructosa, la glucosa y la

sacarosa (Cheng *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993; Rolland *et al.*, 2006) y las CKs (Crawford, 1995; Hawkesford *et al.*, 2012). Mientras que la Gln disminuye la expresión de los genes que codifican dicha proteína (Vincentz *et al.*, 1993; Krapp *et al.*, 1998; Lea *et al.*, 2006). Klein *et al.* (2000) mostraron que existe una concentración umbral crítica de carbohidratos para la expresión de la NR. La luz se ha mostrado que activa la NR tanto a nivel transcripcional como post-traduccionally por desfosforilación de un residuo de Ser de la proteína (Smeeckens, 2000; Kaiser *et al.*, 2002; Lambeck *et al.*, 2012), cuya fosforilación en la oscuridad conlleva la inactivación del enzima (Fig. 1.4.2a). El estado de inactivación de la NR refleja los efectos post-traduccionales y la cantidad de proteína que se encuentra no fosforilada gracias a la acción de una fosfatasa del tipo 2A (PP2A) (Kaiser & Huber, 2001). Mientras que la inactivación implica la fosforilación del enzima por proteínas quinasas (se activan por Ca^{2+} e inhiben por G6P y TP), pertenecientes a la familia CDPK dependientes de calcio o del tipo SnRK1, y la posterior unión de una proteína del grupo 14-3-3 en presencia de Mg^{2+} (Smeeckens, 2000; Kaiser & Huber, 2001; Kaiser *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006). El anclaje de la proteína 14-3-3 a la NR fosforilada induce un cambio conformacional del enzima que interrumpe el transporte electrónico entre los dominios Fe-hemo y MoCo, y conduce a la pérdida de actividad de la NR (Kaiser & Huber, 2001; Lambeck *et al.*, 2012). La fosforilación y unión de la proteína inhibidora permite la inactivación post-traduccionally y la degradación de la NR en la oscuridad o cuando los azúcares son bajos (Kaiser & Huber, 2001; Kaiser *et al.*, 2002). Se ha mostrado que la Gln y los carbohidratos modulan la regulación post-traduccionally de la NR, la primera facilita la fosforilación y disminuye la actividad del enzima, y los carbohidratos antagonizan dicho efecto y aumentan la actividad y el estado de activación de la NR (Morcuende *et al.*, 1998).

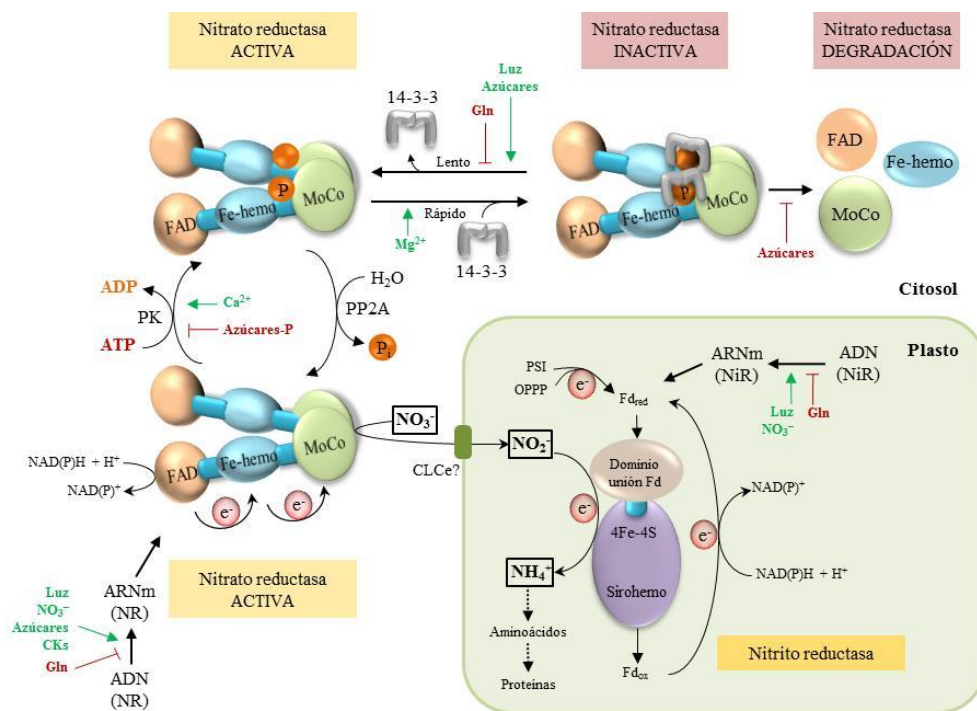
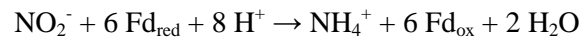


Fig. 1.4.2a. Reducción de nitrato a amonio y regulación de la actividad nitrato reductasa y nitrato reductasa. Esquema basado en Kaiser & Huber (2001), Hawkesford *et al.* (2012) y Lambeck *et al.* (2012). La regulación positiva se muestra con líneas verdes y la negativa con líneas rojas.

Posteriormente, el NO_2^- generado por reducción de NO_3^- es transportado al interior de los cloroplastos en las hojas o de los plastos en otros órganos no fotosintéticos mediante un transportador, que ha sido

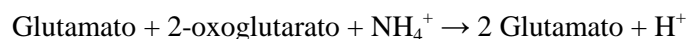
identificado en *Cucumis sativus* y *Arabidopsis* como CsNitr1 y AtCLCe, respectivamente (de Angeli *et al.*, 2007; Dechorgnat *et al.*, 2011). La reducción del NO_2^- a NH_4^+ es catalizada por la nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.7.1) dependiente de Fd (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Dechorgnat *et al.*, 2011):



La NiR es una proteína monomérica que posee dos dominios funcionales: uno de unión de la Fd y otro de unión del NO_2^- con dos grupos prostéticos: una agrupación hierro-azufre (4Fe-4S) y un cofactor sirohemo (Lancien *et al.*, 2006; Hawkesford *et al.*, 2012) (Fig. 1.4.2a). El donador de electrones es la Fd reducida generada en hojas por el PSI (Hawkesford *et al.*, 2012) y en raíces a partir del NADPH producido en el OPPP (Crawford, 1995; Scheible *et al.*, 2004). Los electrones se transfieren a través del NO_2^- por medio del dominio de unión a la Fd, al grupo 4Fe-4S y al cofactor sirohemo (Hawkesford *et al.*, 2012). La NiR es codificada por los genes *Nii* en plantas superiores (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Hawkesford *et al.*, 2012). En trigo se han identificado las isoformas NiR1 y NiR2 (Kutscherra *et al.*, 1987). La luz y el NO_3^- inducen la expresión de los genes *Nii*, mientras que el NH_4^+ y ciertos productos del metabolismo del N como la Gln y la Asn reprimen su expresión (Vincentz *et al.*, 1993; Crawford, 1995; Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004). La actividad y cantidad de proteína NiR disminuye en presencia de NH_4^+ , pero no de NO_3^- (Lancien *et al.*, 2006).

1.4.3. Asimilación de amonio

El NH_4^+ absorbido por la raíz o el generado por reducción del NO_3^- puede ser asimilado en la propia raíz o en las hojas después de ser transportado a la parte aérea, o bien puede acumularse en las vacuolas de dichos órganos (Hawkesford *et al.*, 2012). Se desconoce la proporción de N reducido y asimilado en las raíces u hojas, lo cual parece depender de la especie vegetal, el estadio de desarrollo, la concentración de NO_3^- exógeno y de otros factores (Nunes-Nesi *et al.*, 2010; Hawkesford *et al.*, 2012). El NH_4^+ absorbido por la raíz no suele transportarse a larga distancia y se asimila rápidamente en la propia raíz para evitar su toxicidad (Smart *et al.*, 1998), mientras que el NH_4^+ procedente de la reducción de NO_3^- se asimila mayoritariamente en la parte aérea. El NH_4^+ también se genera en procesos tales como la fotorrespiración, la biosíntesis de lignina, la removilización de N inducida por la senescencia y la fijación de N_2 en leguminosas (Temple *et al.*, 1998; Hawkesford *et al.*, 2012). Los enzimas claves en la asimilación de NH_4^+ , independientemente de su origen y del tejido donde tenga lugar, son la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT; glutamina:2-oxoglutarato aminotransferasa). La actividad de ambas enzimas constituye el ciclo GS/GOGAT (Fig. 1.4.3a) y conlleva la siguiente reacción neta:



La GS (EC 6.3.1.2) cataliza la fijación de NH_4^+ en una molécula de Glu para formar Gln con consumo de ATP (Douce & Neuburger, 1999; Forde & Lea, 2007). Se han descrito varias isoformas del enzima, una citosólica (GS1) que se encuentra en tejidos vasculares de la raíz, hojas maduras y semillas, y otra cloroplástica (GS2) que se localiza en hojas jóvenes fotosintéticamente activas y en menor medida en raíces y otros tejidos (Lancien *et al.*, 2006; Galili *et al.*, 2008). La GS1 está involucrada en la asimilación de NH_4^+ en Gln en las raíces para ser transportada a través del floema a la parte aérea y distribuida por la planta. También participa en la asimilación y reciclado del NH_4^+ generado en

procesos catabólicos, como la removilización de N durante el llenado del grano en cereales (Bernard *et al.*, 2008; Galili *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Existen evidencias de que el aporte exógeno de Glu aumenta la expresión de la GS1 en tabaco (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Por su parte, la GS2 está involucrada en la asimilación primaria de NH_4^+ procedente de la absorción de NO_3^- y NH_4^+ y en la reasimilación de NH_4^+ procedente de la fotorrespiración (Douce & Neuburger, 1999; Igarashi *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). La GS2 se activa a pH alto y concentraciones altas de Mg^{2+} y ATP, comunes en el estroma del cloroplasto de hojas iluminadas (Lancien *et al.*, 2006; Hawkesford *et al.*, 2012). La regulación a nivel transcripcional de la GS2 muestra que los transcritos del gen que codifica la proteína se encuentran bajo control circadiano (Lancien *et al.*, 2006). Además, la expresión aumenta con el aporte de NH_4^+ en arroz y de NO_3^- en tabaco y maíz (Lancien *et al.*, 2006), y disminuye con el aporte de Glu y prolina en tabaco (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Se han identificado cuatro subfamilias génicas de GS en trigo: GS2 (a, b y c) para la cloroplástica, y GS1 (a, b y c), GSr (1 y 2) y GSe (1 y 2) para la citosólica.

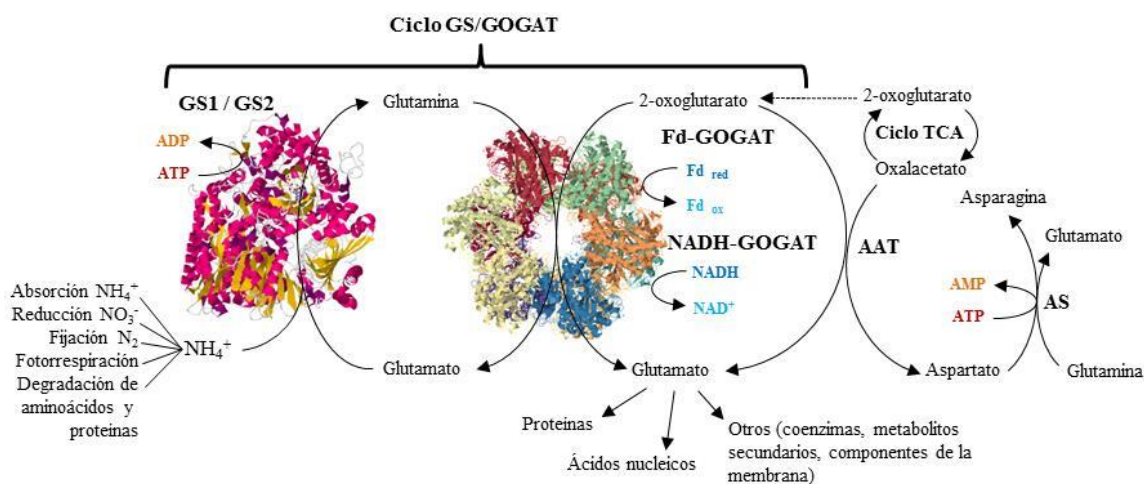
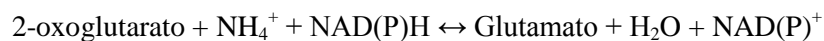


Fig. 1.4.3a. Asimilación de amonio por el ciclo GS/GOGAT. Esquema basado en Andrews *et al.* (2013), Forde & Lea (2007) y Hawkesford *et al.* (2012). Las imágenes 3D de las proteínas se obtuvieron de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

El enzima GOGAT cataliza la transferencia de un grupo amino de la Gln al grupo carboxilo del 2-oxoglutarato para formar dos moléculas de Glu en los plastos (van den Heuvel *et al.*, 2004; Forde & Lea, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Hawkesford *et al.*, 2012). En plantas existen dos tipos diferentes según el donador de electrones que utilicen, bien sea Fd reducida procedente del PSI (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1) o NADH procedente de la respiración (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) (Temple *et al.*, 1998; van den Heuvel *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). La Fd-GOGAT se localiza predominantemente en los cloroplastos de las células de las nervaduras de las hojas, y parece participar en el suministro de Glu para la biosíntesis de aminoácidos durante la fotosíntesis. Su actividad predomina sobre la otra isoforma en *Arabidopsis* (Galili *et al.*, 2008) y aumenta con la adición de NO_3^- y NH_4^+ en maíz (Lancien *et al.*, 2006). Su expresión también aumenta con el aporte de NO_3^- en tabaco (Scheible *et al.*, 1997a). La NADH-GOGAT abunda en plastos de tejidos no fotosintéticos, como raíces y semillas, donde el poder reductor es suministrado por la ruta de las pentosas fosfato (Temple *et al.*, 1998; van den Heuvel *et al.*, 2004; Forde & Lea, 2007; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Su actividad aumenta con la adición de NO_3^- en tabaco (Scheible *et al.*, 1997a), y la expresión es inducida por NO_3^- , NH_4^+ , Gln o Asn en trigo (Lancien *et al.*, 2006). Por tanto, mientras que la abundancia de NO_3^- induce la expresión de estos genes (Temple *et al.*, 1998), la

deficiencia de NO_3^- los reprime, aunque la represión de los genes de la NR y NiR suele ser más acentuada (Lancien *et al.*, 2006).

En hojas de plantas C_3 , el NH_4^+ procedente de la fotorrespiración se libera durante la conversión de Gly a Ser y se reasimila por la GS2 y la Fd-GOGAT en el cloroplasto, proceso conocido como ciclo fotorrespiratorio del N (Igarashi *et al.*, 2006; Nunes-Nesi *et al.*, 2010). El flujo de N en esta ruta es diez veces mayor que la cantidad de N asimilado del suelo (Keys *et al.*, 1978; Igarashi *et al.*, 2006; Jamai *et al.*, 2009). De las moléculas de Glu generadas por la GS/GOGAT, una se utiliza para continuar con la asimilación de NH_4^+ en el propio ciclo y la otra en la biosíntesis posterior de aminoácidos y proteínas (Hawkesford *et al.*, 2012). Se ha mostrado que el Glu actúa como retroinhibidor de la asimilación de NH_4^+ (Stitt *et al.*, 2002; Forde & Lea, 2007) y, aun cuando la concentración de aminoácidos oscila a lo largo del día, la de Glu permanece relativamente constante (Forde & Lea, 2007). El enzima glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2) cataliza la reacción reversible entre 2-oxoglutarato y NH_4^+ para producir Glu dependiente de NAD(P)H (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Forde & Lea, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Grabowska *et al.*, 2011):



La GDH dependiente de NADH se localiza en las mitocondrias de las células acompañantes del floema (Forde & Lea, 2007; Fontaine *et al.*, 2012), aunque se ha detectado en el citoplasma cuando la concentración de NH_4^+ es alta (Fontaine *et al.*, 2012). Inicialmente, se atribuyó a este enzima un papel en la asimilación de NH_4^+ , pero se han mostrado evidencias de que interviene en la liberación de NH_4^+ durante la senescencia foliar (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Hawkesford *et al.*, 2012). Es decir, cataliza la desaminación oxidativa del Glu y suministra esqueletos carbonados como 2-oxoglutarato para la respiración y la fosforilación oxidativa (Fontaine *et al.*, 2012; Hawkesford *et al.*, 2012). Diversos estudios sugieren que la reacción catalizada por la NADH-GDH desempeña un papel importante en el crecimiento y la productividad de las plantas (Grabowska *et al.*, 2011). Se ha caracterizado en algas verdes y en un amplio grupo de plantas una GDH dependiente de NAD(P)H que se localiza en los cloroplastos pero se desconoce su función (Taiz & Zeiger, 2010; Fontaine *et al.*, 2012). La regulación a nivel transcripcional pone de manifiesto que la abundancia de transcritos de la GDH aumenta con el aporte de NH_4^+ , prolina, Gln y Glu (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

1.4.4. Biosíntesis de aminoácidos y compuestos nitrogenados

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo amino y un grupo carboxilo. Representan los productos iniciales de la asimilación del N y participan en la biosíntesis de proteínas y de otros compuestos nitrogenados, y en la respuesta de las plantas a diferentes estreses (Galili *et al.*, 2008). Las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos que necesitan, aunque sólo 20 constituyen las unidades estructurales que conforman las proteínas (Hawkesford *et al.*, 2012). Para la biosíntesis de aminoácidos, los esqueletos carbonados que se requieren provienen de la glicólisis –3PGA, PEP y piruvato– y del ciclo TCA –2-oxoglutarato y OAA–, mientras que las reacciones de transaminación de la Gln y el Glu proporcionan los grupos amino (Lancien *et al.*, 2006; Taiz & Zeiger, 2010) (Fig. 1.4.4a). La aspartato aminotransferasa (AAT, EC 2.6.1.1) cataliza la transaminación reversible del Glu y el OAA en 2-oxoglutarato y aspartato (Asp) (Maciaga & Paszkowski, 2004; Forde & Lea, 2007) (Fig. 1.4.3a). De la AAT se han encontrado diferentes isoformas con múltiples localizaciones en Arabidopsis –citosol, mitocondria, plastos y peroxisomas–,

las cuales intervienen en reacciones de transaminación en dichos orgánulos pero se desconoce aún el papel fisiológico de cada una de ellas (Maciaga & Paszkowski, 2004; Forde & Lea, 2007). En trigo, la actividad aminotransferasa se atribuye principalmente a las isoformas del cloroplasto y citosol (Maciaga & Paszkowski, 2004).

El Asp sirve de precursor de otros aminoácidos como la Asn, la lisina (Lys), la treonina (Thr), la metionina (Met) y la isoleucina (Ile) (Forde & Lea, 2007), cuya biosíntesis depende de la competencia de las distintas ramificaciones de la ruta por el sustrato común aspartato semialdehído y puede inhibirse por los productos de la ruta (Galili *et al.*, 2008) (Fig. 1.4.4a). La asparagina sintetasa (AS, EC 6.3.5.4) cataliza la transferencia del grupo amino de la Gln al Asp para formar Asn y Glu con consumo de ATP (Kumar *et al.*, 2009) (Fig. 1.4.3a). Dicho enzima se ha encontrado en el citosol de hojas y raíces (Taiz & Zeiger, 2010) y puede también usar NH_4^+ como sustrato (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Se diferencian dos isoformas de AS, una que se reprime por la luz y la sacarosa y su expresión depende del factor de transcripción BZIP11 (Hanson *et al.*, 2008), y otra que se induce por ambos factores (Galili *et al.*, 2008). Un aumento de los niveles de Asn y de otros aminoácidos se ha encontrado frecuentemente en condiciones de estrés hídrico y salino y con deficiencias minerales (Wang *et al.*, 2005).

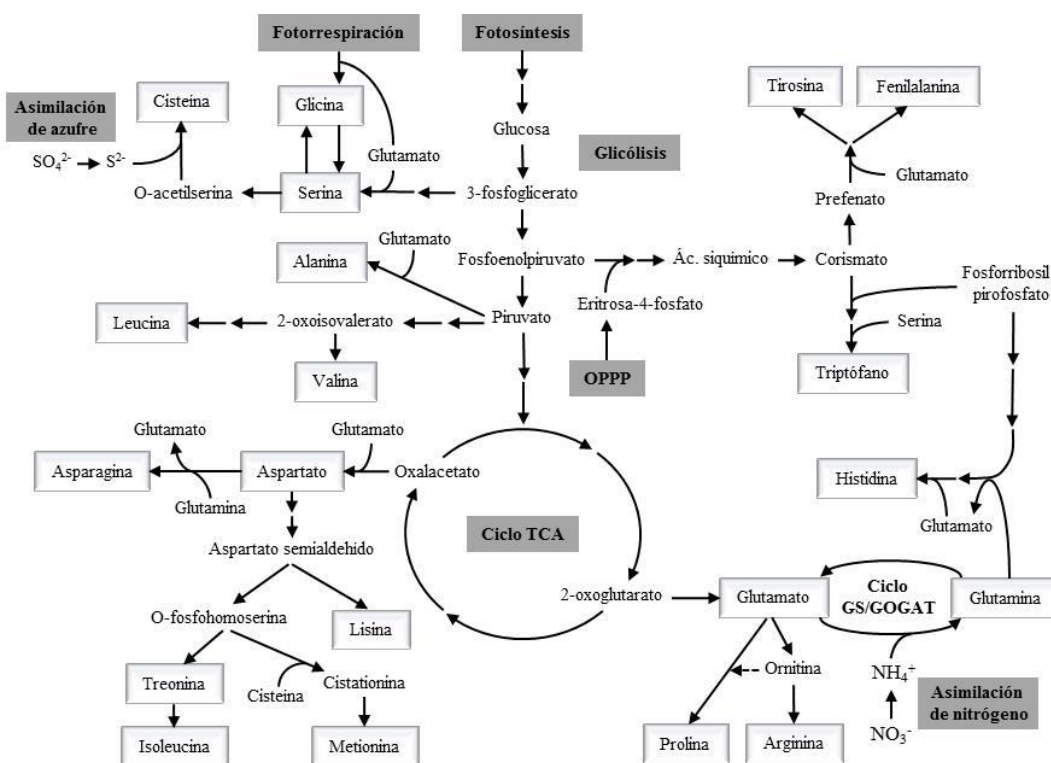


Fig. 1.4.4a. Rutas biosintéticas de los aminoácidos esenciales. Basado en Slocum (2005), Stepansky & Leustek (2006), Galili *et al.* (2008), Taiz & Zeiger (2010) y Maeda & Dudareva (2012).

La biosíntesis de histidina (His) tiene lugar por condensación de ATP y fosforribosil pirofosfato (PRPP), proveniente de la ruta de las pentosas fosfato, en presencia de Gln (Stepansky & Leustek, 2006) (Fig. 1.4.4a). Se ha propuesto que la actividad de algunos enzimas de la ruta puede ser inducida por los sustratos, PRPP y ATP, e inhibida por el producto His, mientras que la expresión de los genes depende del contenido de His (Stepansky & Leustek, 2006). La arginina (Arg) se sintetiza desde la ruta cíclica de síntesis del intermediario ornitina a partir de Glu (Slocum, 2005) (Fig. 1.4.4a). La Arg

es un precursor de poliaminas, importantes mensajeros secundarios en la respuesta a estrés, y constituye una importante reserva de N al igual que la Asn (Slocum, 2005; Forde & Lea, 2007; Hawkesford *et al.*, 2012). La expresión de varios de los genes que codifican proteínas de la síntesis de ornitina puede inhibirse por Arg dependiendo del estado nitrogenado de la planta (Slocum, 2005). La síntesis de prolina (Pro) tiene lugar a partir de Glu o, alternativamente, a partir de ornitina (Szabados & Savoure, 2010) (Fig. 1.4.4a). La regulación de la biosíntesis de Pro se ejerce a nivel del enzima pirrolina-5-carboxilato sintetasa. El contenido de Pro aumenta con la luz y en respuesta a estreses ambientales, y se ha propuesto que puede actuar como chaperona protegiendo a proteínas, como la NR (Forde & Lea, 2007; Szabados & Savoure, 2010). La síntesis de Pro se inhibe en la oscuridad o por producto final (Forde & Lea, 2007; Szabados & Savoure, 2010).

La síntesis de Ser tiene lugar, principalmente, durante la fotorrespiración a partir de Gly por acción de los enzimas GDC y SHMT en la mitocondria (Ho *et al.*, 1999) (Figs. 1.3.5a y 1.4.4a), y en tejidos no fotosintéticos o en la oscuridad a partir del 3PGA procedente de la glicólisis o del OPPP (Ho *et al.*, 1999). Por su parte, la Gly se sintetiza también durante la fotorrespiración, por interconversión con la Ser, o a partir del glioxilato procedente de diversas rutas (Foyer *et al.*, 2009). La biosíntesis de ambos aminoácidos está condicionada por la fotorrespiración (Ho *et al.*, 1999). La cisteína (Cys) se sintetiza a partir del intermediario *O*-acetilserina, generado a partir de Ser, acetil-CoA y el ion S^{2-} (Bogdanova & Hell, 1997; Hawkesford *et al.*, 2012) (Fig. 1.4.4a). Constituye el primer producto estable de la asimilación de S, y actúa como precursor de la mayoría de compuestos orgánicos azufrados, incluida la Met (Hawkesford *et al.*, 2012). La regulación de la biosíntesis de aminoácidos azufrados se ejerce a distintos niveles que abarcan la expresión de los transportadores, la modulación de la actividad y la expresión de enzimas claves de la ruta, y la disponibilidad de S (Hawkesford *et al.*, 2012).

La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, triptófano (Trp), fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr), tiene lugar a través de la ruta del ácido siquímico a partir del PEP –procedente de la glicólisis– y la E4P –procedente del OPPP– (Lancien *et al.*, 2006; Tzin & Galili, 2010; Maeda & Dudareva, 2012) (Fig. 1.4.4a). Se regula a nivel transcripcional por inducción de la expresión de ciertos genes por niveles bajos de los productos, y a nivel post-transcripcional por inhibición de la actividad de los enzimas por acumulación de productos (Maeda & Dudareva, 2012). La transferencia del grupo amino del Glu al piruvato forma la alanina (Ala) (Forde & Lea, 2007) (Fig. 1.4.4a), aminoácido involucrado en la respuesta de las plantas a hipoxia/anoxia (Forde & Lea, 2007). La biosíntesis de los aminoácidos ramificados incluye a la valina (Val) y la leucina (Leu) a partir de piruvato, y de la Ile a partir de Thr (Lancien *et al.*, 2006) (Fig. 1.4.4a). Varios de los genes que codifican proteínas implicados en la síntesis de estos aminoácidos pueden inhibirse por producto final (Diebold *et al.*, 2002; Lancien *et al.*, 2006).

La Gln, el Glu, el Asp y la Asn son los cuatro aminoácidos predominantes en plantas superiores (Lam *et al.*, 1995). Los tres primeros son los precursores de la mayoría de compuestos orgánicos nitrogenados como las amidas, amins, ureidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros (Hawkesford *et al.*, 2012). La Asn constituye la principal forma de almacenaje de N y, junto a la Gln, desempeñan un papel importante como transportadores de N para el metabolismo celular (Lam *et al.*, 1995; Galili *et al.*, 2008). Mientras que la Asn es utilizada para la exportación del N durante la noche, la Gln se usa para el transporte del N asimilado en la raíz a la parte aérea (Lam *et al.*, 1995). Además, cabe resaltar el papel de los aminoácidos en la interacción del metabolismo del C y N (Wang *et al.*, 2005; Galili *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Hawkesford *et al.*, 2012).

Los péptidos son un tipo de moléculas nitrogenadas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos, establecidos entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro (Pallardy, 2008). Cuando el número de aminoácidos es bajo da lugar a un péptido y cuando es alto a una proteína. La biosíntesis proteica empieza con la transcripción (Fig. 1.4.4b), que consiste en la síntesis de un polímero de ARN que porta una secuencia de bases complementaria a un gen específico, mediada por la ARN polimerasa. Son necesarios una serie de procesos previos a la transcripción para que la ARN polimerasa tenga acceso a las secuencias génicas (modificaciones epigenéticas). Además, la ARN polimerasa requiere de proteínas llamadas factores de transcripción (TF, "Transcription Factor") generales para ser funcional, junto a otros TFs específicos para activarla. Por consiguiente, los TFs regulan todos los procesos biológicos de las plantas, como el ciclo celular, el metabolismo, el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al ambiente (Czechowski *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2009). Posteriormente, el transcrito de ARN primario es procesado en un ARNm al eliminar los intrones ("splicing") y añadir una capucha (cap) al extremo 5' y una cola poli-A al extremo 3'. A continuación, el transcrito pasa del núcleo al citoplasma y se une primeramente a la subunidad pequeña del ribosoma y, después, a la subunidad grande para iniciar la traducción (Fig. 1.4.4b), tanto en el citosol, como en el cloroplasto y la mitocondria (Pallardy, 2008). La traducción es el proceso por el que se sintetiza una proteína de acuerdo a la información contenida en el ARNm con ayuda del ARNt. Una serie de ribosomas llamados polisomas sirven de sitio para la unión secuencial de aminoácidos de acuerdo a la secuencia de ARNm. El proceso de traducción produce la proteína primaria, que puede contener un péptido señal para la localización subcelular específica de la proteína. El proceso de expresión génica y biosíntesis proteica está regulado por múltiples mecanismos: regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (Fig. 1.4.4b).

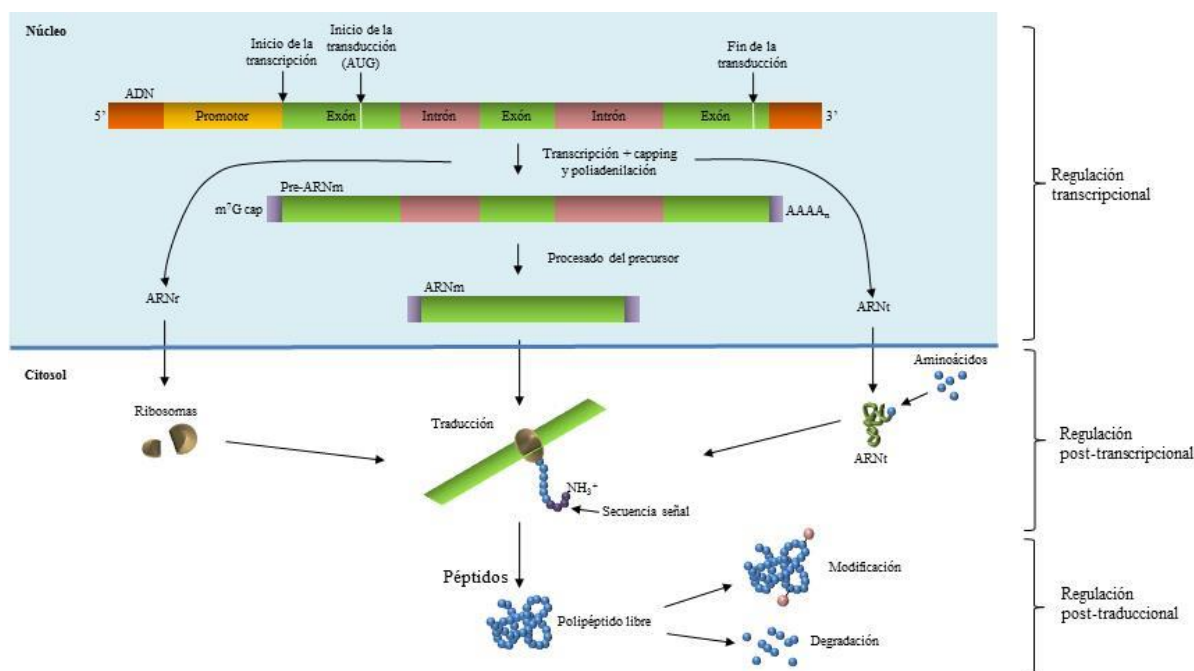


Fig. 1.4.4b. Expresión génica nuclear y síntesis proteica citosólica en eucariotas. Basado en Taiz & Zeiger (2010).

1.5. Efectos del Cambio Climático en la agricultura

La agricultura puede que sea el sector económico más vulnerable al Cambio Climático. Cualquier variación en el ambiente de los cultivos repercutirá en el rendimiento y la productividad agrícola. Las previsiones de Cambio Climático auguran una alteración de la composición química de la atmósfera con un creciente aumento de la concentración de GEIs, principalmente el CO₂, temperaturas más elevadas, episodios de fuertes precipitaciones y aumento de las inundaciones, sequías más frecuentes e intensas y degradación de algunos de los suelos (IPCC, 2013). Las condiciones climáticas extremas serán más habituales y podrán influir negativamente en el rendimiento y calidad de los cultivos, lo cual supondrá una amenaza para la sostenibilidad del sector agroalimentario. Uno de los mayores retos a los que se enfrenta la investigación agrícola en las próximas décadas será la mejora sostenible de la producción agrícola en un ambiente cambiante con el fin de garantizar la seguridad alimentaria. La demanda de productos agrícolas se incrementará hasta en un 43% con el incesante crecimiento de la población mundial que alcanzará los 9.000 millones en 2050 (FAO, 2009). Para los cereales, en particular el trigo, se estima que el aumento de producción requerido será de un 70 % (IWGSC, 2014).

Los efectos del CO₂ elevado en el crecimiento y la producción de las plantas parecen ser más pronunciados en las plantas C₃ que en las C₄ (Backlund *et al.*, 2008; Foyer *et al.*, 2009). Este hecho radica en que las plantas C₄ presentan una anatomía foliar distinta a las C₃ (véase Fig. 1.3.1a), y poseen un mecanismo de concentración y transporte del CO₂ a los sitios de fijación por Rubisco mediado por la PEPC (Douce & Neuburger, 1999; Foyer *et al.*, 2009). Dicho enzima capta el CO₂ en las células del mesófilo y lo transporta como malato a las células de la vaina, donde se transforma en CO₂ y se fija por la Rubisco en el ciclo de Calvin-Benson. La fotorrespiración es inapreciable o muy pequeña en estas plantas por la alta [CO₂] en dichas células (Leakey *et al.*, 2009a). Entre las especies C₄ destacan algunos cultivos importantes como el maíz, la caña de azúcar, el sorgo y el mijo, aunque la mayoría de cultivos agrícolas –trigo, cebada, arroz, tomate, soja, patata, avena, alfalfa, judía, algodón y especies hortícolas– son C₃.

Para el estudio del impacto del CO₂ y de otros parámetros relacionados con el Cambio Climático en los cultivos agrícolas se han utilizado invernaderos y cámaras de crecimiento con ambiente controlado. No obstante, para imitar más fielmente las condiciones de campo se han utilizado las cámaras de techo abierto (OTC, “Open Top Chamber”) y los sistemas de enriquecimiento en CO₂ al aire libre (FACE, “Free Air CO₂ Enrichment”), que permiten modificar la [CO₂] en el aire (Uprety *et al.*, 2006). Los sistemas FACE modifican mínimamente el microclima del ecosistema y son los más ampliamente utilizados. Las cámaras de gradiente de temperatura (TGC, “Temperature Gradient Chamber”) permiten estudiar conjuntamente los efectos de la temperatura y el CO₂ en el campo al disponer de ventiladores y calefactores que facilitan la creación de un gradiente térmico en la instalación (Rawson *et al.*, 1995). Recientemente, se han diseñado los sistemas T-FACE (“Temperature by FACE”), que por medio de calentadores externos consiguen modificar la temperatura del aire, además de la [CO₂] (Ruiz-Vera *et al.*, 2013).

1.5.1. Efecto directo del aumento de la concentración de CO₂ en las plantas

El aumento de la [CO₂] atmosférica afecta directamente a tres procesos de las plantas estrechamente relacionados: la fotosíntesis, la respiración y la transpiración (Drake *et al.*, 1997). En plantas C₃, la exposición a [CO₂] elevadas induce (i) una respuesta inmediata o a corto plazo, que estimula la velocidad de asimilación fotosintética del C (A_n), y (ii) una respuesta a largo plazo, en la que la estimulación inicial de la A_n disminuye a medida que progresa el tiempo de exposición a [CO₂] elevadas. Esta pérdida de capacidad fotosintética se aprecia cuando se comparan las medidas de fotosíntesis realizadas a una concentración común de CO₂ en la de medida.

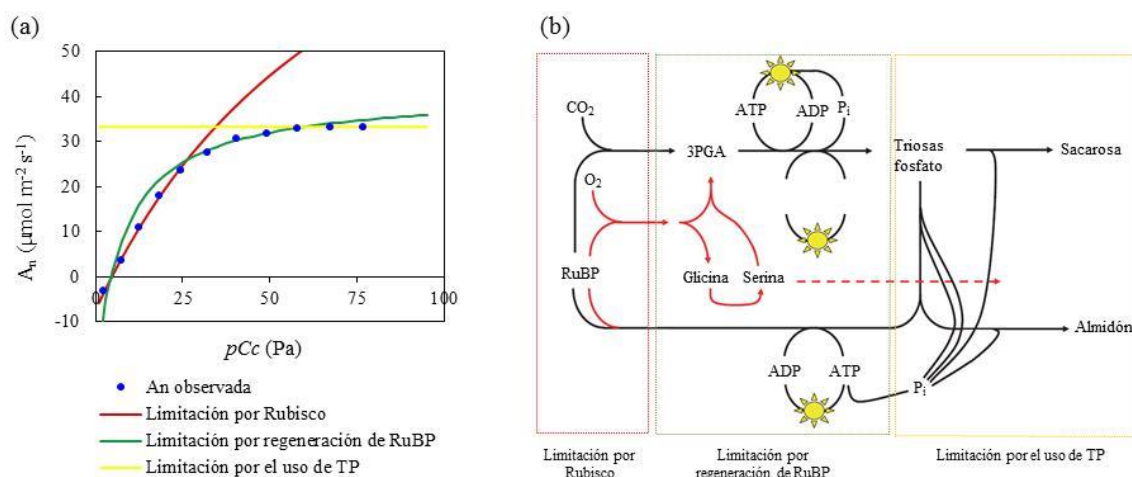


Fig. 1.5.1a. (a) Curva de respuesta de la velocidad de asimilación fotosintética del carbono (A_n) al incremento de la presión parcial de CO₂ en el cloroplasto (pCc) en plantas C₃ y (b) esquema de los principales procesos que afectan a A_n (Sharkey *et al.*, 2007). En una situación ideal, A_n se encuentra limitada a baja pCc por la Rubisco, seguidamente por la regeneración de la RuBP y, a alta pCc , por el reciclado de las triosas fosfato.

El enriquecimiento en CO₂ conduce a un aumento de A_n al aumentar el sustrato para la reacción de carboxilación catalizada por la Rubisco, porque el enzima no está saturado con la [CO₂] atmosférica actual, y al disminuir la oxigenación del enzima y la pérdida de C por fotorrespiración (Bowes, 1993; Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004; Sharkey *et al.*, 2007; Aranjuelo *et al.*, 2011a). Este efecto de fertilización por aumento de la [CO₂] (Reich & Hobbie, 2012) favorecería la fotosíntesis y la acumulación de biomasa, lo cual se traduciría en un aumento del rendimiento y la productividad de los cultivos (Drake *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997; Aben *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2005; Fukayama *et al.*, 2011; Seneweera *et al.*, 2011). Según el modelo de Farquhar *et al.* (1980) para la respuesta de la fotosíntesis al incremento en la concentración de CO₂ en plantas C₃ (Fig. 1.5.1a) son tres los procesos metabólicos que afectan directamente a A_n : la actividad Rubisco, la regeneración de la RuBP y el metabolismo de las TP (Sharkey, 1985; Sharkey *et al.*, 2007). Con concentraciones bajas de CO₂, las reacciones de regeneración de la RuBP son más rápidas que su carboxilación por la Rubisco y la fotosíntesis está limitada por la Rubisco (Fig. 1.5.1a), puesto que el CO₂ es el sustrato limitante (Farquhar *et al.*, 1980; Sharkey, 1985; Sharkey *et al.*, 2007). La capacidad de regeneración de la RuBP, que depende del NADPH y el ATP generados en la CTEF (Foyer *et al.*, 2012), puede limitar la fotosíntesis a mayores concentraciones de CO₂ (Sharkey *et al.*, 2007). Al incrementar la [CO₂] se favorece la carboxilación sobre la oxigenación de la Rubisco, disminuyendo la pérdida de C por fotorrespiración y aumentando la fotosíntesis, aunque con [CO₂] más elevadas la velocidad de carboxilación supera a la de regeneración de la RuBP y pasa a ser limitante el otro sustrato del

enzima, la RuBP. La fotosíntesis puede continuar aumentando gradualmente hasta alcanzar un máximo (fase estacionaria de la curva A_n/pCc ; Fig. 1.5.1a). Cuando el CO_2 es elevado, la regeneración de la RuBP y el metabolismo de las TP se convierten en los factores limitantes (Sage & Kubien, 2007). Con una presión parcial de CO_2 muy alta, se excede la capacidad de la hoja para usar los productos generados en el cloroplasto y la fotosíntesis está limitada por el uso de TP (Sharkey et al., 2007). Estos productos se usan principalmente para la síntesis de sacarosa y almidón, lo que hace que la disponibilidad de P_i , que afecta a A_n , esté determinada por la capacidad de regenerar P_i de los intermediarios fosforilados.

1.5.2. Efecto del crecimiento prologando a concentraciones de CO_2 elevadas en las plantas

Son muchos los estudios realizados con diferentes especies vegetales, incluido el trigo, que han mostrado que la exposición prolongada al CO_2 elevado conduce a un fenómeno conocido como aclimatación de la fotosíntesis que se caracteriza por un descenso de la capacidad de asimilación del CO_2 que puede limitar el crecimiento (Drake et al., 1997; Ainsworth et al., 2003; Long et al., 2004; Martínez-Carrasco et al., 2005; Gutiérrez et al., 2009a; Aranjuelo et al., 2011a; Pérez et al., 2011a; Seneweera et al., 2011). Esta aclimatación fotosintética comporta cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos (Makino & Mae, 1999; Teng et al., 2006) y conlleva alteraciones en el intercambio gaseoso, indicativas de una disminución de la capacidad de carboxilación (Ainsworth et al., 2004) y de una reducción de la actividad y cantidad de proteína Rubisco (Drake et al., 1997; Cotrufo et al., 1998; Moore et al., 1999; Long et al., 2004; Pérez et al., 2005; Aranjuelo et al., 2011a; Aranjuelo et al., 2011b; Seneweera et al., 2011). Aun cuando la estimulación de la fotosíntesis es menor de lo esperado, el efecto del CO_2 elevado continúa siendo positivo en la mayoría de las plantas C_3 (Leakey et al., 2009a; Foyer et al., 2012). Se estima que la fotosíntesis aumenta un 14%, la biomasa un 17% y la producción un 13% en plantas crecidas a $[CO_2]$ elevadas ($550 \mu mol CO_2 \cdot mol^{-1}$) con respecto a aquellas mantenidas a $[CO_2]$ ambientales (Long et al., 2006). En plantas C_4 , aunque no se ha observado esta aclimatación al CO_2 elevado (Kim et al., 2006; de Souza et al., 2008; Prins et al., 2011), se estima que la fotosíntesis aumenta un 10% y la biomasa un 7% a dicha $[CO_2]$ debido a una mejora del estado hídrico en la planta por el cierre estomático, cambios que, sin embargo, no conducen a un aumento de la producción (Long et al., 2006; Leakey et al., 2009a).

Son varias las hipótesis propuestas para explicar este fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis. Algunas de las cuales sugieren que pueden intervenir tanto las limitaciones relacionadas con la eficiencia de la carboxilación como las impuestas por la conductancia de los estomas (Long et al., 2004). Un aumento de los niveles de CO_2 provoca un cierre de los estomas por un mecanismo aún desconocido, que parece depender de la $[CO_2]$ intercelular (C_i) y no de la del aire externo (Ainsworth & Rogers, 2007; Negi et al., 2014). A pesar del cierre parcial de los estomas al aumentar el CO_2 , los niveles de C_i se mantienen o aumentan. De manera que la limitación estomática no parece influir en la fotosíntesis en CO_2 elevado (Mott, 1988; Long et al., 2004). Sin embargo, la menor conductancia de los estomas (g_s) mejora el estado hídrico y la eficiencia en el uso del agua en la planta por reducción de la pérdida de agua por transpiración (E) (Drake et al., 1997). La conductancia del mesófilo (g_m) parece disminuir en plantas expuestas a diferentes $[CO_2]$ (Flexas et al., 2008; Flexas et al., 2012). El CO_2 elevado puede también afectar a la velocidad de carboxilación por unidad de superficie foliar por cambios en la morfología de las hojas, los cuales incluyen un mayor número de células del mesófilo, mayor grosor o masa por unidad de superficie foliar (Peterson et al., 1999). En algunos estudios se ha

observado un descenso del número de estomas por unidad de área foliar (Drake *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2006). Además de una alteración en la organización del cloroplasto por acumulación de granos de almidón que puede limitar la difusión del CO₂, distorsionar los tilacoides y dificultar la interceptación de la luz y, en definitiva, reducir la asimilación fotosintética (Makino & Mae, 1999; Teng *et al.*, 2006).

Las limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis en CO₂ elevado se asocian con una reducción de la carboxilación de la RuBP por la Rubisco (Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a). Entre las diferentes explicaciones propuestas, una de ellas contempla una capacidad de sumidero limitada (Makino & Mae, 1999; Ainsworth *et al.*, 2004; Foyer *et al.*, 2009). Se ha observado que cuando la estimulación de la fotosíntesis en CO₂ elevado excede la capacidad de exportación y utilización de asimilados, los carbohidratos se acumulan en la hoja (Stitt, 1991; Foyer *et al.*, 2012). A nivel de planta entera también tiene lugar una acumulación de carbohidratos cuando la producción de fotoasimilados supera la capacidad de uso de los órganos sumideros (Makino & Mae, 1999; Ainsworth *et al.*, 2004; Foyer *et al.*, 2009). Por ello, la aclimatación de la fotosíntesis puede ser más severa a medida que el tamaño de los sumideros se reduce (Ainsworth *et al.*, 2004; Aranjuelo *et al.*, 2011a; Aranjuelo *et al.*, 2013) o, por el contrario, puede no tener lugar en especies vegetales con gran capacidad de sumidero, como los tubérculos en patata, las raíces en rábano (Makino & Mae, 1999) o variedades de trigo con un mayor ahijamiento (Aranjuelo *et al.*, 2013)

La aclimatación fotosintética al CO₂ elevado se ha relacionado con un descenso de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco y de otros genes fotosintéticos mediada por la acumulación de carbohidratos foliares (Drake *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Jifon & Wolfe, 2002; Foyer *et al.*, 2009; Araya *et al.*, 2010). Una disminución de la expresión de varios genes fotosintéticos, junto a un descenso de proteína Rubisco, se ha encontrado en hojas de espinaca y cultivos celulares de *Chenopodium* incubados con azúcares (Krapp *et al.*, 1991; Krapp *et al.*, 1993). El mecanismo de señalización por carbohidratos parece depender de la fosforilación de hexosas por la HXK (Jang & Sheen, 1994) (Fig. 1.5.2a). La HXK actúa como sensor del nivel de azúcares y, cuando la proteína se une a su sustrato, tiene lugar un cambio conformacional que induce una cascada de señalización como resultado de la cual se reprime la actividad de los promotores de varios genes fotosintéticos en el núcleo (Jang & Sheen, 1994; Koch, 1996; Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1999; Sheen *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Sun *et al.*, 2006). Entre los componentes que participan en la ruta de transducción de la señal mediada por HXK se han identificado proteínas quinasas del tipo SnRK, proteínas fosfatasas, Ca²⁺ y calmodulina (Sheen *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2006). Además, se conocen otros mecanismos de señalización por carbohidratos independientes al de la HXK, que incluyen el transporte de azúcares a través de la membrana (Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2006), el estado redox (Rolland *et al.*, 2006), la sensibilización por hexosas (Sheen *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2006), sacarosa (Sheen *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2006), acetato (Koch, 1996), T6P (Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2006; Tsai & Gazzarrini, 2014), TFs (Sheen *et al.*, 1999), etc.

La disminución de la actividad y proteína Rubisco encontrada en plantas que crecen en CO₂ elevado (Nakano *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005), se ha relacionado frecuentemente con la represión génica del enzima por acumulación de carbohidratos (Nie *et al.*, 1995b; Gesch *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1999; Vu *et al.*, 1999; Smeekens, 2000). Sin embargo, en algunos estudios se ha observado un efecto diferente del aumento de CO₂ en los transcritos y en la cantidad de proteína Rubisco, que evidencia la existencia de algún tipo de control a nivel de traducción o de velocidad de reposición de la proteína (Seneweera *et al.*, 2011). La fotosíntesis no sólo depende de la carboxilación

por la Rubisco, sino de otros componentes del aparato fotosintético. Estudios realizados en condiciones de baja intensidad luminosa o con CO₂ elevado han mostrado que la capacidad para regenerar RuBP en el ciclo de Calvin-Benson puede ser el factor limitante en el control de la fotosíntesis, más que la actividad Rubisco (Zhang *et al.*, 2008; Uematsu *et al.*, 2012). Condiciones en las que otros enzimas del ciclo, como la PGK, la TK, la SBPasa o la FBA, podrían regular el proceso (Moore *et al.*, 1999; Uematsu *et al.*, 2012; Aranjuelo *et al.*, 2013). La regeneración de RuBP, como se ha indicado anteriormente, depende del ATP y NADPH generados en la CTEF (von Caemmerer & Farquhar, 1981; Uematsu *et al.*, 2012) y se ha observado una reducción del transporte electrónico fotosintético en plantas de alfalfa crecidas en una atmósfera enriquecida en CO₂ (Aranjuelo *et al.*, 2008b). El aumento de la fotosíntesis en CO₂ elevado puede también disminuir los niveles de P_i en las hojas, lo cual puede desencadenar una regulación de la expresión génica en respuesta al P_i (Fukayama *et al.*, 2009) y limitar la síntesis de ATP (Krapp *et al.*, 1993). Además, el CO₂ elevado puede inducir cambios en la señalización hormonal entre los órganos fuente y sumidero. En *Arabidopsis*, la acumulación de carbohidratos en CO₂ elevado condujo a un aumento del contenido de hormonas, como las auxinas y giberelinas, que aceleraron el crecimiento (Teng *et al.*, 2006). Las CKs pueden también desempeñar un papel importante por contribuir a la señalización del estado nitrogenado (Gutiérrez *et al.*, 2013).

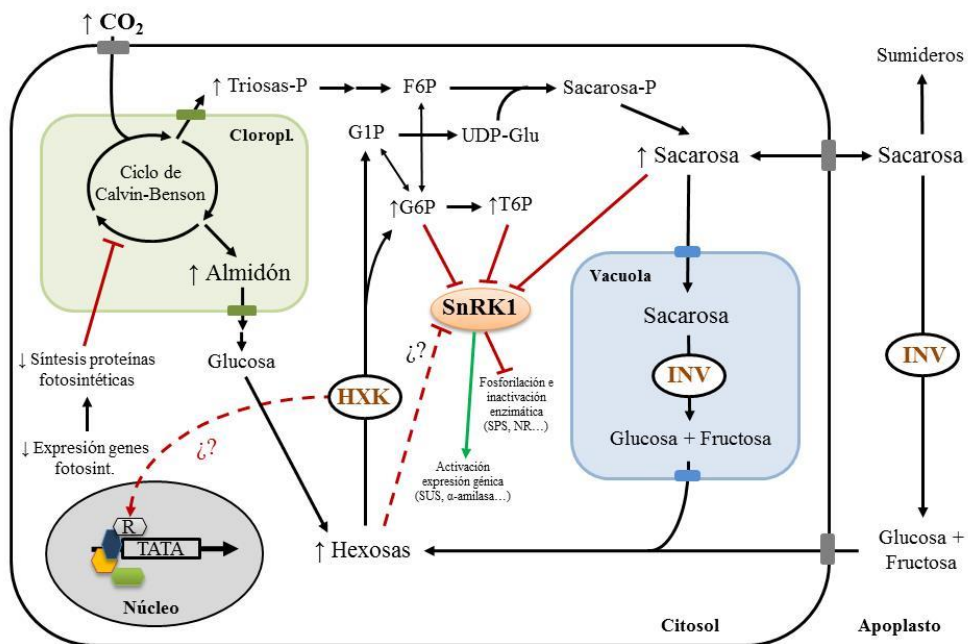


Fig. 1.5.2a. Modelo de señalización por azúcares en CO₂ elevado. Basado en Jang & Sheen (1994), Moore *et al.* (1999), Halford *et al.* (2003), Long *et al.* (2004), Rolland *et al.* (2006) y Tsai & Gazzarrini (2014). Se recogen algunos de los posibles mecanismos más importantes de señalización por azúcares. Las hexosas producidas por hidrólisis de la sacarosa, catalizada por invertasas (INV), o del almidón son transportadas al citosol y fosforiladas por la hexoquinasa (HXK). Ésta actúa como sensor del nivel de azúcares y desencadena una señal que reprime la expresión de genes fotosintéticos. Otros mecanismos de señalización por carbohidratos independientes al de la HXK son los de la sacarosa y la trehalosa-6-fosfato (Moore *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006).

Por otra parte, la respiración conlleva una importante pérdida de C, y se estima que el C liberado por este mecanismo es entre 5-6 veces mayor que las emisiones antropogénicas de CO₂ (Prentice *et al.*, 2001). El efecto del CO₂ elevado en la respiración ha sido ampliamente estudiado y se han obtenido resultados diversos (Drake *et al.*, 1999; Davey *et al.*, 2004; González-Meler *et al.*, 2004; Leakey *et al.*, 2009a), que se han asociado con errores en el sistema de medida. La medida del O₂ absorbido parece

ser más precisa que la del eflujo de CO₂ (Davey *et al.*, 2004; Leakey *et al.*, 2009a). Estudios recientes han mostrado que el crecimiento prolongado en CO₂ elevado conduce a una estimulación de la respiración en Arabidopsis, arroz, soja y tomate (Leakey *et al.*, 2009a; Leakey *et al.*, 2009b; Fukayama *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Markelz *et al.*, 2014a; Markelz *et al.*, 2014b). La respiración neta en condiciones de CO₂ elevado es el resultado del balance entre dos mecanismos opuestos: la acumulación de carbohidratos por la estimulación de la fotosíntesis, que aumenta los sustratos para la respiración, y el descenso de N foliar, que implica una menor demanda de los productos de la respiración (Leakey *et al.*, 2009a).

Aunque la represión de genes fotosintéticos por la acumulación de carbohidratos foliares resulte una explicación plausible para la aclimatación de la fotosíntesis, en nuestros experimentos con trigo cultivado en el campo el descenso de Rubisco se ha relacionado con una pérdida de N foliar (Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a). Una reducción de la concentración de N foliar en CO₂ elevado (Poorter *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004) se ha encontrado en cultivos agrícolas como el arroz (Pang *et al.*, 2006), el trigo (Del Pozo *et al.*, 2007; Leakey *et al.*, 2009a; Bloom *et al.*, 2010; Aranjuelo *et al.*, 2011a; 2013; Gutiérrez *et al.*, 2013; Bloom *et al.*, 2014) y otras especies vegetales (Haase *et al.*, 2007), y en plantas leñosas (McGuire *et al.*, 1995; Curtis & Wang, 1998), tanto en cámaras de crecimiento con ambiente controlado como en experimentos de campo utilizando OTC, TGC y FACE. El descenso del contenido de N se ha observado no sólo en la parte aérea de la planta, sino también en la raíz (Cotrufo *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2007), cuya respuesta parece depender de la nutrición mineral (véase apartado 1.5.2.2). Se desconoce el mecanismo por el que el CO₂ elevado conduce a una pérdida de N y se han propuesto diversas hipótesis (Fig. 1.5.2b).

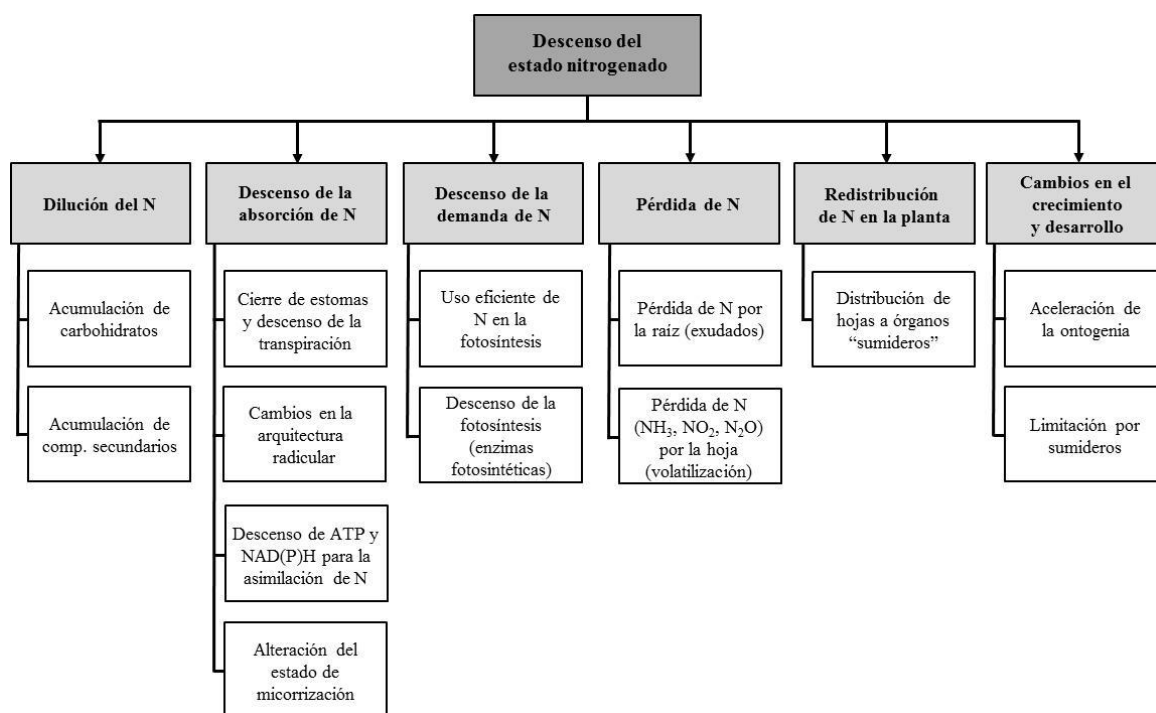


Fig. 1.5.2b. Hipótesis propuestas para explicar el descenso de N observado en plantas crecidas a [CO₂] elevada.

Entre las hipótesis más ampliamente mencionadas se incluye una dilución del N por el aumento en la asimilación del C (Stitt & Krapp, 1999; Taub & Wang, 2008). El mayor incremento de biomasa con

respecto al contenido de N se asocia con la acumulación de carbohidratos no estructurales (Kuehny *et al.*, 1991; Sims *et al.*, 1998; Gifford *et al.*, 2000), o de otros compuestos secundarios, como ligninas, taninos, lípidos, ácidos orgánicos o carbohidratos estructurales (Poorter *et al.*, 1997; Gifford *et al.*, 2000; Taub & Wang, 2008).

Otros trabajos señalan un descenso de la absorción de N por unidad de masa de raíz (Shimono & Bunce, 2009). Aunque sería previsible un aumento de la absorción de N con el CO₂ elevado al proveer de fotoasimilados adicionales a las raíces que facilitarían la generación de energía necesaria para la absorción activa de nutrientes, la mayoría de los estudios muestran un descenso de la velocidad de absorción de N. Este hecho se ha observado en experimentos en el campo en una comunidad de especies vegetales (Jackson & Reynolds, 1996) y en cultivos hidropónicos de arroz (Shimono & Bunce, 2009) y trigo con abundancia de NO₃⁻ (Lekshmy *et al.*, 2013). Sin embargo, la absorción de N aumentó con el CO₂ elevado en trigo con deficiencia de NO₃⁻ (Lekshmy *et al.*, 2013), en *Pinus taeda*, *Pinus ponderosa* (BassiriRad *et al.*, 1997), *Acer rubrum* (BassiriRad *et al.*, 1999) y otras especies vegetales (BassiriRad *et al.*, 2001), mientras que no varió en sorgo, soja o *Acer saccharum* (BassiriRad *et al.*, 1999). La variabilidad en el patrón de absorción del N parece depender del tiempo de exposición al CO₂ elevado y de la fase de desarrollo de las plantas (Shimono & Bunce, 2009). El cierre de los estomas y la consiguiente reducción de la transpiración en CO₂ elevado pueden disminuir la movilidad de los nutrientes en el entorno de la raíz (Conroy & Hocking, 1993; van Vuuren *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 2002; Ainsworth & Rogers, 2007; Del Pozo *et al.*, 2007; Taub & Wang, 2008), y limitar su absorción (Taub & Wang, 2008). El CO₂ elevado puede también alterar la arquitectura radicular, al incrementar el desarrollo de raíces laterales frente a las primarias y dificultar la absorción de nutrientes desde las capas más profundas del suelo, lo que se traduciría en una menor eficiencia en la absorción de N (Pritchard & Rogers, 2000). Asimismo, el CO₂ elevado puede disminuir la asimilación del N en compuestos orgánicos nitrogenados (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2010; Bloom *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2014), ya que la inhibición de la fotorrespiración (Long *et al.*, 2004) conduce a un descenso de la disponibilidad de poder reductor, como NAD(P)H y Fd_{red}, necesarios para la reducción del NO₃⁻ y NO₂⁻, respectivamente (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2010). Por último, se ha propuesto que el aumento de exudados en plantas crecidas en CO₂ elevado puede alterar la actividad microbiana en la rizosfera y aumentar la competencia por los nutrientes entre la planta y los microorganismos (Díaz *et al.*, 1993; Taub & Wang, 2008).

Otras explicaciones para la pérdida de N foliar en CO₂ elevado contemplan un descenso de la demanda de N por la mejora en la eficiencia en el uso del N (Conroy, 1992; Davey *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999; Gifford *et al.*, 2000). Es decir, la mejora de la eficiencia de la carboxilación de la RuBP (Leakey *et al.*, 2009a) implica un descenso del N invertido en enzimas de la fotosíntesis, especialmente en Rubisco, y la fotorrespiración, y con ello de su absorción al depender de la demanda (BassiriRad *et al.*, 2001). Sin embargo, Nakano *et al.* (1997) observaron que el descenso de Rubisco no fue la causa del descenso de N foliar, sino más bien una consecuencia de un descenso general del N foliar. Otras hipótesis atribuyen el descenso de N en plantas crecidas en CO₂ elevado a un incremento de la exudación de compuestos orgánicos por la raíz (Pang *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2009) y a pérdidas por volatilización en forma de NH₃ (Smart *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2006), NO₂ o N₂O (Smart *et al.*, 1998). Algunos estudios relacionan la pérdida de N foliar en CO₂ elevado con una redistribución del N dentro de la planta, favoreciéndose la adscripción de dicho nutriente a otros órganos (Nakano *et al.*, 1997; Gifford *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2006). Más específicamente, se atribuye a una reducción del contenido de enzimas fotosintéticos en favor de otros componentes celulares (Makino & Mae, 1999; Foyer *et al.*, 2009; Fukayama *et al.*, 2011).

Finalmente, se ha sugerido que la pérdida de N en CO₂ elevado se debe a cambios en el crecimiento y desarrollo de la planta, propuesta que a su vez puede estar relacionada con alguna de las hipótesis antes mencionadas. La aclimatación fotosintética puede variar con la fase del desarrollo foliar, ya que en hojas jóvenes normalmente no tiene lugar dicho fenómeno, como se ha visto en trigo (Nie *et al.*, 1995a). Posiblemente se deba a que al no haberse completado el desarrollo, todavía no actúan como órganos fuente para la redistribución de N a partir de Rubisco u otras proteínas fotosintéticas. Varios estudios han mostrado que el CO₂ elevado induce un cambio en la ontogenia foliar por aceleración de la senescencia en diferentes especies vegetales (Coleman *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997; Fangmeier *et al.*, 2000; Gifford *et al.*, 2000; Ludewig & Sonnewald, 2000; Zhu *et al.*, 2009; Seneweera *et al.*, 2011), como el trigo (Nie *et al.*, 1995a; Nie *et al.*, 1995b; Theobald *et al.*, 1998). De manera que el descenso de N podría derivar de una mayor velocidad de desarrollo (Coleman *et al.*, 1993; Gifford *et al.*, 2000). Seneweera *et al.* (2011) propusieron que una relajación del sistema de defensa antioxidante en CO₂ elevado condujo a un aumento de concentración de radicales libres en el cloroplasto y al daño de proteínas como la Rubisco. Para Pang *et al.* (2006) las pérdidas de N por volatilización de NH₃ se producirían por una senescencia más temprana cuando las plantas crecen en CO₂ elevado. Sin embargo, Moore *et al.* (1999) mostraron que la pérdida de capacidad fotosintética en hojas maduras puede superarse por exposición de la planta a niveles atmosféricos de CO₂.

1.5.2.1. Efecto de la temperatura del aire en la respuesta de las plantas al CO₂ elevado

Los pronósticos de Cambio Climático para finales de siglo vaticinan una elevación de la temperatura de la superficie terrestre entre 1,5-4,5 °C en asociación con una duplicación de la [CO₂] atmosférica. Ambos factores regulan los procesos fisiológicos y fenológicos de las plantas (Kim *et al.*, 2007), por lo tanto, tendrán un impacto potencial en el crecimiento y la productividad de los cultivos (Kim *et al.*, 2007; Fukayama *et al.*, 2011). Así, en las últimas décadas los descensos en el rendimiento de los cultivos agrícolas se han asociado con la elevación de las temperaturas durante la estación del año crítica para la maduración del grano de los cereales, por lo que se considera uno de los principales factores abióticos que limitan el crecimiento, desarrollo y distribución de las plantas (Salvucci, 2008).

La fotosíntesis es uno de los procesos más sensibles a los cambios de temperatura, inhibiéndose a temperaturas ligeramente superiores a las óptimas para el crecimiento (Salvucci, 2008; Ristic *et al.*, 2009). Respuesta que en las plantas C₃ parece ser más pronunciada (Wahid *et al.*, 2007). Aun a pesar de que la velocidad de carboxilación de la Rubisco aumenta con la temperatura, la solubilidad del CO₂ con respecto a la del O₂ y la especificidad de la Rubisco por el CO₂ disminuyen. Estos cambios favorecen la oxigenación de la RuBP por la Rubisco sobre la carboxilación (Drake *et al.*, 1997; Salvucci, 2008; Foyer *et al.*, 2009) y facilitan el flujo hacia la fotorrespiración que, junto al aumento de la respiración nocturna, reduce el potencial aumento de la fijación de CO₂ a altas temperaturas (Salvucci, 2008). Se ha propuesto que con un aumento moderado de la temperatura, la fotosíntesis puede aumentar como consecuencia de un mayor crecimiento radicular y la consiguiente mejora de la disponibilidad de nutrientes (Fukayama *et al.*, 2011). No obstante, entre los efectos más frecuentes observados en las plantas en respuesta a una elevación de la temperatura, se contemplan la reducción del crecimiento de la parte aérea y la raíz, la aceleración del crecimiento y una senescencia foliar más temprana, la reducción del tamaño celular, el cierre estomático, la inactivación y desnaturalización de enzimas, descensos en el rendimiento y calidad del grano de los cereales, etc. (Wahid *et al.*, 2007; Ristic *et al.*, 2009). Además de la estimulación de la fotorrespiración, se ha mostrado que las temperaturas altas pueden tener un efecto inhibitorio directo en la fotosíntesis por daños del aparato

fotosintético (Sage & Kubien, 2007) que conllevan a una limitación de la CTEF por un mecanismo aún desconocido. Se han relacionado con daños en el PSII, cambios en la estructura de los tilacoides (Wahid *et al.*, 2007) o con la activación de la CTEF cíclica, que puede provocar una disminución de la generación de NADPH pero, a su vez, podría proteger al PSII (Sage & Kubien, 2007). Sin embargo, la Rubisco parece ser incluso aún más sensible a la inactivación por las temperaturas moderadamente elevadas (Salvucci, 2008), dado que la RBA es altamente sensible a temperaturas de unos 36 °C, que inestabilizan la proteína, con la consiguiente inhibición de la Rubisco y limitación de la fotosíntesis (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004; Salvucci, 2008; Ristic *et al.*, 2009; Araus & Slafer, 2011). La proteína cloroplástica HSP60 desempeña un papel importante, ya que protege a la RBA de la desnaturalización térmica (Salvucci 2008). La elevación de la concentración atmosférica de CO₂ podría contrarrestar el impacto negativo de una elevación de la temperatura porque inhibe la fotorrespiración (Benlloch-Gonzalez *et al.*, 2014), de modo que el óptimo de temperatura para la fotosíntesis se desplaza a valores superiores (Long 1991). Incluso en ambientes sin cambios en la temperatura del aire, las plantas que crecen a [CO₂] elevadas muestran un aumento de la temperatura foliar por el cierre estomático y el descenso de la transpiración, que no permiten la disipación del calor latente (Long *et al.*, 2006).

Aunque son muchos los estudios que han evaluado el impacto del cambio climático en la fisiología y la productividad de las plantas, en su mayoría no han abordado el efecto interactivo CO₂ × temperatura. Taub *et al.* (2000) propusieron que el CO₂ elevado incrementa la termotolerancia de la fotosíntesis y la eficiencia del PSII en una amplia variedad de especies vegetales crecidas tanto en invernaderos como en el campo. Utilizando los sistemas FACE, en soja se observó que la temperatura elevada redujo el efecto positivo del aumento del CO₂ en la fotosíntesis (Ruiz-Vera *et al.*, 2013; Rosenthal *et al.*, 2014), mientras que en arroz se produjeron cambios en la expresión génica inducidos por el aumento de la [CO₂] que aumentaron con el incremento de la temperatura del suelo (Fukayama *et al.*, 2011). La mayoría de estudios que han contemplado los efectos interactivos CO₂ × temperatura en trigo se han realizado en TGCs en nuestro grupo de investigación. En estos estudios, la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado disminuyó con la temperatura alta (Del Pozo *et al.*, 2005; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009a). Además, cuando las medidas se realizaron a la misma concentración de CO₂, la fotosíntesis no varió con la temperatura de crecimiento en plantas crecidas a [CO₂] ambientales, pero aumentó con la temperatura en CO₂ alto debido a un aumento de la respuesta de la actividad Rubisco a la temperatura (Alonso *et al.*, 2008a). Con posterioridad Alonso *et al.* (2009) mostraron que la velocidad máxima de carboxilación y del transporte electrónico a altas temperaturas mejoró con un aumento del CO₂ de crecimiento; y Gutiérrez *et al.* (2009a) observaron que el efecto combinado del aumento de temperatura y CO₂ mejoró la eficiencia fotoquímica, a pesar del descenso de asimilación del C en CO₂ elevado. Los resultados de Pérez *et al.* (2011a) evidenciaron que los efectos negativos del CO₂ elevado o las altas temperaturas por separado en la velocidad máxima de carboxilación o la actividad Rubisco desaparecieron cuando se evaluaron conjuntamente ambos factores. En estudios en el campo, Benlloch-Gonzalez *et al.* (2014) encontraron que la temperatura elevada redujo el efecto positivo del CO₂ elevado en la biomasa y la proliferación de la raíz. Además, se ha mostrado que las temperaturas moderadas acompañadas de una duplicación de los niveles de CO₂ aumentaron la productividad del arroz en un 30%. Sin embargo, con cada 1 °C de aumento de la temperatura por encima de los 26 °C, la productividad se redujo un 10% como consecuencia del acortamiento del periodo de crecimiento (Högy *et al.*, 2009b). Esto sugiere que los potenciales beneficios del CO₂ pueden disminuir rápidamente con temperaturas más cálidas.

1.5.2.2. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la respuesta de las plantas al CO₂ elevado

Existen evidencias, ya anticipadas con anterioridad, de que la respuesta de las plantas al crecimiento prolongado en CO₂ elevado depende en gran medida de la disponibilidad de nutrientes minerales y de su utilización (Stitt & Krapp, 1999; Foyer *et al.*, 2012), en especial del N por ser cuantitativamente el más importante para el desarrollo de las plantas (Forde & Lea, 2007). Un mayor crecimiento en CO₂ elevado requerirá la adquisición de N adicional en proporción al C extra fijado por la planta (Hungate *et al.*, 2003; Foyer *et al.*, 2012). Sin embargo, simulaciones sobre el Cambio Climático advierten de que el ciclo del N no satisfará la demanda de este nutriente (Hungate *et al.*, 2003), las cuales consideran la dinámica de la planta y el suelo, junto a los flujos de C y N entre ambos. Estas simulaciones prevén que el CO₂ elevado a largo plazo puede conducir a una limitación progresiva de N en los ecosistemas (Luo *et al.*, 2004; Bloom *et al.*, 2010). El aumento continuado de la [CO₂] atmosférica se acompaña de un incremento del contenido de C en los ecosistemas, como consecuencia de la estimulación del crecimiento y la acumulación de biomasa en plantas de ciclo de vida largo, como los árboles, y del almacenado en el suelo. Lo cual puede repercutir en un descenso de la descomposición de la materia orgánica y una mayor inmovilización de N en el suelo y, por consiguiente, en una reducción progresiva del N disponible para las plantas (Luo *et al.*, 2004). Proceso contrapuesto a otro coexistente, en el que el CO₂ elevado puede aumentar el C lábil en el suelo y, a su vez, estimular la mineralización de N, incrementando así su disponibilidad para las plantas (Reich & Hobbie, 2012).

Son muchos los estudios que han mostrado que el crecimiento prolongado en una atmósfera enriquecida en CO₂ conduce a un descenso de proteínas y N foliar (Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a; Morcuende *et al.*, 2011; Aranjuelo *et al.*, 2013), y del estado nitrogenado de la planta (Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004) que refleja una modificación en su balance C-N. Aunque la pérdida de N puede atenuarse en plantas fijadoras de N (Cotrufo *et al.*, 1998; Jablonski *et al.*, 2002; Ainsworth *et al.*, 2004; Taub & Wang, 2008), o no tener lugar con un amplio aporte de dicho nutriente (Geiger *et al.*, 1999). Incluso, se han observado aumentos de la concentración de N foliar en CO₂ elevado con una nutrición nitrogenada abundante en *Pinus taeda*, *Salix × dasycylados* y *Alnus rubra* (Gifford *et al.*, 2000). Además, la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado suele ser más severa en plantas deficientes en N (Drake *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999; Gifford *et al.*, 2000; Del Pozo *et al.*, 2005; Reich & Hobbie, 2012), aunque con un bajo aporte de fertilizante nitrogenado, suministrado en proporción directa al crecimiento del trigo en cultivo hidropónico, la aclimatación de la fotosíntesis no tuvo lugar (Farage *et al.*, 1998; Vicente *et al.*, 2012; Vicente *et al.*, 2015a). Rogers *et al.* (1996) mostraron que la aclimatación al CO₂ con N bajo se debería a un desarrollo limitado de los sumideros de asimilados más que a un efecto directo del N en la fotosíntesis. Nuestros estudios evidencian que la espiga, que actuaría como un fuerte sumidero de C y N, no contribuyó a superar la acumulación de carbohidratos foliares durante la post-antesis y la aclimatación de la fotosíntesis tendría lugar (Aranjuelo *et al.*, 2011a). En definitiva, el CO₂ elevado conducirá a un empobrecimiento de la concentración de N, con un descenso de hasta un 15 % del contenido proteico del grano (Taub & Wang, 2008; Högy *et al.*, 2009a), lo cual supondrá una merma en su calidad nutricional que puede comprometer la calidad de sus productos. Una mayor fertilización nitrogenada para paliar los efectos adversos del Cambio Climático es, sin duda, económicamente costoso y contaminante del medio ambiente, lo que insta a continuar investigando para conseguir una mejora en la eficiencia productiva de las especies agrícolas.

Por otra parte, se ha mostrado que la respuesta de las plantas al CO₂ elevado difiere según la forma de N inorgánico disponible para la planta (Bloom *et al.*, 2012; Carlisle *et al.*, 2012). Así, la aclimatación de la fotosíntesis en plantas C₃ parece ser más acusada con NO₃⁻ como única fuente de N que cuando es NH₄⁺ o con ambas formas de N conjuntamente (Bloom *et al.*, 2002; Rachmilevitch *et al.*, 2004; Bloom *et al.*, 2012; Carlisle *et al.*, 2012). Esto se asocia con una inhibición de la asimilación de NO₃⁻ en compuestos orgánicos nitrogenados en la parte aérea de la planta durante el día, como consecuencia de la competencia por el poder reductor entre la fijación fotosintética del CO₂ y la reducción del NO₃⁻ (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2010). Dicho efecto deriva, en parte, de la inhibición de la fotorrespiración por el CO₂ (Foyer *et al.*, 2009) y de la dependencia de la asimilación de NO₃⁻ de dicho proceso (Bloom, 2015). Por el contrario, la asimilación de NO₃⁻ en plantas C₄ parece ser insensible a la [CO₂] atmosférica (Bloom *et al.*, 2012). Por lo general, las plantas tienden a adquirir cada forma de N en función de su disponibilidad en la rizosfera, que puede variar con la actividad microbiana, el estado hídrico, el pH y la capacidad de intercambio catiónico (Epstein & Bloom, 2005). Factores que podrían explicar la variabilidad de resultados obtenidos en la aclimatación al CO₂ elevado (Bloom *et al.*, 2010). El enriquecimiento en CO₂ inhibe también la translocación del NO₂⁻ desde el citosol al interior del cloroplasto, donde tiene lugar la conversión posterior en aminoácidos (Bloom *et al.*, 2002), una respuesta que influye en la asimilación de NO₃⁻ durante el día y la noche (Rubio-Asensio *et al.*, 2015). La asimilación de NH₄⁺ en compuestos orgánicos es energéticamente menos costosa para la planta, lo cual repercute en una mayor velocidad de fijación de CO₂ por área foliar (Guo *et al.*, 2007). El CO₂ elevado favorece la asimilación de NH₄⁺ en las hojas por la inhibición de la fotorrespiración y el consiguiente descenso en el reciclado de NH₄⁺ (Stitt & Krapp, 1999). En plantas de trigo que recibieron NH₄⁺ como única fuente de N, el CO₂ elevado incrementó el área foliar y la pérdida de proteínas fue menor que en aquellas fertilizadas con NO₃⁻ (Bloom *et al.*, 2002), lo cual puede tener repercusiones nutricionales. En trigo cultivado hidropónicamente hasta la senescencia, Carlisle *et al.* (2012) observaron que la adscripción de biomasa y nutrientes a la parte aérea de la planta fue mayor con NH₄⁺ que con NO₃⁻, el cual aumentó la adscripción de nutrientes a la raíz.

Por tanto, la disponibilidad y la forma de N son factores cruciales en la respuesta de las plantas a las futuras condiciones climáticas, que tendrán implicaciones en la calidad de los alimentos, principalmente en el contenido de proteínas y otros nutrientes (Myers *et al.*, 2014), e influirán en la capacidad de las plantas para mitigar los efectos de las emisiones de GEIs antropogénicos. Dichos aspectos, junto a los cambios en la temperatura y la disponibilidad hídrica anticipados con el Cambio Climático, tendrán notables implicaciones en la productividad agrícola y la distribución de las especies vegetales. Esto demuestra la importancia de profundizar en el conocimiento de la interacción del metabolismo del C y N con el fin de poder desarrollar programas específicos de mejora vegetal en el futuro.

CAPÍTULO 2: Objetivos



Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la comprensión de los mecanismos involucrados en la pérdida de N de las plantas que crecen a concentraciones elevadas de CO₂ mediante la investigación integrada de la biomasa, la expresión génica, las posibles modificaciones post-traduccionales, las actividades enzimáticas, los niveles de metabolitos y otros compuestos de las plantas.

La hipótesis de trabajo se fundamenta en la función que desempeña el N en la respuesta de las plantas al crecimiento prolongado en CO₂ elevado, por lo que es de especial interés investigar el papel del movimiento del N en el ambiente radicular y su transporte al interior de la raíz como determinantes de la pérdida de N y proteínas en las plantas que crecen en CO₂ elevado. La estrategia adoptada se fundamenta en la utilización del cultivo hidropónico, que excluye efectos del movimiento de los nutrientes en el medio de la raíz, a la vez que permite modificar la disponibilidad de N y estimar su absorción por la raíz y reparto entre las diferentes partes de la planta, junto al estudio de los factores CO₂ y N en interacción con la temperatura en trigo cultivado en el campo.

Para la consecución de dicho objetivo se plantean los siguientes objetivos concretos:

a) Desarrollo y optimización de una plataforma para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro que incluya un amplio grupo de genes del metabolismo del C y N:

a.1) Identificar genes ortólogos del trigo seleccionados por su especificidad en la respuesta a variaciones en la disponibilidad de C y N, y al CO₂ elevado.

a.2) Diseñar y validar primers específicos.

a.3) Estudiar el patrón de expresión génica de los genes seleccionados en las diferentes condiciones experimentales por qRT-PCR en la hoja bandera y la raíz.

a.4) Evaluar la estabilidad en la expresión de genes de referencia en una amplia variedad de condiciones experimentales para la correcta normalización de los datos de expresión génica.

b) Investigar si el crecimiento en CO₂ elevado limita la absorción del N cuando el movimiento de los nutrientes en el entrono de la raíz no está restringido.

c) Estudiar si la disponibilidad de N, la fase del desarrollo y el periodo de incubación de las plantas modifican el efecto del CO₂ elevado en la capacidad de absorción de N y su distribución en la planta.

d) Caracterizar la respuesta transcripcional al CO₂ elevado y la temperatura alta con dos niveles de fertilizante nitrogenado en el suelo en trigo duro cultivado en el campo en cámaras de gradiente de temperatura y su relación con otros parámetros fisiológicos y bioquímicos.

e) Integrar los datos fisiológicos y bioquímicos con los niveles de transcritos de los genes del metabolismo del C y N mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

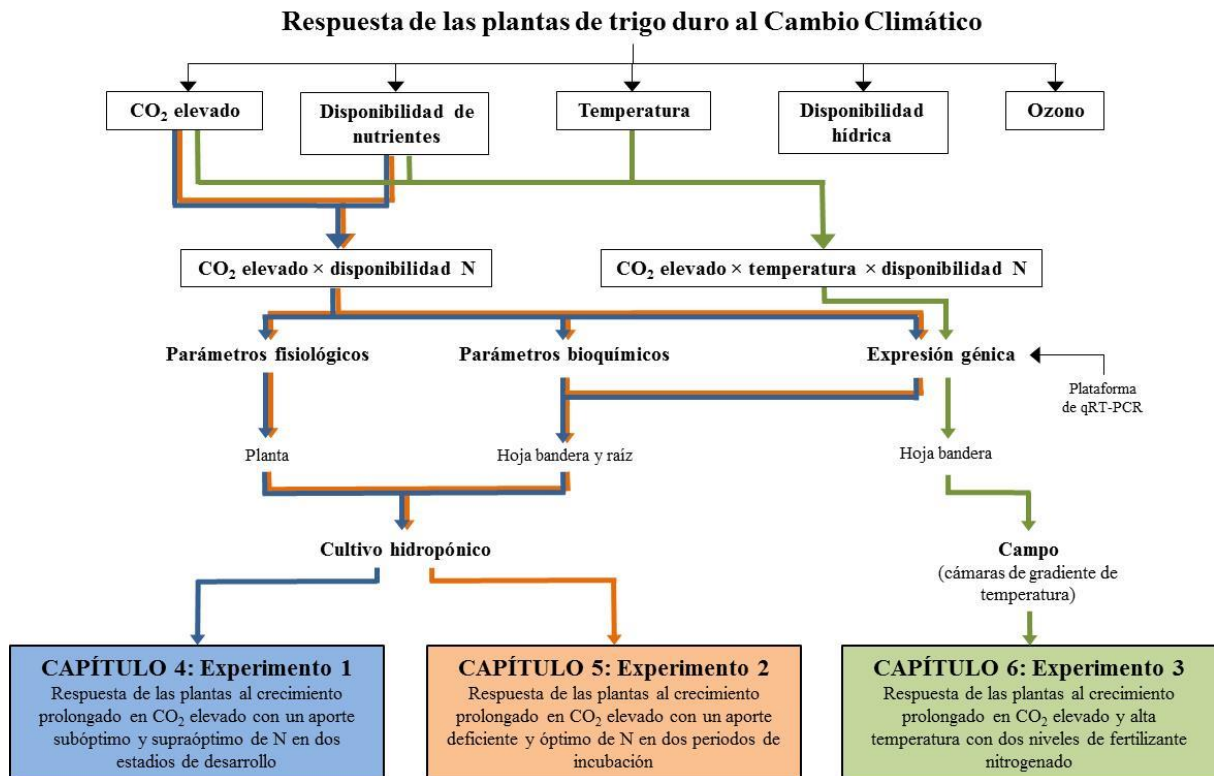


Fig. 2a. Hipótesis de trabajo de la Tesis.

CAPÍTULO 3: Materiales y métodos



3.1. Diseño experimental

3.1.1. Material vegetal

La especie vegetal utilizada en este trabajo de investigación fue el trigo duro variedad Regallo (*Triticum turgidum* Desf. ssp. *durum* cv. Regallo). Esta variedad se caracteriza por un porte medio, caña gruesa, ahijamiento medio, adaptabilidad alta a cualquier situación climática, producción excelente y alto contenido proteico del grano. Las condiciones de crecimiento, los tejidos o partes de la planta que se emplearon para los diferentes análisis contemplados en este trabajo, además del estadio de desarrollo en el que se recogieron las muestras vegetales según la escala Zadoks adaptada para cereales (Zadoks *et al.*, 1974; Lancashire *et al.*, 1991), se describen a continuación para cada uno de los experimentos realizados.

3.1.2. Experimento 1: cultivo hidropónico (abril-julio de 2011)

Este primer experimento se realizó con el objetivo de investigar si el crecimiento prolongado en CO₂ elevado limitaba la absorción de N cuando el movimiento de los nutrientes en la raíz no está restringido, y si la disponibilidad de NO₃⁻ y el desarrollo de la planta modificaban el efecto del CO₂ elevado en la absorción de N y su distribución en la planta. Asimismo, se evaluaron los cambios en el contenido de metabolitos, proteínas, actividades enzimáticas y transcritos del metabolismo del C y N en respuesta al CO₂ elevado y en función de la disponibilidad de N. Se utilizó como sistema experimental los cultivos hidropónicos de trigo duro, utilizando NO₃⁻ como única fuente de N en la solución nutritiva porque constituye la forma de N inorgánico predominante en la mayoría de los suelos agrícolas en los que habitualmente se cultiva el trigo (Carlisle *et al.*, 2012). Presenta mayor movilidad que el NH₄⁺ (Bloom *et al.*, 2002; Hawkesford *et al.*, 2012), y es más sensible que éste a cambios ambientales (Zhong *et al.*, 2014). Además, a diferencia del NH₄⁺ puede acumularse en los tejidos vegetales sin causar efectos tóxicos (Carlisle *et al.*, 2012) y existen evidencias de que el uso del NO₃⁻ como única fuente de N acentúa la respuesta de las plantas al CO₂ elevado (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2010; Rubio-Asensio *et al.*, 2015). El empleo de los cultivos hidropónicos presenta ciertas ventajas además de la ya indicada con anterioridad, puesto que permite modificar la disponibilidad de nutrientes en la solución nutritiva, estimar su absorción por la raíz y el reparto entre las distintas partes de la planta incluida la raíz.

El cultivo de las plantas de trigo se realizó en dos cámaras de crecimiento, con unas dimensiones de 3,6 m de largo × 4,8 m de ancho × 2,4 m de alto, bajo condiciones de máximo control de los factores ambientales y total aislamiento biológico del exterior, en las que se controlaron las condiciones de temperatura, humedad, [CO₂] del aire, luminosidad y fotoperiodo (Fig. 3.1.2a). Durante todo el experimento, la mitad de las plantas de trigo duro utilizadas crecieron en una de las cámaras a una [CO₂] ambiente (A, “ambient”) de 390 μmol·mol⁻¹, mientras que la otra mitad crecieron en la otra cámara a una [CO₂] elevado (E, “elevated”) de 700 μmol·mol⁻¹ (Fig. 3.1.2b). El resto de factores ambientales se mantuvieron constantes para ambas cámaras: 20 °C de temperatura diurna, 15 °C de temperatura nocturna, 60% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 h de luz (8:00-24:00) y 8 h de oscuridad (0:00-8:00) y 400 μmol·m⁻²·s⁻¹ de intensidad luminosa (PAR, “Photosynthetically Active Reaction”) a la altura de la maceta. La concentración de CO₂ en el interior de la cámara se registró

continuamente con un sensor de gas GM20 con tecnología de doble haz infrarrojo NDIR (Vaisala) conectado a un controlador OK412 PID (Osaka Solutions). Los controladores regularon el tiempo de apertura de unas válvulas solenoides para la inyección del CO₂ puro almacenado en bombonas al interior de la cámara de CO₂ elevado, a la altura de los ventiladores para la correcta homogeneización del CO₂ inyectado en el aire. Los datos ambientales de las cámaras se monitorizaron continuamente con un sistema que, cada 10 min, recogía la información de las sondas de temperatura y humedad de alta precisión HMD40Y (Vaisala) y del sensor GM20 en un ordenador.

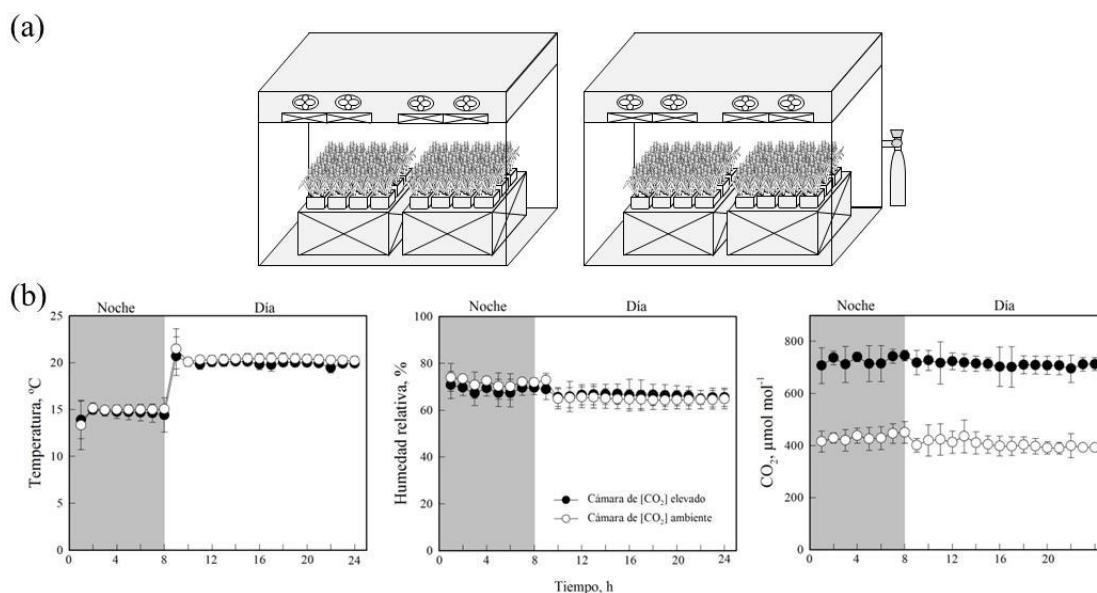


Fig. 3.1.2a. (a) Esquema de las cámaras de crecimiento con ambiente controlado tipo fitotrón (Inkoa Sistemas) utilizadas para la experimentación, y (b) promedios de la temperatura, la humedad relativa y la concentración de CO₂ del aire para cada hora del día en las cámaras de crecimiento durante el experimento.

El 15 de abril de 2011, se pusieron a germinar semillas de trigo en papel Whatmann humedecido en agua desmineralizada en cada una de las cámaras a sus respectivas [CO₂] de crecimiento (Fig. 3.1.2b). El 27 de abril de 2011, a los 12 días después de la siembra (dds), se transfirieron 60 plántulas a 12 macetas especiales de hidroponía en cada cámara. Cada maceta, de 10 L de capacidad de solución nutritiva, albergó 5 plantas. Se utilizaron cestillos para permitir el acceso de las raíces a la solución nutritiva y poliespán como relleno para el sostén de las plantas (Fig. 3.1.2b). La solución nutritiva, con una concentración de NO₃⁻ 5 mM, se mantuvo aireada gracias a unos difusores inmersos en la solución conectados a bombas de aire, para evitar así la anoxia de las raíces y facilitar una distribución homogénea de los nutrientes. Durante las tres semanas siguientes, hasta el 17 de mayo de 2011, se continuó utilizando una solución nutritiva de NO₃⁻ 5 mM con renovación semanal en todas las macetas. A partir de ese momento, cuando las plantas estaban en el estadio de ahijamiento (32 dds, Zadoks 27), la disponibilidad de N en la solución nutritiva fue disminuida en la mitad de las macetas de cada una de las cámaras a una concentración de NO₃⁻ 0,5 mM, mientras que la otra mitad recibió NO₃⁻ 5 mM. Se simuló así unas condiciones ligeramente subóptimas de N con una concentración de NO₃⁻ 0,5 mM (L, “low”) y supraóptimas con NO₃⁻ 5 mM (H, “high”) en la solución nutritiva. El cambio de solución se realizó dos veces por semana durante las siguientes cuatro semanas (plantas de 32 a 52 dds) y, con posterioridad, tres veces por semana hasta el final del experimento (plantas de 52 a 96 dds), debido al mayor agotamiento de solución nutritiva por el incremento del crecimiento de las plantas. La distribución de las macetas en las cámaras de crecimiento se realizó al azar, alternando las

posiciones semanalmente para evitar el efecto que pudiera tener la distribución heterogénea de la luz en el interior de las cámaras.

En la solución subóptima de NO_3^- 0,5 mM, éste fue suministrado por KNO_3 0,25 mM y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,125 mM. Mientras que en la solución supraóptima de NO_3^- 5 mM, éste fue suministrado por KNO_3 3 mM y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM. Para suplir el potasio y calcio contenidos en mayor proporción en la solución con N abundante y mantener la misma fuerza iónica en ambas soluciones, se añadió KCl 2,85 mM y CaCl_2 0,875 mM en la solución subóptima de N y KCl 0,1 mM en la abundante. El resto de macronutrientes y micronutrientes se adicionaron en igual medida: MgSO_4 1 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 mM pH 5,6, NaCl 0,1 mM, orto-ortoEDDHA/ Fe^{3+} 40 μM , H_3BO_3 50 μM , MnSO_4 10 μM , CuSO_4 1 μM , ZnSO_4 1 μM y Na_2MoO_4 0,5 μM . El pH fue controlado diariamente, aplicando el HCl necesario para mantener un valor de 5,6 en cada maceta que garantizara una toma óptima de nutrientes.

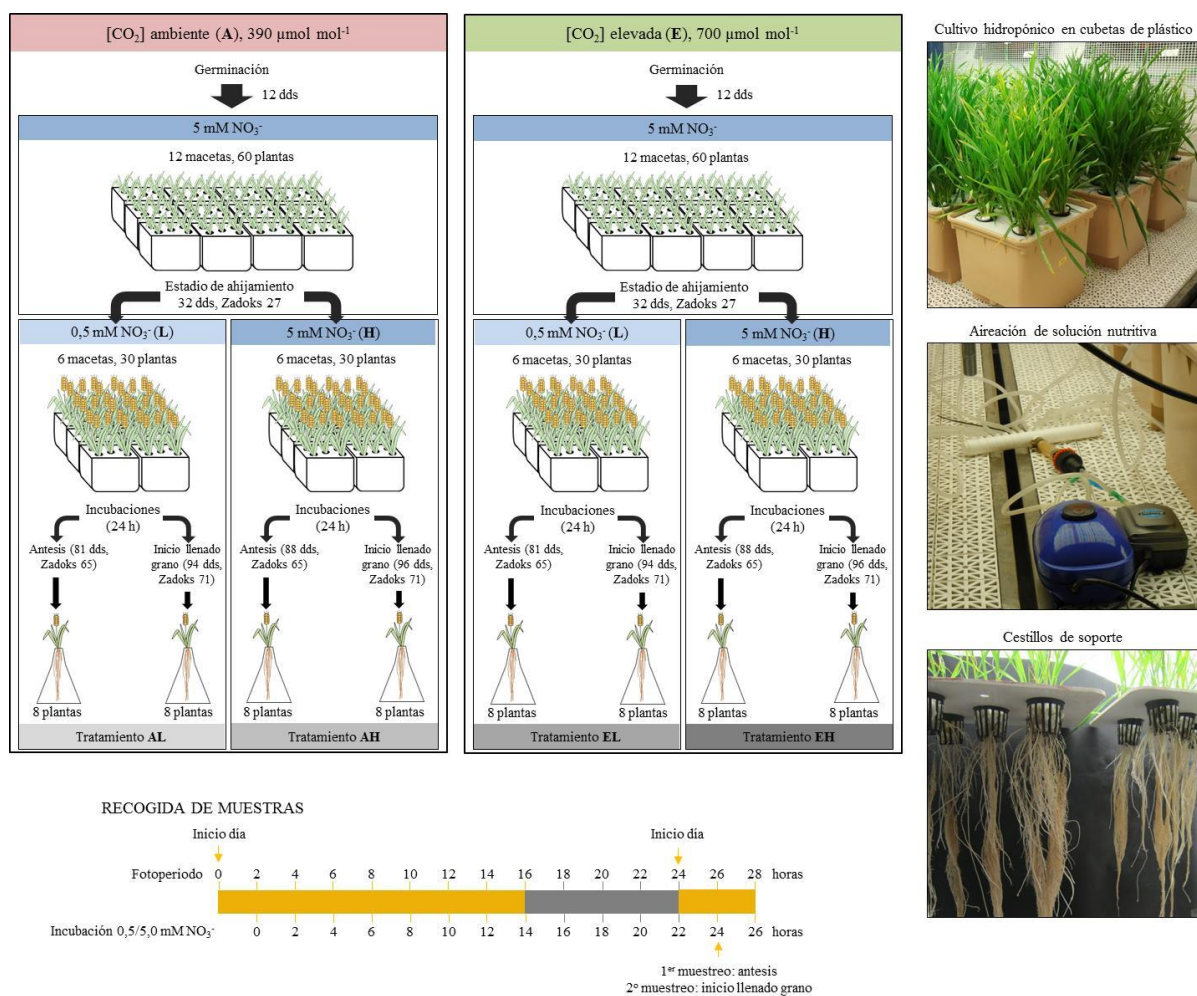


Fig. 3.1.2b. Diseño experimental y recolección de muestras del experimento 1. El experimento constó de cuatro tratamientos diferenciados en la concentración de CO_2 del aire (A, 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; E, 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y en el aporte de N (L, 0,5 mM NO_3^- ; H, 5 mM NO_3^-), con un total de 30 plantas en 6 macetas por tratamiento. La recolección de muestras se realizó a las 24 h después de la renovación de la solución nutritiva en la antesis y el inicio del llenado del grano.

El estadio de desarrollo de las plantas parece influir en la respuesta al crecimiento en una atmósfera enriquecida en CO_2 , especialmente a partir de la emergencia de la espiga que actúa como un fuerte colector de fotoasimilados. Por este motivo, el estudio se centró en etapas avanzadas del desarrollo de

las plantas de trigo duro. El primer muestreo se realizó en la antesis (Ant, Zadoks 65), el 5 de julio (81 dds) en las plantas con un aporte subóptimo de N y el 12 de julio (88 dds) en aquellas con un aporte supraóptimo de N. El segundo muestreo se realizó coincidiendo con el inicio del llenado del grano (ILG, Zadoks 71), el 18 de julio (94 dds) en las plantas con un aporte subóptimo de N y el 20 de julio (96 dds) en las plantas con un aporte supraóptimo. De este modo, se adecuó la recogida de muestras para que todas las plantas estuvieran en el mismo estadio de desarrollo, dado que la disponibilidad de N pareció modificar el desarrollo de las plantas a diferencia de la $[CO_2]$ de crecimiento, cuyo efecto no fue tan evidente. Se realizaron incubaciones de ocho plantas de trigo por tratamiento seleccionadas al azar en cada uno de los dos estadios de desarrollo mencionados 2 h después del comienzo del periodo luminoso en las cámaras. Las incubaciones consistieron en introducir cada planta dentro de un recipiente con un volumen fijo de 2,2 litros de solución nutritiva durante un periodo de 24 h, con la disponibilidad de N correspondiente a cada tratamiento en las mismas condiciones de crecimiento de las plantas (Figs. 3.1.2b y 3.2.2a). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mitad de estas plantas (cuatro por tratamiento y estadio) se utilizaron para determinar los parámetros de crecimiento, la absorción de NO_3^- y de solución nutritiva, y el contenido y la distribución del N en la planta (apartados 3.2.1-3.2.3). La otra mitad de las plantas se utilizaron para la recogida de muestras foliares, correspondientes a la hoja bandera, y de raíces para los diferentes análisis bioquímicos y moleculares (apartados 3.2.3-3.2.8). Cada muestra foliar agrupaba las tres hojas bandera de los tres primeros tallos desarrollados de cada una de las plantas, los cuales se marcaron en etapas tempranas del desarrollo del trigo, a los que nos referiremos como “tallos seleccionados” (véase apartado 3.2.1). Cada hoja bandera de cada uno de los tres tallos se cortó a la altura de la lígula *in situ*, y se congelaron por inmersión en N líquido inmediatamente a fin de inmovilizar el metabolismo, transfiriéndose a sobres de aluminio. Después de separar la parte aérea de la planta de la raíz de cada una de las cuatro plantas, las raíces se escurrieron para retirar el exceso de solución y se lavaron con $CaSO_4$ 1mM para eliminar los nutrientes de la superficie de la raíz (Ritchie, 2006). Con posterioridad, se secaron con papel, y se congelaron de igual modo que la hoja en N líquido. Estas manipulaciones se realizaron con rapidez y no se excedieron los 30 s. Las muestras foliares y radiculares se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. También se llevaron a cabo medidas del intercambio gaseoso de la hoja bandera en ambos muestreos a las 24 h de incubación (apartado 3.2.4). Los análisis realizados en este experimento se esquematizan en el Anexo 1.

3.1.3. Experimento 2: cultivo hidropónico (mayo-julio 2012)

En este segundo experimento, a diferencia del anterior, se indujo una deficiencia nutricional más severa en las plantas en comparación con una disponibilidad óptima de NO_3^- 2,5 mM, por descenso de la concentración de NO_3^- en la solución nutritiva, por inducción de la deficiencia nutricional en una fase más temprana del desarrollo del trigo y por una renovación menos frecuente de la solución. En el anterior experimento, el N se suministró en proporción directa al crecimiento de las plantas, y en éste se trató de causar una mayor limitación de N para simular condiciones más reales al crecimiento del trigo en el campo. Se investigó si la disponibilidad de N modificaba el efecto del CO_2 elevado en la absorción y asimilación de N en la raíz y la hoja bandera en dos periodos de incubación tras la readición de solución nutritiva, así como en los niveles de una amplia variedad de metabolitos y transcritos del metabolismo primario del C y N, y su interrelación con otros parámetros fisiológicos y bioquímicos. Se utilizaron dos cámaras de crecimiento de ambiente controlado, una para cada nivel de CO_2 de crecimiento estudiado. Los factores ambientales se controlaron del mismo modo que en el cultivo hidropónico anterior: 20 °C de temperatura diurna, 15 °C de temperatura nocturna, 60% de

humedad relativa, 390 o 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de concentración de CO_2 en cada cámara (Fig. 3.1.2a), 16 h de luz y 8 h de oscuridad y en torno a 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa a la altura de la maceta.

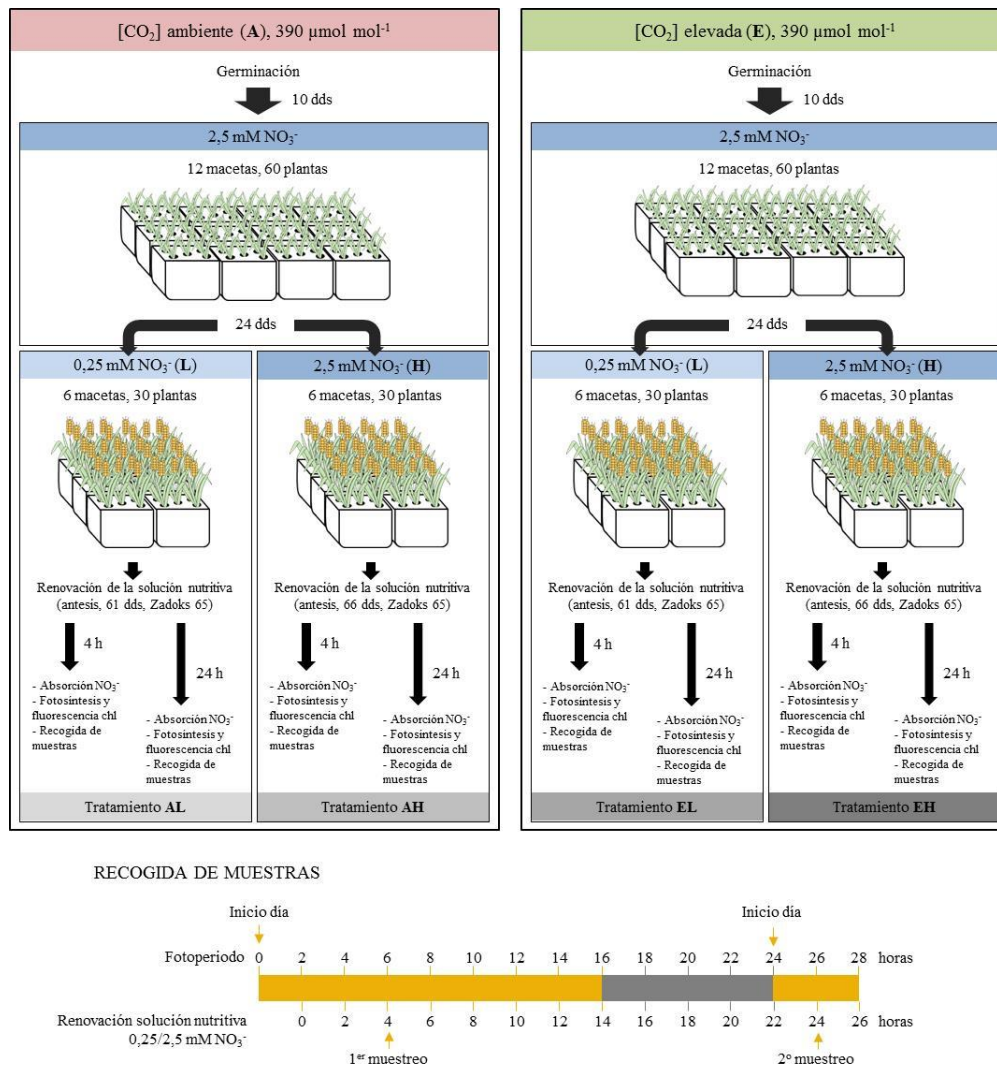


Fig. 3.1.3a. Diseño experimental y recogida de muestras del experimento 2. El experimento constó de cuatro tratamientos diferenciados en la concentración de CO_2 del aire (A, 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y en el aporte de N (L, 0,25 mM NO_3^- ; H, 2,5 mM NO_3^-), con un total de 30 plantas en 6 macetas por tratamiento. La recogida de muestras se realizó a las 4 y 24 h después de la renovación de la solución nutritiva en la antesis.

El 11 de mayo del 2012 se pusieron a germinar en papel Whatmann humedecido con agua desmineralizada unas 270 semillas de trigo duro. La mitad de las semillas se colocaron en una cámara a una $[\text{CO}_2]$ ambiente (A, “ambient”) de 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y la otra mitad en una cámara a una $[\text{CO}_2]$ elevada (E, “elevated”) de 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. El 21 de mayo se seleccionaron las 60 plántulas más homogéneas en tamaño en cada una de las cámaras (10 dds) y se distribuyeron en 12 macetas (Figs. 3.1.3a y 3.1.3b). Las plantas se colocaron en cestillos con poliespán, albergando cada maceta 5 plantas y 10 L de solución nutritiva con aireación proporcionada con varias bombas. Inicialmente se usó una solución de NO_3^- 2,5 mM común en ambas cámaras hasta el 4 de junio (24 dds), momento en el que se cambió la solución de NO_3^- a deficiente (L, “low”, 0,25 mM) en seis de las 12 macetas, manteniéndose en las otras seis macetas un nivel de NO_3^- óptimo (H, “high”, 2,5 mM) en cada cámara de crecimiento (Fig. 3.1.3a). La composición de las soluciones nutritivas empleadas fue la siguiente: KNO_3 0,125

mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,0625 mM, KCl 1,475 mM y CaCl_2 0,4375 mM para el aporte deficiente en NO_3^- 0,25 mM, y KNO_3 1,5 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 mM y KCl 0,1 mM para el aporte óptimo de NO_3^- 2,5 mM; y en igual medida para ambas soluciones MgSO_4 1 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 mM pH 5,6, NaCl 0,1 mM, H_3BO_3 50 μM , MnSO_4 10 μM , CuSO_4 1 μM , ZnSO_4 1 μM , Na_2MoO_4 0,5 μM y orto-ortoEDDHA/ Fe^{3+} 40 μM . Se realizó un seguimiento y control diario del pH, ajustándolo a 5,6 con HCl. Hasta el 28 de junio (48 dds), la solución nutritiva se renovó semanalmente y, posteriormente, dos veces por semana. Las macetas se rotaron semanalmente al igual que en el anterior experimento.

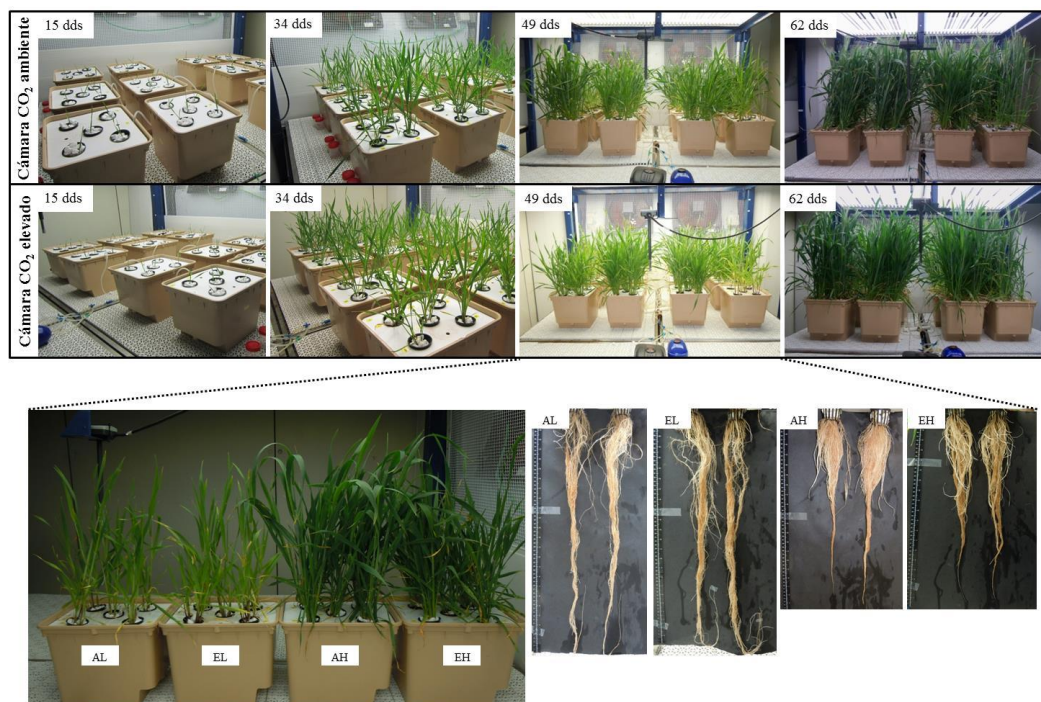


Fig. 3.1.3b. Crecimiento de las plantas de trigo del experimento 2 en cámaras de crecimiento a una $[\text{CO}_2]$ ambiente y elevada (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) en cultivo hidropónico con dos niveles de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-).

En este experimento, a diferencia del anterior, la recogida de material vegetal se realizó en un único estadio de desarrollo correspondiente a la antesis (Ant, Zadoks 65), pero en dos periodos de incubación después de la renovación de la solución nutritiva. Como en el experimento anterior se tuvieron en consideración las diferencias en el desarrollo entre las plantas que crecieron con un suministro de N bajo o alto. Así, el muestreo de las plantas con un aporte de N bajo se realizó el 11 de julio (61 dds) y de aquellas con un aporte de N alto el 16 de julio (66 dds). La recogida de muestras tuvo lugar en dos momentos: a las 4 h de realizar la renovación periódica de la solución nutritiva, correspondiente a 6 h después del inicio del fotoperiodo, para estudiar los efectos del CO_2 elevado en el periodo de máxima fotosíntesis y mayor producción de fotoasimilados y cuando muy posiblemente se está absorbiendo el N en una mayor cuantía (datos no mostrados); y a las 24 h del cambio de solución, a las 2 h del inicio del periodo luminoso, cuando la fotosíntesis es muy activa tras el periodo nocturno y gran parte del N ya ha sido absorbido (Fig. 3.1.3a). La incubación de las plantas se llevó a cabo en la misma maceta utilizada durante el experimento, después de eliminar los restos de la solución anterior por lavado de la maceta con agua y adición posterior de 10 L de solución nutritiva con la concentración de NO_3^- apropiada según el tratamiento. Al igual que en el experimento anterior, se valoraron los distintos parámetros de crecimiento de las plantas, el volumen de solución nutritiva absorbido, el NO_3^- consumido de la solución y el contenido de N por superficie foliar (apartados 3.2.1-

3.2.3). Además, se recogió material vegetal correspondiente a la hoja bandera y la raíz para los análisis bioquímicos y moleculares (apartados 3.2.6-3.2.8). Para disponer de una cantidad de muestra representativa para los diferentes análisis que se plantearon, y por las diferencias en el tamaño de las hojas con la disponibilidad de N, se utilizaron las hojas banderas del tallo principal de 3 plantas agrupadas conjuntamente para cada una de las cuatro réplicas biológicas recogidas por tratamiento. Así, las tres hojas de las tres plantas que constituían una réplica se cortaron en las mismas condiciones de crecimiento a la altura de la lígula y se congelaron en N líquido, transfiriéndose a continuación a un sobre previamente pesado y anotado su peso. Lo cual permitió obtener el peso fresco total de las tres hojas banderas mantenidas en N líquido por pesada inmediata del sobre en una balanza de precisión. Se necesitaron, por tanto, 12 plantas para cada uno de los periodos de incubación, lo que supuso un total de 24 plantas de las 30 disponibles por tratamiento, por lo que se utilizaron las mismas plantas tanto para la recogida de muestras en N líquido como para las medidas de crecimiento. A tal fin, una vez recogida las muestras foliares, se separó la parte aérea de la raíz, ésta se lavó con CaSO_4 1mM como en el experimento 1, se secó y midió su longitud y se pesó para obtener el peso fresco total. La raíz rápidamente se dividió longitudinalmente por la mitad, y una de las mitades se congeló en N líquido para los análisis bioquímicos y moleculares, mientras que la otra mitad se utilizó para obtener el peso seco. Por tanto, para cada una de las cuatro réplicas biológicas de raíz se dispuso de tres mitades longitudinales de cada una de las tres plantas que constituían la muestra foliar congeladas en sobres separadamente con la misma numeración y la nomenclatura a, b y c, que hicieron un total de 12 réplicas por tratamiento y periodo de incubación. La parte aérea de la planta se pesó en fresco y se separó la hoja bandera del primer tallo hijo de la planta (primer tallo en desarrollarse después del tallo principal), que denominaremos como la “hoja bandera 2”. La cual se pesó y con el resultado obtenido se extrapoló a partir del peso fresco a la hoja bandera del tallo principal. Las muestras foliares y radiculares congeladas inmediatamente en N líquido se almacenaron posteriormente a -80 °C hasta su análisis. Además, a las 24 h de incubación se midió el contenido de NO_3^- de la planta, y los distintos parámetros de intercambio gaseoso y de la fluorescencia de la clorofila (apartados 3.2.4, 3.2.5 y 3.2.6.5.1). Los análisis realizados se esquematizan en el Anexo 2.

3.1.4. Experimento 3: cultivo de campo (octubre de 2007-mayo de 2008)

En este experimento se investigó la respuesta transcripcional al CO_2 y temperatura elevados, asociados al Cambio Climático, del trigo duro cultivado en el campo con dos niveles de fertilizante nitrogenado en el suelo, y su relación con otros parámetros fisiológicos y bioquímicos. La experimentación se desarrolló en condiciones naturales propias de nuestro entorno geográfico, en concreto en una parcela de 2600 m^2 en la finca experimental del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (CSIC), localizada en Muñovela, Salamanca ($40^\circ 95' \text{ N}$, $5^\circ 5' \text{ O}$ y 800 m sobre el nivel del mar). El clima es de tipo mediterráneo, con una temperatura media mínima para el mes más frío (enero) de $0,0$ °C, una temperatura media máxima para el mes más cálido (julio) de $27,2$ °C, y una precipitación media anual de 506 mm, según el registro climático de los últimos 20 años (Gutiérrez *et al.*, 2009b). Se emplearon TGCs para simular conjuntamente los aumentos de la $[\text{CO}_2]$ y temperatura previstos para finales de siglo en un cultivo de trigo crecido en el campo bajo condiciones climáticas y edáficas propias de nuestro entorno geográfico (Fig. 3.1.4a). Estas cámaras siguen el modelo descrito por Rawson *et al.* (1995) y se han utilizado frecuentemente en varios experimentos desarrollados por el grupo de investigación (Del Pozo *et al.*, 2005; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005; Del Pozo *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2007; Alonso *et al.*, 2008a; Alonso *et al.*, 2008b; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Aranjuelo *et al.*, 2011b; Morcuende *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011a; Gutiérrez *et al.*, 2013).

Las TGCs con unas dimensiones de $9 \times 2 \times 1,7$ m estaban constituidas por una armazón de aluminio con paredes de policarbonato rígidas y un tejado de polietileno resistente a rayos UV. Dicho material posee una buena transmisión de la radiación fotosintéticamente activa y ultravioleta, que permite tener unas condiciones similares al exterior. El cultivo, la recogida de muestras y las medidas fisiológicas y bioquímicas se realizaron por el grupo de investigación con anterioridad al inicio de esta Tesis Doctoral. No obstante, la evaluación del nivel de expresión de los genes del metabolismo del C y N en la hoja bandera del trigo cultivado en el campo en las TGCs con la plataforma de qRT-PCR desarrollada en esta Tesis Doctoral y la integración de estos datos, junto a los obtenidos previamente por el equipo investigador, han constituido una parte de la labor investigadora asociada a este trabajo.



Fig. 3.1.4a. Cámaras de gradiente de temperatura montadas sobre el cultivo de trigo duro en la anualidad 2007-2008.

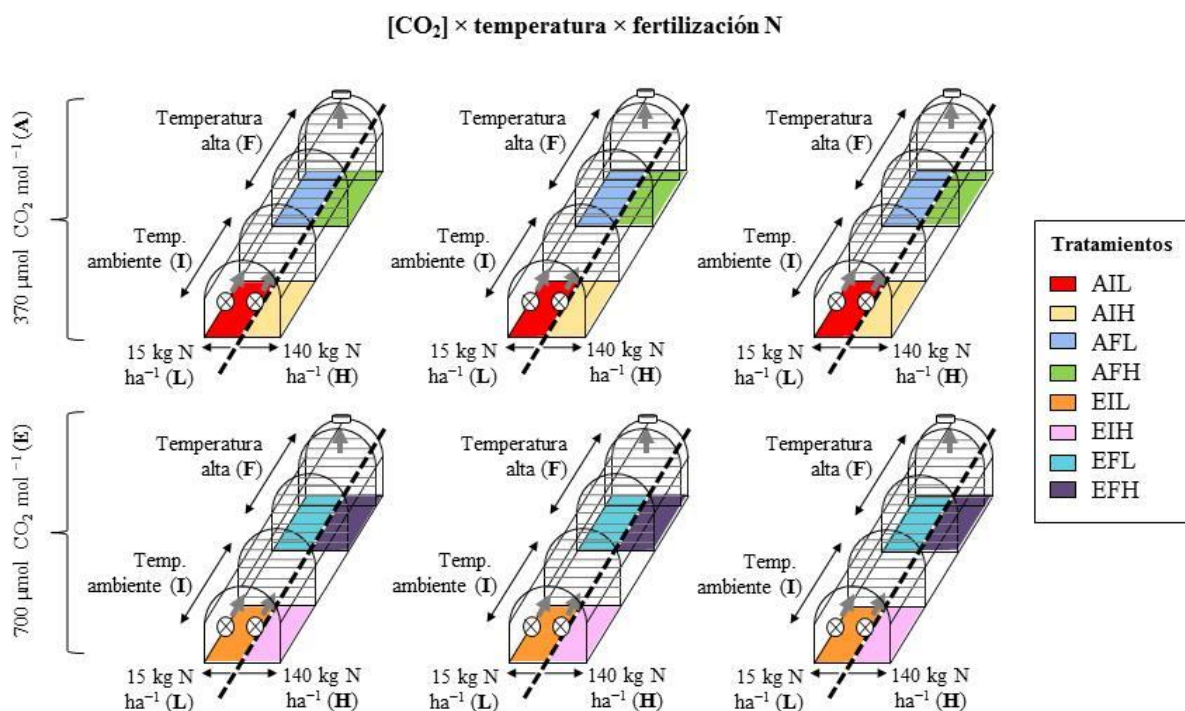


Fig. 3.1.4b. Representación esquemática del experimento 3. El experimento constó de ocho tratamientos diferenciados en la concentración de CO₂ del aire (A, 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura (I, ambiente; F, ambiente + 4 °C) y en la fertilización con N (L, 15 kg N ha⁻¹; H, 140 kg N ha⁻¹). La recogida de muestras se realizó en la antesis. Los detalles de las cámaras de gradiente de temperatura se indican en Gutiérrez *et al.* (2009b).

Las semillas de trigo duro se sembraron con una densidad de $200 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ y una separación entre filas de 0,13 m en un suelo arenoso-arcilloso de pH alcalino el 29 de octubre de 2007, que previamente se había abonado con P y K (en forma de P_2O_5 y K_2O , respectivamente) a razón de $60 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Después de la emergencia de las plántulas, se estableció el lugar y la disposición de las seis TGCs al azar en la parcela, tres para cada uno de los dos niveles de CO_2 estudiados. En el lugar de ubicación de las seis TGCs se efectuó una aplicación manual de fertilizante nitrogenado disuelto en agua en forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en cada una de las mitades longitudinales de cada módulo de las TGCs, con una distribución al azar, el 15 de febrero de 2008. Así, se aplicaron las cantidades de fertilizante necesarias para conseguir dos niveles de fertilización: unos $15 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ para el tratamiento deficiente en N (L, “low”) y $140 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ para el tratamiento con abundancia de dicho nutriente (H, “high”) (Fig. 3.1.4b). Los dos niveles de N fueron establecidos en base a experimentaciones previas en el mismo suelo. El cultivo se regó semanalmente utilizando un sistema de riego por goteo que aportaba las cantidades de agua equivalentes a la precipitación media en la zona para cada mes. El 27 de febrero de 2008 se montaron definitivamente las seis TGCs sobre el cultivo siguiendo la disposición antes diseñada (Fig. 3.1.4a).

En tres de las seis TGCs seleccionadas al azar se incrementó la $[\text{CO}_2]$ atmosférica a $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (E, “elevated”) mediante la inyección del gas puro en los ventiladores de entrada durante las horas de luz (Fig. 3.1.4c). Para ello se emplearon controladores PID (TTM 005/TTM009 series, PID Eng&Tech) que monitorizaban la concentración del gas y regulaban una válvula solenoide para su inyección cuando fuese necesario (Gutiérrez *et al.*, 2009b). No se insufló CO_2 durante la noche ya que poco o ningún efecto se observó en la respiración durante las horas nocturnas (Davey *et al.*, 2004). En las otras tres TGCs la $[\text{CO}_2]$ fue la ambiental, correspondiente a $370 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. La diferencia de temperatura entre los extremos de las cámaras se fijó en una temperatura ambiental (I, temperatura al inicio de la cámara) y una temperatura $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mayor que la ambiental (F, temperatura al final de la cámara). La temperatura y la humedad fueron medidas con sensores HMD50 (Vaisala) conectados a un ordenador mediante conversores analógico-digitales Microlink 751 (Biodata Ltd) (Fig. 3.1.4c). El conjunto de ventiladores y calefactores utilizados en el diseño de las TGCs se ajustaron para mantener estas condiciones térmicas.

En la antesis (Ant; Zadoks 65), el 19 de mayo de 2008 se recogieron muestras foliares correspondientes a la hoja bandera en el momento de máxima fotosíntesis, entre las 4 y 6 h después del comienzo del periodo luminoso. Para disponer de material vegetal suficiente se cortaron cuatro hojas banderas para cada una de las cuatro repeticiones y tratamientos, y se agruparon conjuntamente. Las hojas se cortaron a la altura de la lígula y se introdujeron inmediatamente en N líquido, transfiriéndose a continuación a sobres de aluminio. Se mantuvieron en N líquido hasta su traslado y almacenaje en el laboratorio a -80°C para su uso posterior. En paralelo, se recogieron muestras para la estimación del crecimiento de las plantas y el análisis del contenido de N. Con esta finalidad se contó el número de plantas en 0,5 m de dos hileras adyacentes, y se cortaron 5 plantas de cada uno de los extremos opuestos de las dos hileras consideradas. Las 10 plantas para cada uno de los tratamientos se introdujeron en sacos convenientemente marcados y se transportaron al laboratorio, se estimó el peso fresco total y el de las diferentes partes en las que se fraccionó la planta, en concreto, la hoja bandera, resto de hojas, tallos (primer entrenudo y resto del tallo) y espiga, además del peso seco y el contenido de N siguiendo una metodología similar a la descrita en el apartado 3.2. En esta Tesis se utilizó material foliar correspondiente a la hoja bandera recogida en N líquido y almacenado a -80°C para el análisis de la expresión de los genes del metabolismo del C y N (apartado 3.2.8). Estos datos se relacionaron con los parámetros bioquímicos obtenidos en ese mismo material vegetal previamente

por integrantes del grupo de investigación y con los parámetros de crecimiento en las muestras destinadas a tal fin como se describe con anterioridad, los cuales se detallan en los Resultados (apartado 6.1.1).

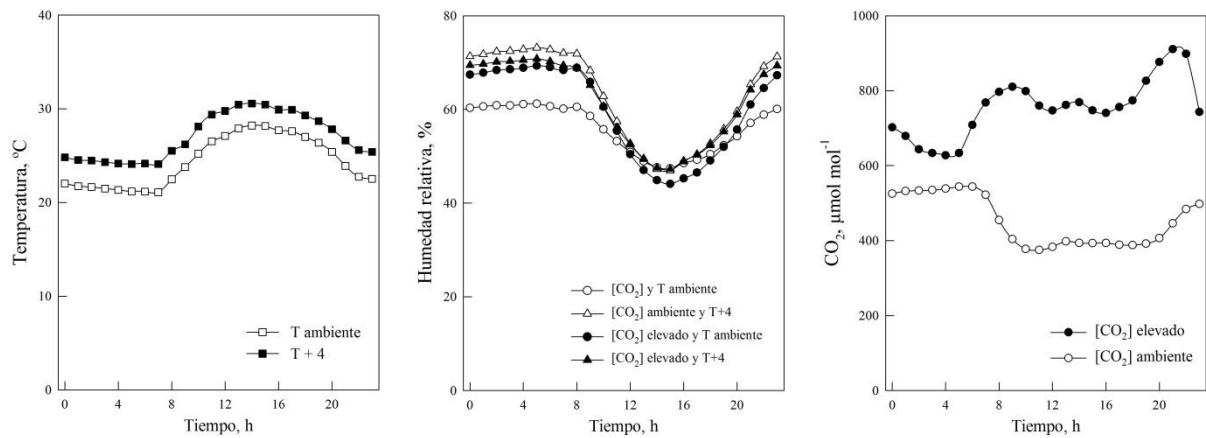


Fig. 3.1.4c. Medidas diarias de la temperatura, la humedad y la concentración de CO₂ en las cámaras de gradiente de temperatura. Se promedió la temperatura media al inicio (T ambiente) y al final (T + 4) de las cámaras (n=6), la humedad relativa para cada [CO₂] y temperatura (n=3) y la concentración de CO₂ en las cámaras con una concentración ambiental o elevada (n=3).

3.2. Metodología

3.2.1. Parámetros de crecimiento

En el experimento 1, como se ha indicado anteriormente, en fases tempranas del desarrollo de las plantas de trigo se marcaron los tres primeros tallos de cada planta, es decir, el tallo principal y los dos siguientes tallos hijos. Estos tres tallos se denominaron “tallos seleccionados”. Para la estimación del crecimiento tanto en la antesis como en el inicio del llenado de grano, se separaron de estos tallos seleccionados la espiga, la hoja bandera, el último entrenudo del tallo, el resto del tallo y el resto de hojas. Mientras que del resto de la planta (sin los tres tallos mencionados) se separaron el resto de la parte aérea y la raíz. A continuación, se resumen las partes separadas de las plantas:

$$\text{Planta} = \text{Parte aérea} + \text{Raíz}$$

$$\text{Parte aérea} = \text{Total tallos seleccionados} + \text{Resto parte aérea}$$

$$\text{Total tallos seleccionados} = \text{Espiga} + \text{Hoja bandera} + \text{Último entrenudo tallo} + \text{Resto del tallo} + \text{Resto hojas}$$

Se utilizaron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, parte analizada y fase del desarrollo de las plantas. En las distintas partes de las plantas indicadas, así como en la planta entera, se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento:

- a) Peso fresco (PF) y peso seco (PS), expresado en g. Para las medidas se utilizó una balanza electrónica XT 220A (Precisa). Para la determinación del PS, las muestras se secaron en una estufa Digitronic (JP Selecta) a 60 °C durante 48 h.
- b) El área verde, expresada en cm². Las medidas se realizaron con un planímetro electrónico Li-3050A (Li-Cor). Para la espiga, el área obtenida se multiplicó ×2 al considerar dos caras; para el tallo, teniendo en cuenta el área de un cilindro ($2\pi rh$), se calculó como $\text{área} \times \pi$ (Thorne, 1974).
- c) Contenido de agua, expresado en % y calculado como $[(PF - PS) / PS] \times 100$.
- d) Razón parte aérea:raíz, resultado del cociente entre el peso seco de la parte aérea y la raíz.
- e) Peso seco por área foliar, expresado en g·PS m⁻². Se utilizó el área foliar que se midió al valorar las clorofilas (apartado 3.2.6.1).
- f) El número de espigas y el número de tallos totales, con y sin espiga, independientemente de su tamaño.
- g) La longitud de la raíz, en cm.

En el experimento 2, las plantas se fraccionaron únicamente en la hoja bandera del tallo principal, la hoja bandera 2, la parte aérea y la raíz:

$$\text{Planta} = \text{Parte aérea} + \text{Raíz}$$

$$\text{Parte aérea} = \text{Hoja bandera} + \text{Hoja bandera 2} + \text{Resto parte aérea}$$

Se utilizaron ocho repeticiones biológicas (al considerar inapreciables las diferencias en estos parámetros en las plantas a las 4 o 24 h de incubación) por tratamiento, parte analizada y periodo de incubación. En ellas se determinaron, de forma similar al experimento 1, los siguientes parámetros:

- a) Peso fresco (PF) y peso seco (PS).
- b) Contenido de agua.
- c) La razón parte aérea:raíz.
- d) El peso seco por área foliar.
- e) El número de tallos totales.
- f) La longitud de la raíz.

3.2.2. Absorción de nitrato y de solución nutritiva

La absorción de NO_3^- por las raíces fue determinada mediante la técnica de agotamiento (BassiriRad *et al.*, 1999), empleando incubaciones de plantas en un volumen fijo durante un intervalo de tiempo y midiendo el NO_3^- absorbido por la planta durante ese periodo, a la vez que se valoró el volumen de solución nutritiva absorbido. En el experimento 1, las incubaciones se llevaron a cabo en la antesis y al inicio del llenado del grano al introducir cada planta dentro de un erlenmeyer de 2,5 L de capacidad con un volumen de 2,2 L de solución nutritiva 0,5 o 5 mM de NO_3^- , según el tratamiento, previa eliminación de la solución nutritiva residual que pudieran tener las raíces del cultivo hidropónico. Se incubaron ocho plantas para cada disponibilidad de N, nivel de CO_2 de crecimiento y fase de desarrollo de las plantas de trigo en las mismas condiciones de crecimiento de los cultivos hidropónicos (cuatro para la recogida de muestras de hojas y raíces para las análisis bioquímicos y moleculares, y las otras cuatro para la determinación de NO_3^-). Después de agitar la solución inicial con la planta, se recogió una alícuota de 500 μL de solución para determinar la concentración exacta de NO_3^- antes de empezar la incubación. El recipiente se protegió de la luz con papel de aluminio y se selló con parafilm para evitar la evaporación de la solución (Fig. 3.2.2a). Transcurrido el periodo de incubación de 24 h, se recogió otra alícuota de la solución para determinar la concentración de NO_3^- y así obtener la absorción de NO_3^- (AN) por unidad de masa de raíz ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) o por planta ($\text{mmoles}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), según la siguiente ecuación:

$$\text{AN} = \frac{(V_{\text{inicial}} \times cN_{\text{inicial}}) - (V_{\text{final}} \times cN_{\text{final}})}{\text{tiempo}} \times \frac{1}{R_{\text{ps}}}$$

donde V_{inicial} y V_{final} son el volumen de solución nutritiva al principio y final del periodo de incubación, cN_{inicial} y cN_{final} son las concentraciones de NO_3^- al comienzo y final, respectivamente, y R_{ps} es el peso seco de la raíz o de la planta, siendo el tiempo 24 h. V_{inicial} y V_{final} se valoraron con anterioridad y posterioridad a la incubación después de pesar el conjunto de la planta y el erlenmeyer con la solución, lo cual permitió también obtener el volumen de solución absorbido por masa de raíz o por planta, expresado en $\text{mL}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y $\text{mL}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. La concentración de NO_3^- se calculó por espectrofotometría según Cawse (1967) (apartado 3.2.6.5.1). Las cuatro plantas que se emplearon para la determinación de NO_3^- se recogieron con posterioridad para ser utilizadas en la estimación del crecimiento y del contenido de N total en las distintas partes de la planta mencionadas (apartado 3.2.3). Se utilizaron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento y fase del desarrollo de las plantas.

De modo similar, se calculó la absorción de solución y NO_3^- por peso de raíz y por planta en el experimento 2 en la antesis con cuatro repeticiones biológicas por tratamiento y periodo de incubación. Para ello, una vez renovada la solución nutritiva se tomaron medidas del volumen de solución y de la concentración de NO_3^- al inicio de la incubación y a las 4 y 24 h en las cubetas

utilizadas para el crecimiento de las plantas (Fig. 3.1.3b). Posteriormente, el resultado obtenido por cubeta se promedió por planta y por unidad de masa de raíz al pesarlas. También se realizó un seguimiento del NO_3^- absorbido durante la duración del experimento al medir el volumen de solución y la concentración de NO_3^- al inicio y final de cada renovación de la solución nutritiva, con seis repeticiones por tratamiento y periodo de incubación.



Fig. 3.2.2a. Incubaciones de las plantas de trigo del experimento 1.

3.2.3. Determinación de nitrógeno

El N total en el material vegetal de los experimentos 1 y 2 se determinó por el método Kjeldahl descrito en Horneck & Miller (1998). Este método, desarrollado por J. Kjeldahl en 1883, consiste en una digestión con H_2SO_4 , catalizadores y sales a temperaturas altas que convierten el N orgánico del material vegetal en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que se disocia en medio básico para producir NH_4^+ , el cual puede cuantificarse por diversos métodos (Horneck & Miller, 1998). El NH_4^+ medido permite estimar todas las formas de N en la muestra, excepto los nitratos y nitritos.

Las muestras se secaron en una estufa a 60°C durante 1 h y, posteriormente, se dejaron atemperar dentro de desecadores para evitar su rehidratación. El material seco se molió en un molino MFC (Culatti), del cual se pesó una cantidad de 0,1 g por muestra. Dicha cantidad se colocó en un tubo de ensayo de cristal pyrex junto a aprox. 0,3 g de una mezcla catalizadora –que contenía Se, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y K_2SO_4 – y 4 mL de H_2SO_4 al 96% (v/v). El Se y el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de la mezcla catalizadora se aplicaron como catalizadores y el K_2SO_4 para elevar el punto de fusión del H_2SO_4 . Se estableció el siguiente gradiente de temperatura durante 3 h mediante el empleo de un bloque térmico regulado por el controlador dTRON 16.1 (Jumo): la primera hora a 150°C , la segunda a 250°C y la tercera a 350°C , para seguidamente descender a una temperatura ambiente de unos 25°C . Posteriormente, las muestras se transfirieron a matraces de 50 mL, se enrasaron con agua destilada y se conservaron a 4°C hasta su análisis.

La cuantificación del N total reducido en forma de NH_4^+ se realizó con el kit comercial Ammonia Rapid Kit (Megazyme). Este método enzimático se fundamenta en la reacción del NH_4^+ con el 2-oxoglutarato para formar ácido L-glutámico y NADP^+ , en presencia de NADPH y del enzima GDH

(Fig. 3.2.3a). Primeramente, a las muestras se añadieron volúmenes variables de un tampón TEA (trietanolamina) 1M pH 7,2 y KOH 5M hasta obtener un pH de 3-4, con objeto de que la reacción enzimática no fuera demasiado lenta. Después se centrifugaron a 13.200 rpm durante 3 min, y una alícuota del sobrenadante, junto con tampón TEA 0,1 M pH 8,0 y NADPH en exceso, se colocó en cubetas de cuarzo para la medida de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UV-Visible 8453 (Hewell-Packard). El descenso de absorbancia medido tras añadir 3 U de GDH (resuspendido en TEA 0,1 M), se correspondió con la cantidad de NADP^+ (Fig. 3.2.3a). Teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), la cantidad de NADP^+ formado es estequiométricamente igual a la cantidad de NH_4^+ en la muestra. Los análisis se realizaron con una dilución de la muestra que tuviera una cantidad de 0,2 a 7 μg de NH_4^+ en la cubeta para garantizar que se cumpliera la linealidad en la Ley de Lambert-Beer.

La cantidad de NH_4^+ permitió calcular el porcentaje de N total en el material vegetal. A partir de este valor, en el experimento 1 se estimó el contenido de N de cada órgano (N_i) en $\text{mg N} \cdot \text{órgano}^{-1}$ (utilizando el peso seco de cada órgano), el N por superficie foliar de la hoja bandera en $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ (utilizando el peso seco por área foliar) y la distribución porcentual de N entre órganos (N_d), calculada como el porcentaje del N de cada órgano sobre el total de la planta. En el experimento 2, se midió el contenido de N orgánico (contenido total de N menos el contenido del N correspondiente al NO_3^-) por superficie foliar de la hoja bandera y el contenido del N en la planta entera para utilizarlo en el cálculo del porcentaje de NO_3^- por N total (apartado 3.2.6.5.1). Se analizaron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, parte de la planta, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación.

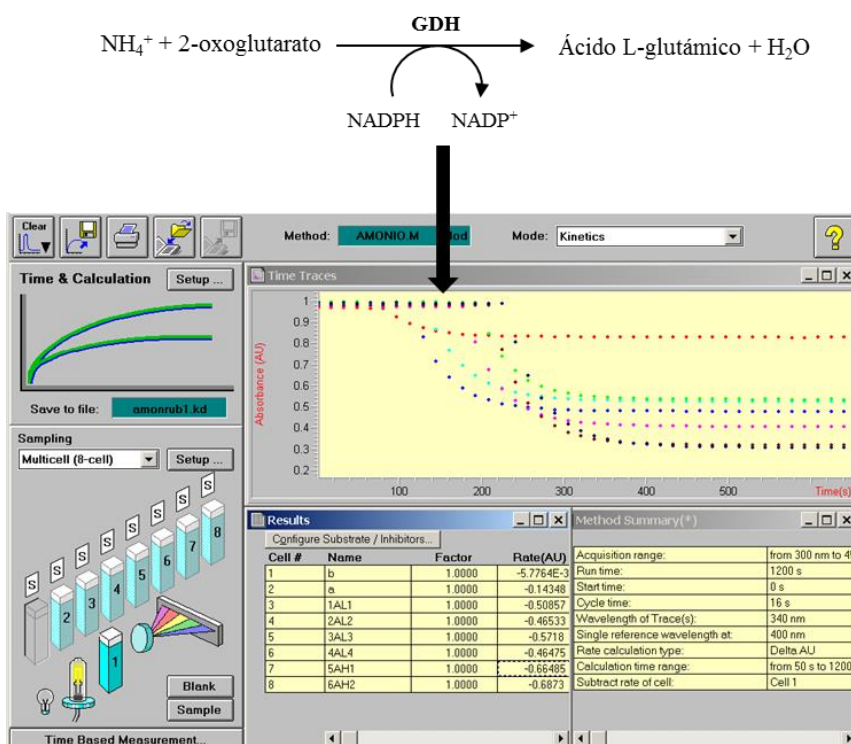


Fig. 3.2.3a. Esquema de las reacciones implicadas en la determinación de amonio. Se produce un descenso de absorbancia en el espectrofotómetro debido a la oxidación del NADPH, equivalente al contenido de N en las muestras. GDH, glutamato deshidrogenasa.

3.2.4. Medida de la fotosíntesis *in vivo*

Se realizaron medidas del intercambio gaseoso en la hoja bandera con el analizador de gases en el infrarrojo (IRGA) CIRAS-2 (PP Systems) con operación diferencial en circuito de aire abierto con una cámara de asimilación adaptada (Fig. 3.2.4a). En la cámara de asimilación, con una superficie de medida de $1,75 \text{ cm}^2$ ($25 \times 7 \text{ mm}$), se colocó la parte central de la hoja bandera para la medida en tiempo real de parámetros como A_n , g_s , E y C_i . En el experimento 1 se tomaron las medidas del intercambio gaseoso en la hoja bandera de 5 plantas por tratamiento y estadio de desarrollo, a partir de las 2 h de inicio del día y antes de que pasaran 7 h, a una intensidad luminosa de $1.500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un flujo de aire de $311 \pm 16 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ proporcionada por el sistema Peltier del analizador, un déficit de presión de vapor de $1.01 \pm 0.13 \text{ kPa}$ y una concentración de CO_2 variable dentro de un programa específico de medida. Se empezó a medir a la $[\text{CO}_2]$ de crecimiento de las plantas, seguido de un descenso hasta $60 \mu\text{mol mol}^{-1}$ para continuar midiendo a diferentes puntos hasta una concentración de $2.000 \mu\text{mol mol}^{-1}$. De este modo, se construyeron las curvas de respuesta de la fotosíntesis al aumento de $[\text{CO}_2]$ que sirvieron para determinar la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco ($V_{c,\text{max}}$), la velocidad de transporte electrónico (J), la velocidad de respiración mitocondrial en la luz (R_d) y la g_m . En el experimento 2, las medidas se llevaron a cabo en la hoja bandera de 6 plantas por tratamiento a las 24 h de incubación, tomadas a las 2-7 h de inicio del día, a una intensidad luminosa de 300 y $1.000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un flujo de aire de $286 \pm 10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$, un déficit de presión de vapor de $0.89 \pm 0.20 \text{ kPa}$ y una concentración de CO_2 de 390 y $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$.

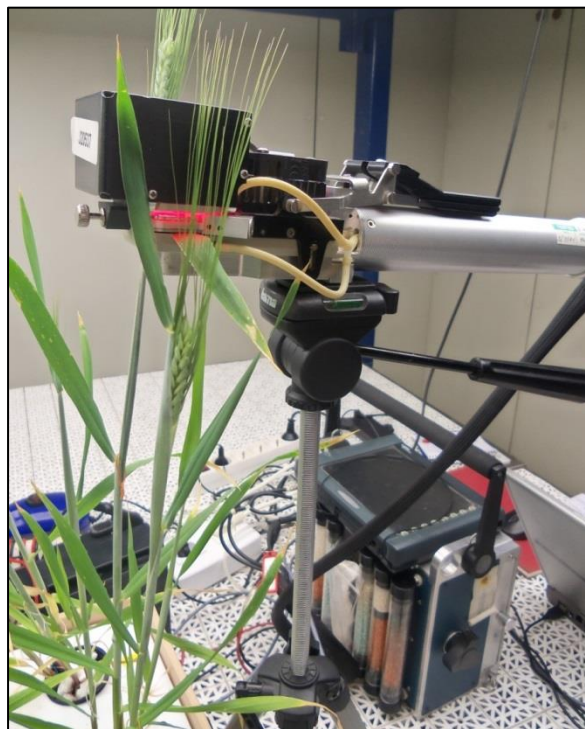


Fig. 3.2.4a. Medida de la fotosíntesis *in vivo* en la hoja bandera con el analizador de gases en el infrarrojo CIRAS-2.

A partir de los datos de A_n y C_i obtenidos con el analizador de gases en el infrarrojo, se pueden obtener las curvas de respuesta de la fotosíntesis con respecto a la presión parcial de CO_2 en el cloroplasto, A_n/C_c , utilizando el modelo de Farquhar *et al.* (1980), modificado posteriormente por Sharkey *et al.*

(2007) (apartado 1.5.1). La asimilación de CO₂ se asume que se corresponde con la velocidad de fotosíntesis más baja considerando las tres posibles limitaciones: por Rubisco (Ecuación 1), por la regeneración de la RuBP (Ecuación 2) y por TPU (Ecuación 3)

$$A_n = V_{c,\max} \left[\frac{C_c - \Gamma^*}{C_c + K_C (1 + O/K_O)} \right] - R_d \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$A_n = J \frac{C_c - \Gamma^*}{4C_c + 8\Gamma^*} - R_d \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$A_n = 3\text{TPU} - R_d \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde C_c y O son las presiones parciales de CO₂ y O₂ respectivamente en el cloroplasto; K_C y K_O son las constantes de Michaelis-Menten de la Rubisco para la carboxilación y oxigenación respectivamente; Γ^* es el punto de compensación fotosintético, que se corresponde con la concentración de CO₂ en el cloroplasto a la que, en ausencia de respiración mitocondrial, la velocidad de asimilación es cero, siendo la velocidad de oxigenación el doble que la de carboxilación; R_d representa el CO₂ emitido distinto al de la fotorrespiración en la luz, que es fundamentalmente debido a la respiración mitocondrial; y TPU es la velocidad de uso de TP, aunque puede tratarse de cualquier C exportado del ciclo de Calvin-Benson. El valor de J proporcionado en la Ecuación 2 refleja la velocidad de transporte de electrones para mantener la reducción de NADP⁺ para la regeneración de RuBP a la intensidad luminosa de medida. La exactitud de este modelo de respuesta de la fotosíntesis depende de la precisión con la que se determinan las propiedades cinéticas de la Rubisco, que se encuentran relativamente conservadas en especies C₃, por lo que se usan unos parámetros cinéticos comunes (Sharkey *et al.*, 2007). En las curvas A_n/C_c se utilizó C_c en vez de C_i ya que el CO₂ es reducido en el estroma del cloroplasto y se obtuvo a partir de la ecuación $C_c = C_i - A_n/g_m$. Con este modelo se puede calcular el valor de g_m a partir de las ecuaciones 1 y 2 reemplazando C_c por la ecuación anterior. Con estas consideraciones y utilizando la hoja de cálculo proporcionada en Sharkey *et al.* (2007), se calcularon $V_{c,\max}$, J , R_d y g_m .

Además, tanto en el experimento 1 como en el 2, se calculó el efecto directo a corto plazo del aumento de la [CO₂] atmosférica en la velocidad de asimilación fotosintética del CO₂, que consiste en la razón entre A_n en plantas crecidas en CO₂ ambiente medida a una [CO₂] elevada y las mismas plantas medidas a una [CO₂] ambiente (Bunce, 2001). El efecto de aclimatación a largo plazo del aumento de la [CO₂] atmosférica en la velocidad de asimilación fotosintética del CO₂ se calculó como la razón de A_n de plantas crecidas en [CO₂] elevado con respecto a plantas crecidas en [CO₂] ambiente, medidas a 700 μmol CO₂·mol⁻¹. El efecto neto del CO₂ en la fotosíntesis se obtuvo del producto de ambos parámetros:

$$\text{Efecto neto} = \text{Efecto directo} \times \text{Efecto de aclimatación}$$

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

donde “a” y “e” son las condiciones de crecimiento de las plantas (390 y 700 μmol CO₂·mol⁻¹, respectivamente), y “A” y “E” son las condiciones de medida de A_n (390 y 700 μmol CO₂·mol⁻¹, respectivamente). También se determinó la eficiencia en el uso del agua (WUE, “Water Use Efficiency”) como el cociente de A_n y E medidas a la [CO₂] de crecimiento de cada planta, y la

eficiencia en el uso de N en la fotosíntesis (PNUE, “Photosynthetic Nitrogen Use Efficiency”) como el cociente de A_n medida a la $[CO_2]$ de crecimiento y la concentración de N foliar en la hoja bandera (Aranjuelo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

3.2.5. Medida de la fluorescencia de la clorofila

La luz absorbida por los complejos antena de los fotosistemas puede ser transferida a los centros de reacción como energía de excitación para continuar el proceso fotosintético, disiparse como calor y, en menor medida, reemitirse como energía lumínica, lo que se conoce como fluorescencia de la clorofila (Baker, 2008). Estos tres procesos son competitivos, de modo que al medir el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila se adquiere información sobre los cambios en la eficiencia fotoquímica y la disipación de calor (Maxwell & Johnson, 2000). Los distintos parámetros relativos a la fluorescencia de la clorofila se midieron en la parte media de la hoja bandera de las plantas de trigo del experimento 2 a las 24 h de incubación en la antesis, del mismo modo que en Pérez *et al.* (2011b). Se realizaron medidas en 6 repeticiones biológicas por tratamiento (6 plantas distintas), a una $[CO_2]$ ambiente y elevado (390 y 700 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente), y entre las 2 y 7 h de inicio del día, para lo cual se utilizó un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada PAM-2000 (Walz) (Fig. 3.2.5a).

Después de cubrir secciones de hoja durante 20 min se consiguió un estado adaptado a la oscuridad, en el que la plastoquinona Q_A se oxida completamente y los centros de reacción del PSII permanecen abiertos, con la capacidad de reducir Q_A . Con la exposición de la hoja a una luz modulada tenue, se obtuvo la fluorescencia mínima en el estado adaptado a la oscuridad, F_o (Fig. 3.2.5a). Previamente, se aplicó a la hoja un pulso de luz del infrarrojo lejano para provocar la excitación del PSI y la eliminación de electrones de Q_A (Baker, 2008). Seguidamente, se expuso la hoja a un pulso saturante de luz corto (0,8 s) e intenso (aprox. 8.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), que condujo a la completa reducción de Q_A y el cierre de los centros de reacción del PSII, obteniendo así la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la oscuridad, F_m (Baker, 2008). La diferencia entre ambos parámetros, F_o y F_m , se define como la fluorescencia variable en el estado adaptado a la oscuridad, F_v . Con estos parámetros, se determinó la razón $F_v:F_m$ para estimar la eficiencia cuántica máxima, a partir del modelo de Butler (1978): $F_v:F_m = (F_m - F_o)/F_m$. Las hojas en el estado adaptado a la luz fueron iluminadas con una fuente de luz actínica roja a una irradiancia de 1.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se las expuso a pulsos saturantes cada 20 s durante 5 min hasta un estado estable de fluorescencia de la clorofila (Fig. 3.2.5a), obteniéndose los valores de F_s' (fluorescencia en el estado estable) y F_m' (fluorescencia máxima en el estado adaptado a la luz, en el que Q_A está completamente reducida) justo antes y después de cada pulso, respectivamente (Baker, 2008). La diferencia entre F_s' y F_m' se designa como F_q' , siendo la razón $F_q':F_m'$ la eficiencia operativa del PSII: $F_q':F_m' = (F_m' - F_s')/F_m'$. Se trata de la eficiencia con la que la luz absorbida por el PSII se usa fotoquímicamente, y nos da una idea de la velocidad de transporte de electrones y de la fotosíntesis en su conjunto (Maxwell & Johnson, 2000). A continuación, las hojas se cubrieron con un paño negro y, después de retirar la luz actínica, se expusieron a luz infrarroja durante 3 s para rápidamente reoxidar los centros del PSII y tomar la medida de F_o' . Se define como la fluorescencia mínima en el estado adaptado a la luz, cuando Q_A está completamente oxidada y la extinción no fotoquímica es la propia de una hoja en la luz (a diferencia de F_o , que es la fluorescencia mínima sin extinción no fotoquímica).

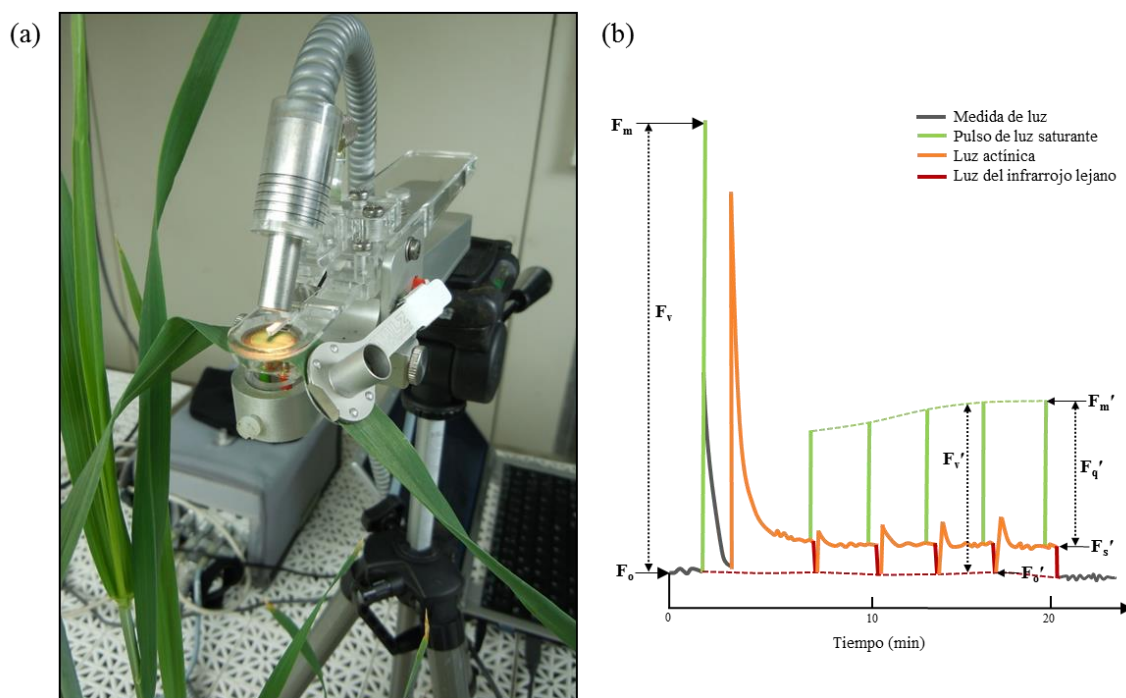


Fig. 3.2.5a. (a) Fluorímetro de pulsos de amplitud modulada PAM-2000 y (b) análisis de la medida de la fluorescencia de la clorofila mediante la aplicación de pulsos de luz, basado en Maxwell & Johnson (2000) y Baker (2008).

La extinción fotoquímica de la fluorescencia, $F_q':F_v'$, se calculó como $F_q':F_v' = (F_m' - F_s') / (F_m' - F_o')$ (Baker, 2008). Se utiliza para estimar la proporción de la eficiencia máxima del PSII que tiene lugar en la hoja bajo las condiciones de medida, relacionado de forma no lineal con la fracción de centros de reacción del PSII con Q_A oxidada, es decir, la fracción de centros abiertos (Maxwell & Johnson, 2000; Baker, 2008). Para estimar la fracción de centros abiertos del PSII de forma lineal, sustituyendo al parámetro anterior, se utilizó q_L , calculado como: $q_L = (F_q'/F_v') \times (F_o'/F_s')$ (Kramer *et al.*, 2004). Φ_{qL} es la eficiencia fotoquímica máxima del PSII, que estima el rendimiento cuántico máximo del PSII que se alcanza en el estado adaptado a la luz de las hojas cuando Q_A está completamente oxidada, $\Phi_{qL} = ((F_m' - F_o') / F_m') \times (F_s' / F_o')$ (Kramer *et al.*, 2004). La razón $F_q':F_m'$ descrita antes, también resulta del producto de q_L y Φ_{qL} . Para medir la extinción no fotoquímica se utilizó el parámetro Φ_{NPQ} , que se define como el rendimiento cuántico de extinción debido a procesos inducidos por luz. Este factor contribuye a la mayor parte de las pérdidas por la extinción no fotoquímica y se calculó de la manera siguiente (Kramer *et al.*, 2004):

$$\Phi_{NPQ} = 1 - \frac{F_q'}{F_m'} - \frac{1}{NPQ + 1 + q_L \times \left(\frac{F_m'}{F_o'} - 1\right)}$$

3.2.6. Valoración de compuestos del metabolismo del carbono y nitrógeno

3.2.6.1. Clorofilas

La concentración de clorofilas en la hoja bandera se determinó en los experimentos 1 y 2 para los distintos tratamientos y muestreos realizados. Previamente, unos 50 mg del material vegetal

almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron utilizados para calcular el peso fresco por área foliar, que se utilizó para expresar algunos resultados en función del área. Para ello, y con la mayor brevedad posible, se tomó una fotografía de la muestra en un papel cuadrulado referenciado que permitió el cálculo del área con el programa Scion Image (Scion Corporation). Este material se maceró con 2 mL de acetona al 80% en un mortero enfriado previamente con N líquido. Una alícuota del extracto se diluyó con más acetona al 80% hasta completar 1 mL, y se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 30 min. Transcurrido el tiempo de extracción se midió la absorbancia a 645 nm y 663 nm en un espectrofotómetro UV-Visible 8453 (Hewell-Packard) con cubetas de vidrio, calculando el contenido de clorofila total (chl total), clorofila a (chl a) y clorofila b (chl b) mediante las siguientes ecuaciones descritas por Arnon (1949):

$$\begin{aligned}\text{Chl total (mg}\cdot\text{L}^{-1}) &= 8,02 \times A_{663} + 20,29 \times A_{645} \\ \text{Chl a (mg}\cdot\text{L}^{-1}) &= 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645} \\ \text{Chl b (mg}\cdot\text{L}^{-1}) &= 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}\end{aligned}$$

El contenido de clorofilas se expresó en $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ y se calculó la razón chl a:b. Se midieron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación.

3.2.6.2. Extracción con etanol-agua

Las muestras de hoja bandera y raíz de los experimentos 1 y 2 se utilizaron para la extracción de carbohidratos solubles y aminoácidos mediante una serie de extracciones secuenciales con etanol al 80% (v/v) y agua a temperatura elevada según el método descrito por Stitt *et al.* (1978), y modificado por Morcuende *et al.* (2004). Con esta finalidad, se maceró el material vegetal almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un mortero enfriado previamente con N líquido y se prepararon alícuotas de 50-75 mg de hoja bandera y 200 mg de raíz en eppendorfs de seguridad. A continuación se añadieron 700 μL a las hojas y 1 mL a las raíces de etanol al 80% tamponado con ácido N-(2-hidroxietilo)-piperacina-N'-(2-etano-sulfónico) (HEPES) 10 mM, con pH 7,5 ajustado con KOH. Después de incubar las muestras durante 30 min a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un bloque térmico, se centrifugaron a 13.200 rpm durante 10 min en una centrífuga 5415R (Eppendorf). El sobrenadante se recogió en un matraz de 5 mL. Se repitió el proceso con el precipitado dos veces más para la hoja y una para la raíz, recogiendo el sobrenadante en el mismo matraz. Se continuaron las extracciones sustituyendo el etanol por agua tamponado con HEPES-KOH 10 mM pH 7,5 del mismo modo, sólo modificando la temperatura de incubación a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, con objeto de extraer los fructanos de alto grado de polimerización. El proceso se repitió otras dos veces para la hoja y una para la raíz, añadiendo el sobrenadante al mismo matraz. Se terminó enrasando el matraz con etanol al 40% (v/v), y a continuación se dispensaron alícuotas de los extractos en diferentes eppendorfs y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta los análisis. Del mismo modo, el precipitado generado durante la extracción se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se utilizó para la valoración del almidón. En el momento de proceder con los análisis, las alícuotas se descongelaron y se procedió a la eliminación del etanol mediante evaporación a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un concentrador a vacío Lioalfa 60 (Telstar), acoplado a una centrífuga Savant Speed Var SPD 121P (Thermo Scientific), con la finalidad de evitar posibles interferencias con las actividades de los enzimas que se usaron posteriormente. Las muestras se resuspendieron en el mismo volumen original con agua ultrapura y se centrifugaron 2 min a 13.200 rpm, estando preparadas para los análisis que a continuación se detallan.

3.2.6.2.1. Glucosa y fructosa

Se valoró espectrofotométricamente el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos en las muestras de la hoja bandera y la raíz extraídas con etanol y agua del experimento 1 y 2 mediante análisis enzimáticos acoplados a la oxidorreducción de piridín nucleótidos (Jones *et al.*, 1977; Stitt *et al.*, 1989). Se ha optimizado un método para la medida de estos carbohidratos en placas de 96 pocillos con un volumen final de 200 μL en el espectrofotómetro Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) (Fig. 3.2.6.2.1a). Se usó el kit comercial Test D-glucose Boehringer Mannheim/R-biopharm (Roche) para la medida de glucosa, que contiene el tampón Boehringer y los enzimas HK y G6PDH, además de otros enzimas adicionales para la transformación de los otros carbohidratos en glucosa y así permitir su valoración.

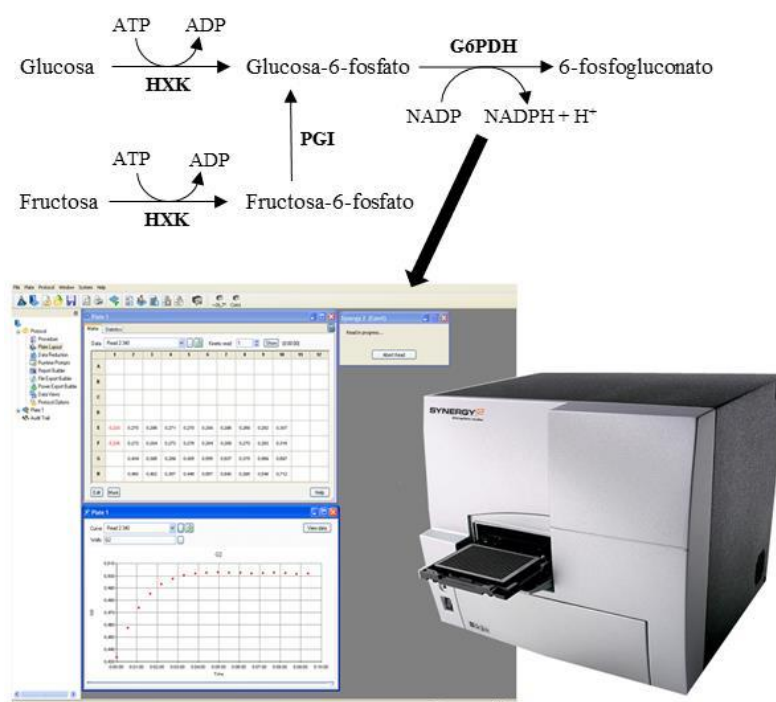


Fig. 3.2.6.2.1a. Esquema de las reacciones implicadas en la determinación de glucosa y fructosa. Se produce un aumento de absorbancia en el lector de placas Synergy 2 debido a la reducción del NADP⁺, equivalente al contenido de glucosa/fructosa en la muestra. HXK, hexoquinasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Una alícuota del extracto etanólico-acuoso resuspendida en agua se mezcló con 100 μL de tampón Boehringer –que contiene NADP 3 mM, ATP 10 mM, cantidades adecuadas de Mg_2SO_4 y TEA 86 mM a pH 7,6 como tampón– y agua ultrapura hasta completar un volumen de 200 μL . Se utilizaron placas de 96 pocillos con dos repeticiones técnicas por muestra. Se centrifugó la placa a 2.000 g durante 10 s en una centrífuga de placas Sorvall ST16R (Thermo Scientific) para la mezcla de los componentes. Se midió la absorbancia inicial a 340 nm, utilizando como referencia una longitud de onda de 400 nm. Pasados 5 min, se añadió 1 U de HXK y 0,5 U de G6PDH a cada pocillo y se continuó la medida de la absorbancia. La glucosa libre presente en las muestras se fosforiló a G6P y ésta se oxidó a 6-fosfogluconato con la reducción de NADP a NADPH en presencia de los enzimas HXK y G6PDH y ATP (Fig. 3.2.6.2.1a). El equipo monitorizó el incremento de absorbancia que se produjo por la formación de NADPH en la reacción, equivalente estequiométricamente a la cantidad de glucosa. Una vez que se alcanzó la linealidad de la reacción anterior, se añadieron 2,5 U de PGI

(Roche) a cada pocillo y se continuó con la medida de absorbancia. En este caso, se obtuvo un incremento de absorbancia debido a la formación de NADPH proporcional a la cantidad de fructosa en la muestra (Fig. 3.2.6.2.1a). Se usó agua como blanco. Los enzimas comerciales utilizados se encontraban en suspensión en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 M, solución que fue sustituida por tampón Boehringer por centrifugación a 13.200 rpm durante 2 min. El contenido de glucosa y fructosa se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Se valoraron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación para cada experimentación, además de las dos repeticiones técnicas mencionadas.

3.2.6.2.2. Sacarosa

La determinación de sacarosa se basó en la incubación de las muestras con sacarasa, enzima que no degrada otros oligosacáridos (McCleary & Blakeney, 1999), para producir la hidrólisis del disacárido en los monosacáridos glucosa y fructosa, los cuales se valoraron por el procedimiento anterior. Una alícuota del extracto etanólico-acuoso resuspendida en agua de la hoja bandera y la raíz se mezcló con 4 μL de tampón maleato sódico 100 mM pH 6,5, 8 U de sacarasa (Megazyme) y agua ultrapura hasta completar un volumen de 54 μL en las placas de 96 pocillos. Se mezclaron los componentes por centrifugación a 2.000 g durante 10 s y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, cubriendo la placa con papel de aluminio adhesivo para evitar la evaporación de los componentes. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 100 μL de tampón Boehringer y agua ultrapura hasta completar el volumen final de 200 μL . La absorbancia inicial y los incrementos de absorbancia después de la adición de HXK y G6PDH primeramente, y de PGI seguidamente, se midieron en el espectrofotómetro Synergy 2 a 340 nm (400 nm de referencia) para valorar la glucosa y fructosa, respectivamente. A la concentración de glucosa y fructosa así obtenida se les restó los valores de glucosa y fructosas libres para obtener sólo los correspondientes a la sacarosa. El resultado final del contenido de sacarosa (disacárido) se expresó como el contenido de glucosa expresado en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, ya que éste y la fructosa son equimoleculares en la sacarosa. Se analizaron cuatro repeticiones biológicas y dos repeticiones técnicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación para cada experimentación.

3.2.6.2.3. Fructanos

Para la determinación de fructanos se incubaron las muestras con fructanasas para producir la hidrólisis de los fructanos en glucosa y fructosa, que se valoraron de acuerdo al apartado 3.2.6.2.1. Una alícuota del extracto etanólico-acuoso de la hoja bandera y la raíz se mezcló con 2 μL de tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5, 2 U de fructanasas (Fructanase Mixture Purified-Liquid, Megazyme) y agua ultrapura hasta completar un volumen de 54 μL en placas de 96 pocillos. La mezcla de fructanasas contenía enzimas tales como la exo-inulinasa, endo-inulinasa, α -galactosidasa, β -glucanasa y pectinasa. La placa se cubrió con papel de aluminio adhesivo y se mezclaron los componentes por centrifugación a 2.000 g durante 10 s. Se dejó incubar las muestras durante 30 min a temperatura ambiente y se añadieron, con posterioridad, 100 μL de tampón Boehringer y agua ultrapura hasta un volumen final de 200 μL . Se midió en el espectrofotómetro Synergy 2 a 340 nm (400 nm de referencia) la absorbancia inicial y los incrementos de absorbancia asociados a la glucosa y fructosa una vez añadidos los enzimas HXK-G6PDH y PGI, respectivamente. El contenido de fructanos se expresó como el contenido de glucosa más el de fructosa expresado en $\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

Previamente, hubo que restar a la concentración final de glucosa y fructosa, los contenidos de glucosa y fructosa libres y los asociados a la sacarosa. Como en los anteriores análisis, se utilizaron cuatro repeticiones biológicas y dos repeticiones técnicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación para cada experimentación.

3.2.6.2.4. Carbohidratos solubles totales

El contenido de CST se expresó en $\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$, que incluye el contenido de glucosa libre, fructosa libre, sacarosa y fructanos. El contenido de sacarosa en $\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$ se consideró como la suma del contenido de glucosa y el de fructosa procedentes de la hidrólisis de la sacarosa. Se usó el contenido del resto de carbohidratos (glucosa libre, fructosa libre y fructanos) como se indican en sus respectivos apartados.

3.2.6.2.5. Almidón

El residuo insoluble obtenido en la extracción con etanol-agua se usó para la determinación de almidón después de una digestión en medio ácido según Hendriks *et al.* (2003). El precipitado fue resuspendido en 900 μL de NaOH 100 mM por agitación y se incubó 30 min a 95 °C. Se añadieron 180 μL de una solución de HCl 0,5 M y acetato sódico 0,1 M pH 4,9. A continuación, para la digestión del almidón se mezclaron 120 μL de la solución anterior con 180 μL de una mezcla de digestión que contenía 0,7 U de α -amilasa y 0,5 U de amiloglucosidasa (Roche) disueltas en acetato sódico 50 mM pH 4,9 (Ap Rees *et al.*, 1977). Se incubó la mezcla durante 16 h a 37 °C en un bloque térmico y se centrifugó a 13.200 rpm durante 2 min. Una alícuota del sobrenadante se mezcló con 100 μL de tampón Boehringer pH 7,6 y agua ultrapura hasta completar 200 μL en placas de 96 pocillos. La glucosa procedente de la digestión del almidón se valoró en el lector de placas a partir del salto de absorbancia al añadir los enzimas HXK y G6PDH a 340 nm (400 nm de referencia) según el método enzimático descrito anteriormente. El contenido de almidón se determinó como el contenido de glucosa expresado en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Se analizaron cuatro repeticiones biológicas y dos repeticiones técnicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación para cada experimentación.

3.2.6.2.6. Aminoácidos totales

El contenido total de aminoácidos se determinó según el método colorimétrico de la ninhidrina (Hare, 1977) en las muestras de la hoja bandera y la raíz de los experimentos 1 y 2. Todos los aminoácidos primarios reaccionan con dos moléculas de 2,2-dihidroxi-1,2-dioxohidrendeno (ninhidrina), que en un medio ácido y a temperaturas elevadas, produce NH_3 , CO_2 y un complejo cromóforo de color purpúrea azulado. Este complejo, denominado púrpura de Ruthermann, tiene su máximo de absorción a 570 nm y permite la valoración del contenido total de aminoácidos. Primeramente, se tomó una alícuota del extracto etanólico-acuoso de las muestras y se homogeneizó con 500 μL de reactivo de ninhidrina, completando hasta 1 mL con agua ultrapura. En el caso de las raíces del experimento 2, fue necesario concentrar la muestra el doble al estar por debajo del límite de detección mediante liofilización y resuspensión en la mitad de volumen. El reactivo de ninhidrina se preparó *in situ* a partir de dos soluciones: la primera compuesta de ácido acético glacial al 17% (v/v) y $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ 36 mM, y la

segunda de acetona al 100% y ninhidrina al 1% (p/v), mezclando ambas soluciones en el momento del análisis en una proporción 3:25. Se incubó la mezcla durante 10 min a 70 °C en un bloque térmico, y se dejó atemperar seguidamente. Para finalizar, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro 8452A Diode Array (Hewell-Packard) usando cubetas de vidrio óptico. Se preparó una recta de calibrado con Gln (L-glutamine G3126 Reagent Plus, Sigma-Aldrich) en un rango de 0,01-0,20 mM. El contenido de aminoácidos se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Se utilizaron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación para las hojas de los dos experimentos y las raíces del experimento 1, mientras que para las raíces del experimento 2 se utilizaron 12 muestras.

3.2.6.2.7. Determinación de aminoácidos por HPLC

El contenido de los distintos aminoácidos, a excepción de la Pro y la Cys, se midió en las muestras de la hoja bandera y la raíz del experimento 2 mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), en base al método descrito por Lindroth & Mopper (1979). El método está basado en la derivatización de los aminoácidos con orto-ftalaldehído (OPA), que permite la conversión del grupo amino de los aminoácidos en un derivado fluorescente que pueden ser posteriormente medidos con un fluorímetro, después de su separación en una columna de fase reversa.

Un volumen de 500 μL del extracto etanólico-acuoso se liofilizó y resuspendió en 80 μL de tampón Na_2HPO_4 5 mM pH 6,8. Una vez centrifugadas las muestras a 14.000 rpm y 4 °C durante 15 min, se recogieron 30 μL de cada sobrenadante en viales de cristal para las medidas en el HPLC. La muestra se mezcló en proporción 1:1 con la mezcla de derivatización OPA, compuesta por OPA al 0,5% (p/v) en tampón borato 0,7 M con etanol al 10% (v/v) y β -mercaptoetanol al 1% (v/v). La muestra se incubó durante 1 min directamente en el muestreador automatizado refrigerado a 4 °C para obtener resultados reproducibles, el cual se encargó de inyectar las muestras. La separación de los aminoácidos tuvo lugar en una columna Hyperclone C18 (Phenomenex) de dimensiones 150 \times 4,6 mm y un tamaño de partícula de 3 μm , conectada a un sistema HPLC (Dionex). Se utilizó octadecil silano (ODS) como fase estacionaria. Un volumen de la muestra derivatizada con la mezcla de derivatización OPA fue inyectada y separada mediante un gradiente no lineal con dos tampones (fase móvil): tampón A (tampón Na_2HPO_4 8,5 mM pH 6,8 y tetrahidrofurano al 0,2% (v/v)) y B (tampón Na_2HPO_4 18,5 mM pH 6,8, metanol al 32,5% (v/v) y acetonitrilo al 20,5% (v/v)), bombeados como se detalla en la Tabla 3.2.6.2.7a. Se midió la fluorescencia de los derivados fluorescentes originados a partir de los aminoácidos y del OPA con un fluorímetro SFM 25 (Kontrons Instrument), para lo cual se utilizó una longitud de onda de excitación de 330 nm y de emisión de 450 nm. El contenido de aminoácidos se determinó considerando los tiempos de retención y los picos obtenidos en el cromatograma, junto con el factor de calibración obtenido de los estándares de aminoácidos originales (Sigma) a concentraciones de 10 y 20 μM , utilizando el software Chromeleon (Dionex). El contenido se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y $\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, y se utilizaron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido y periodo de incubación. Estos análisis se realizaron en el Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas (Golm-Potsdam, Alemania) con la colaboración de la Dra. Mutsumi Watanabe durante una estancia investigadora (EEBB-I-13-06805).

Tabla 3.2.6.2.7a. Composición de los tampones A y B utilizada durante la separación de los aminoácidos por cromatografía en fase reversa.

Tiempo (min)	Tampón A (%)	Tampón B (%)	Velocidad de flujo (mL·min ⁻¹)	Temperatura (°C)
0	100	0	0,8	30
2:00	100	0	0,8	30
16:00	87	13	0,8	30
23:25	85	15	0,8	30
32:30	50	50	0,8	30
43:30	40	60	0,8	30
49:30	0	100	0,8	30
51:30	0	100	0,8	30
58:30	100	0	0,8	30
60:00	100	0	0,8	30

3.2.6.3. Extracción con ácido perclórico

La extracción de distintos intermediarios fosforilados (HPs, 2PGA, 3PGA y ATP) y del 2-oxoglutarato se realizó en las muestras de la hoja bandera y la raíz de los experimentos 1 y 2. Se utilizó un método que emplea HClO₄ (Morrell & Rees, 1986) y permite valorar el contenido de los metabolitos en el sobrenadante. En torno a 50 mg del material vegetal almacenado a -80 °C para las hojas y 200 mg para las raíces, se maceró en morteros enfriados con N líquido. Se homogeneizó el material vegetal con 400 µL de una solución HClO₄ 1,5 M y ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5 mM. Durante 30 min de reposo en hielo, se produjo la inactivación de los enzimas y la precipitación de las proteínas presentes en la muestra. Se centrifugó a 13.200 rpm durante 5 min para las hojas y 20 min para las raíces y se recogió el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 100 µL de agua ultrapura, centrifugando en las mismas condiciones y juntando todos los sobrenadantes obtenidos. Se procedió a la neutralización de los extractos acidificados con una solución de KOH 5 M y trietanolamina (TEA) 1 M hasta alcanzar la neutralidad, momento en el que pudo apreciarse un viraje de color de los extractos de blanco a amarillo, siendo necesarios aprox. 130 µL para la hoja y 100 µL para la raíz. Se recuperó el sobrenadante después de centrifugar en las condiciones anteriores, y se volvió a lavar el precipitado obtenido con otros 50 µL de agua ultrapura, juntando ambos sobrenadantes. El extracto se congeló inmediatamente en N líquido y fue almacenado a -80 °C hasta su análisis. El contenido de HPs y 2-oxoglutarato se valoró en las muestras del experimento 1, ya que estos parámetros fueron medidos en el experimento 2 según el protocolo descrito en el apartado 3.2.6.4. En muestras de este mismo experimento se determinó el contenido de 2PGA, 3PGA y ATP en el extracto así obtenido.

3.2.6.3.1. Hexosas fosfato

El contenido de HPs (G1P, G6P y F6P) se valoró mediante el análisis enzimático propuesto por Stitt *et al.* (1984). Para ello, una alícuota del extracto obtenido con HClO₄ se añadió a una cubeta de vidrio junto con HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM y NADP 0,35 mM. Se realizó un seguimiento de los cambios de absorbancia a 334 nm (405 nm de referencia) debidos a la reducción de NADP⁺ tras la adición de 0,7 U de G6PDH (Roche), posteriormente 0,8 U de PGM (Roche) y, finalmente, 1,4 U de PGI (Roche) en un espectrofotómetro de doble longitud de onda Sigma ZFP 22 (Sigma-Aldrich). Los saltos de absorbancia producidos se correspondieron con la cantidad de G6P, G1P y F6P, respectivamente (Fig. 3.2.6.3.1a). El espectrofotómetro dispone de un fotormultiplicador que permite amplificar la señal de detección de metabolitos que se encuentran en niveles muy bajos y que de otro

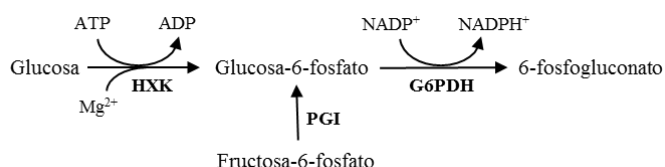


Fig. 3.2.6.3.3a. Esquema de las reacciones implicadas en la determinación de ATP. HXK, hexoquinasa; PGI, fosfoglucoasa isomerasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

3.2.6.3.4. 2-oxoglutarato

El contenido de 2-oxoglutarato también se determinó mediante un análisis enzimático según Burlina (1984). Así, una alícuota del extracto obtenido con HClO₄ se transfirió a una cubeta de vidrio junto con HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, NH₄Cl 20 mM y NADH 50 μM. Después de la adición de 1,5 U de GDH (Sigma-Aldrich), que cataliza la transformación del 2-oxoglutarato en Glu (Fig. 3.2.6.3.4a), se midió el cambio de absorbancia asociado a la oxidación de NADH a 334 nm (405 nm de referencia) con una amplificación de la señal de 50× en el espectrofotómetro Sigma ZFP 22 (Sigma-Aldrich). Cambio que fue proporcional al contenido de 2-oxoglutarato de la muestra. Los resultados de cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido y estadio de desarrollo se expresaron en nmol·g PF⁻¹.

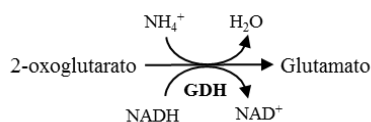


Fig. 3.2.6.3.4a. Esquema de las reacciones implicadas en la determinación de 2-oxoglutarato. GDH, glutamato deshidrogenasa.

3.2.6.4. Extracción con cloroformo-metanol

La extracción de distintos intermediarios metabólicos en muestras de la hoja bandera y la raíz del experimento 2, para su medida por cromatografía de intercambio aniónico y de pares iónicos acoplada a espectrometría de masas, se realizó según el método descrito en Lunn *et al.* (2006) utilizando cloroformo y metanol. Primeramente, el material vegetal almacenado a -80 °C se maceró en morteros con N líquido y unos 15 mg del material pulverizado de la hoja y unos 30 mg de la raíz se transfirieron a eppendorfs. Se añadió a cada muestra 350 μL de una mezcla previamente enfriada de cloroformo-metanol (CHCl₃-CH₃OH) en proporción 3:7 (v/v). Después de una fuerte agitación, se incubó la mezcla durante 2 h a -20 °C. Los componentes solubles en agua fueron extraídos de la fase de cloroformo al añadir 350 μL de agua ultrapura fría y agitar hasta alcanzar unos 4 °C. Después de centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min, se recogió la fase superior de agua-metanol. La fase inferior de cloroformo se mezcló de nuevo con otros 300 μL de agua ultrapura previamente enfriada. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y se volvió a recoger el sobrenadante, añadiéndolo al anterior y almacenándolo a 4 °C. El extracto se llevó a sequedad en frío con un concentrador Alpha 2-4 LSC (Martin Christ) a -20 °C y 0,5 mbar durante toda una noche. El precipitado se redisolvió con 250 μL de agua ultrapura. Los componentes de alto peso molecular se eliminaron de las muestras por filtración en una membrana (MultiScreen Filter Plate with Ultracel-10 membrane, Millipore), añadiendo previamente 5 μL de agua ultrapura a cada pocillo, y centrifugando a 2.300 rcf durante 2 h

a 10-12 °C en una centrífuga 5810R (Eppendorf). Si este paso fuera omitido, se recuperaría una menor cantidad de metabolitos. Las muestras obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Tanto la extracción como la determinación de los distintos intermediarios metabólicos se realizaron en el Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas (Golm-Potsdam, Alemania) con la colaboración de Dña. Regina Feil, Dra. Stéphanie Arrivault, Dr. John Lunn y Prof. Dr. Mark Stitt durante la estancia investigadora mencionada anteriormente.

3.2.6.4.1. Determinación de intermediarios metabólicos por cromatografía de intercambio aniónico AEC-MS/MS

Ciertos intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos se midieron en los extractos de cloroformo-metanol de la hoja bandera y la raíz del experimento 2, mediante cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico acoplada a espectrometría de masas (AEC-MS/MS). El paso de cromatografía fue optimizado para la separación de los distintos compuestos, mientras que la espectrometría de masas se utilizó para la identificación de los metabolitos de acuerdo a su masa iónica y su patrón de fragmentación. De este modo, se midió en las muestras el contenido de ADP-glucosa, UDP-glucosa, S6P, T6P, F6P, FBP, G1P, G6P, glucosa-1,6-bisfosfato (GBP), glicerato, galactosa-6-fosfato (Gal6P), glicerol-3-fosfato (Gly3P), manosa-6-fosfato (Man6P), PEP, piruvato, ácido siquímico, citrato, aconitato, isocitrato, 2-oxoglutarato, succinato, malato y fumarato.

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo ICS 3000 (Dionex) que dispone de una columna de protección AG11-HC 2 × 50 mm y una columna de separación Ion Pac AS11-HC 2 × 250 mm (Dionex) en serie, acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo QTrap 5500 (AB Sciex). Las columnas fueron equilibradas durante 12 min con KOH 5 mM y metanol al 5% (v/v) antes de la inyección de las muestras, manteniéndose a una temperatura constante de 20 °C. El metanol al 5% fue desgasificado antes de pasar a través de una columna de pretratamiento IonPack ATC-HC 9 × 75 mm (Dionex), que atrapa trazas de contaminantes, y antes de entrar en los cartuchos EGC-KOH (Dionex) para la generación de un gradiente. Los extractos de cloroformo-metanol fueron diluidos 1:10 antes del análisis. Se inyectaron 35 µL de los extractos en las columnas automáticamente mediante un automuestreador AS50 (Dionex) operando a 4 °C, junto a [6,6-²H]trehalosa-6-fosfato como estándar interno para corregir los efectos de supresión iónica y de la matriz.

Se estableció el siguiente gradiente para eluir los compuestos aniónicos: 0-5 min, KOH 5 mM; 5-25 min, gradiente lineal de KOH 5 mM a 30 mM; 25-35 min, gradiente lineal de KOH 30 mM a 50 mM; 32-34 min, gradiente lineal de KOH 50 mM a 100 mM; 35-42 min, en isocrático KOH 100 mM. El eluyente pasó a través de un supresor de iones ASRS ultra II (Dionex), operando a 50 mA, en modo de agua externa, para eliminar K⁺ antes de entrar en el espectrómetro de masas. El QTrap 5500 trabajó en el modo de múltiple reacción monitorizada, con una fuente de ionización por electrospray en modo negativo de ionización, y adquisición de datos centroides. Como gas cortina, de colisión y fuente iónica se usó el N₂. El voltaje del spray iónico fue configurado a -4.200 V y la temperatura a 480 °C. El potencial de desagregación varió entre -30 y -130 V. Los iones precursores para los metabolitos de interés fueron seleccionados en el primer cuadrupolo usando los valores calculados de m/z (relación masa:carga eléctrica) para los iones monovalentes. Las energías de colisión apropiadas para la fragmentación de los iones precursores en el segundo cuadrupolo y la configuración de m/z para la detección de los tres productos iónicos principales (cuando fue posible) en el tercer cuadrupolo fueron obtenidos de estándares auténticos inyectados directamente en el espectrómetro de masas. Los

metabolitos se cuantificaron por comparación del área integrada del pico de señal obtenido del MS-Q3 con una curva de calibrado obtenida al utilizar estándares auténticos. La integración y cálculos de los cromatogramas fue realizada con el programa Analyst (AB Sciex). El contenido de los metabolitos se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y $\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, con cuatro réplicas biológicas por tratamiento, tejido y periodo de incubación. Con los valores de T6P y sacarosa calculados anteriormente, se determinó la razón T6P:sacarosa como una medida de la sensibilidad por azúcares (Yadav *et al.*, 2014).

3.2.6.4.2. Determinación de intermediarios metabólicos por cromatografía de pares iónicos IPC-MS/MS

Otros compuestos fosforilados, ácidos orgánicos y nucleótidos fueron separados usando la alquilamina tributilamina volátil, reactivo que forma pares iónicos con las muestras en la cromatografía de pares iónicos en fase reversa IPC-MS/MS (Arrivault *et al.*, 2009). Este método permite la cuantificación de la mayoría de metabolitos del ciclo de Calvin-Benson y otros compuestos, como se describe en Arrivault *et al.* (2009). Se cuantificaron en los extractos de cloroformo-metanol de la hoja bandera y la raíz del experimento 2 compuestos como la R5P, Ru5P + Xu5P, DHAP, S7P, SBP, RuBP, ADP, AMP, NADP y NAD. La Ru5P y la Xu5P coeluyen a la vez, por lo que no pudieron ser diferenciados. Las muestras fueron analizadas utilizando un sistema Ultimate 3000 HPLC (Dionex), acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan TSQ Quantum Discovery MS-Q3 (Thermo Scientific), y equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) como interfaz entre el cromatógrafo y el espectrómetro. Este sistema operó en modo negativo con un control de la reacción seleccionada (SRM), un voltaje del spray iónico de -4.000 V y una temperatura de capilaridad de $320\text{ }^{\circ}\text{C}$. El N_2 fue utilizado como gas de arrastre y auxiliar, configurado en 30 y 5 U, respectivamente. La presión del gas de colisión de argón fue de $1,1\text{ mTorr}$, y las anchuras de los picos del cuadrupolo 1 y 3 se establecieron en $0,7\text{ m/z}$. La operación del sistema se dividió en cuatro segmentos optimizados para la detección de cada transición, con tiempos de permanencia de $0,15\text{ s}$ o menores.

La separación cromatográfica se llevó a cabo por el paso de $100\text{ }\mu\text{L}$ del extracto cloroformo-metanol a través de una precolumna Gemini C18 $4 \times 2\text{ mm}$ (Phenomenex), antes de su separación en una columna Gemini C18 con un diámetro interno de $150 \times 2\text{ mm}$, un tamaño de partícula de $5\text{ }\mu\text{m}$ y un tamaño de poro de 110 \AA , a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó un gradiente de varios pasos con un eluyente A desgasificado (tributilamina 10 mM pH 5, ácido acético 15 mM y metanol al 5%) y un eluyente B (metanol al 100%): 0-5 min, 95% A; 5-15 min, 95-90% A; 15-22 min, 90-85% A; 22-37 min, 85-80% A; 37-40 min, 80-65% A, mantenido 3 min más; 43-47 min, 65-40% A, mantenido 3 min más; 50 min, 10% A, mantenido 4 min más; 54 min, 95% A, mantenido 11 min más. El flujo fue establecido en $0,2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 0-15 min y 54-65 min, y $0,3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 15-54 min. Una mezcla de estándares para R5P, Ru5P, Xu5P, RuBP, DHAP, S7P, SBP, AMP, ADP, NAD y NADP fueron analizados a diferentes concentraciones para obtener las curvas de calibrado. Antes de la inyección, una mezcla de seis compuestos con isótopos estables de referencia de concentraciones conocidas, $[2,3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_4]\text{R5P/R5P/Xu5P}$, $[^{13}\text{C}_3]\text{DHAP}$, $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{AMP}$ y $[1,2,3,4\text{-}^{13}\text{C}_4]\text{2-OG}$, fueron añadidos a la muestra para corregir los efectos de la matriz sobre los analitos en el análisis. El programa Finnigan XCALIBUR (Thermo Scientific) fue utilizado tanto para el control de los instrumentos como para la toma de datos. Los metabolitos fueron cuantificados por comparación del área integrada del pico de señal obtenido del MS-Q3 con sus respectivas curvas de calibrado utilizando el programa LCQuan (Thermo Scientific). El contenido de metabolitos se muestran en $\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, con cuatro réplicas biológicas por tratamiento, tejido y muestreo. Con los valores de ADP y de ATP calculados anteriormente, se determinó la razón ATP:ADP como el estado energético celular (Li *et al.*, 2013).

3.2.6.5. Determinación del contenido de iones

3.2.6.5.1. Nitrato

La determinación de NO_3^- en la hoja bandera y la raíz del experimento 1, en la planta entera del experimento 2 y en las soluciones nutritivas de ambos experimentos se llevó a cabo por espectrofotometría según el método descrito por Cawse (1967). En el caso de las muestras vegetales se utilizaron 20-50 mg del material seco molido para la determinación de N (apartado 3.2.3). Se adicionó 1 mL de agua ultrapura y, tras su homogeneizado, se autoclavaron a 120 °C y 1,06 $\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 1 h en un Autester 437-G (JP Selecta). Se centrifugaron a 13.200 rpm durante 10 min, recogiendo el sobrenadante, el cual se diluyó según el contenido de NO_3^- previsto. Después de clarificar con carbón activo durante 10 min, se centrifugó en las condiciones anteriores. A continuación, se realizó la incubación de una alícuota durante 30 min con ácido sulfámico al 0,6% (v/v) para eliminar el NO_2^- de la muestra, y HClO_4 al 4% (v/v) para eliminar las interferencias producidas por la materia orgánica. Se volvió a centrifugar a 13.200 rpm durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 210 nm en un espectrofotómetro UV-Visible 8453 (Hewell-Packard) usando cubetas de cuarzo, utilizando agua como blanco. El contenido de NO_3^- se calculó por medio de una recta de calibración con KNO_3 (10-200 μM) y se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PS}^{-1}$. En el experimento 2, también se utilizó el porcentaje del N correspondiente al NO_3^- sobre el contenido de N total (mg de N en el contenido de $\text{NO}_3^-/\text{mg N total}$; $\text{NO}_3^-/\text{N/N total}$). Para la medida del NO_3^- en la solución nutritiva, se mezcló directamente una alícuota de la solución nutritiva de las cubetas de los cultivos hidropónicos con ácido sulfámico al 0,6% (v/v) y HClO_4 al 4% (v/v). El contenido de NO_3^- se midió antes y después de la incubación de las plantas para valorar el NO_3^- absorbido durante los distintos muestreos realizados. Se utilizaron cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación.

3.2.6.5.2. Iones por cromatografía iónica IC

Se midió el contenido de iones libres, como el calcio (Ca^{2+}), el cloruro (Cl^-), el potasio (K^+), el magnesio (Mg^{2+}), el sodio (Na^+), el NH_4^+ , el fosfato (PO_4^{3-}) y el sulfato (SO_4^{2-}), en las muestras de la hoja bandera y la raíz del experimento 2, de modo similar al descrito por Watanabe *et al.* (2013). Una alícuota de los extractos de cloroformo-metanol se diluyó 1:10 con agua destilada. Después de agitar las muestras, se centrifugaron a 14.000 rpm y 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, después de lo cual el nuevo sobrenadante se filtró a través del filtro Ultrafree MC 5000 NMWL Filter Unit (Millipore) a 5.000 g y 4 °C durante 90 min. Las muestras se pasaron a viales de cristal y se cargaron en el cromatógrafo iónico ICS-3000 (Dionex), en el que los iones se separaron al pasar por una columna con un gradiente de KOH. Éstos se identificaron en función del tiempo de retención y se cuantificaron utilizando curvas de calibración de los estándares. El NO_2^- no se pudo medir debido a que no se detectó, probablemente por la escasa concentración de este metabolito en las plantas al ser tóxico. Los resultados, con cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido y periodo de incubación, se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Este trabajo también se realizó en el Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas (Golm-Potsdam, Alemania) con la colaboración de la Dra. Mutsumi Watanabe.

3.2.6.6. Determinación de proteínas

3.2.6.6.1. Proteínas totales

Se determinó el contenido de proteínas totales en la hoja bandera y la raíz del experimento 1 y 2 siguiendo el protocolo de extracción de proteínas descrito en Morcuende *et al.* (2005). Se maceraron 100 mg de material vegetal para las hojas y 200 mg para las raíces en un mortero previamente enfriado con N líquido. Se homogeneizó cada muestra con 1,5 mL de tampón de extracción, compuesto por Tricina-KOH 50 mM pH 8, sacarosa 75 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, ácido ϵ -aminocaproico 5 mM, benzamidina 2 mM, β -mercaptoetanol al 0,14% (v/v) y PMSF 1 mM. Una alícuota fue utilizada para la precipitación de proteínas con acetona al 100% con β -mercaptoetanol al 0,07% (v/v) y ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v) previamente enfriados. Después de incubar la mezcla a -20 °C durante 2 h, y tomar una alícuota para la determinación de proteínas solubles (apartado 3.2.6.6.2), se centrifugó a 20.000 g durante 15 min a 4 °C para la precipitación de proteínas, eliminando el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces con acetona al 100% con β -mercaptoetanol al 0,07% (v/v), dejando precipitar las proteínas durante 30 min a -20 °C. Los restos de acetona del precipitado se eliminaron a 40 °C durante 30 min en una estufa Digitronic (JP Selecta). Las proteínas se solubilizaron con un tampón compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8, sacarosa 100 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) al 3,5% (p/v), EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol al 0,07% (v/v) a temperatura ambiente durante 20 min y a 70 °C durante otros 20 min. Después de atemperarse las muestras, se centrifugaron a 20.000 g durante 15 min.

Las proteínas totales se determinaron colorimétricamente según Lowry *et al.* (1951), con algunas modificaciones de Peterson (1977). Una alícuota del sobrenadante anterior se mezcló con 100 μ L de desoxicolato de sodio (DOC) al 0,15% (p/v), se llevó hasta un volumen de 600 μ L con agua destilada y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadieron 100 μ L de TCA al 72% (p/v), agitándolo y dejándolo a 4 °C durante 15 min para facilitar la precipitación de las proteínas. Después de una centrifugación a 12.000 g durante 25 min, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de agua bidestilada y otros 500 μ L de un reactivo compuesto por volúmenes iguales de cobre-tartrato-carbonato –CuSO₄ al 0,1% (p/v), NaKC₄H₄O₆ al 0,2% (p/v) y Na₂CO₃ al 10% (p/v)–, NaOH 0,8 N, SDS al 10% (p/v) y agua destilada. Después de una agitación, se esperó durante 10 min para facilitar la formación de complejos Cu²⁺-proteína en medio alcalino. Se incorporó a la mezcla 250 μ L del reactivo Fenol Folin Ciocalteu al 20% (v/v) (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 45 min, lo que produjo una coloración azulada de las muestras dependiente del número de aminoácidos aromáticos. El contenido de proteínas totales se valoró con la medida de la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro 8452A Diode Array (Hewell-Packard) con cubetas de poliestireno. Se preparó una curva patrón de segundo grado de BSA (6-48 μ g·mL⁻¹), siguiendo el protocolo descrito. El contenido de proteínas totales, expresado en mg·g PF⁻¹, se calculó en cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación.

3.2.6.6.2. Proteínas solubles

La parte de la muestra que se reservó en el apartado anterior para la determinación de proteínas solubles se centrifugó a 12.500 g y 4 °C durante 30 min. En el sobrenadante se valoraron las proteínas solubles por el método de Bradford (1976), mientras que en el precipitado se determinaron las proteínas de membrana como se detalla en el apartado siguiente. Una alícuota del sobrenadante se

mezcló con el tampón de extracción (Tricina-KOH 50 mM pH 8, sacarosa 75 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, ácido ϵ -aminocaproico 5 mM, benzamidina 2 mM, β -mercaptoetanol al 0,14% (v/v) y PMSF 1 mM) hasta un volumen de 200 μ L, añadiendo a continuación 5 mL de reactivo de Bradford diluido 1:5 (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad). El contenido de proteínas solubles se valoró a los 5 min con la medida de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro 8452A Diode Array (Hewell-Packard) con cubetas de poliestireno. Se preparó una recta patrón de BSA (1-12 μ g·mL⁻¹) del mismo modo en que se prepararon las muestras. Se realizaron cuatro repeticiones biológicas para cada tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación. Los datos se expresaron en mg·g PF⁻¹.

3.2.6.6.3. Proteínas de membrana

En el precipitado obtenido en la determinación de proteínas solubles se valoró el contenido de proteínas de membrana. Se lavó el precipitado varias veces por agitación hasta que estuvo incoloro con tampón de extracción (Tricina-KOH 50 mM pH 8, sacarosa 75 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, ácido ϵ -aminocaproico 5 mM, benzamidina 2 mM, β -mercaptoetanol al 0,14% (v/v) y PMSF 1 mM) y centrifugación a 12.000 g durante 25 min a 4 °C, descartando el sobrenadante. Posteriormente, se solubilizaron las proteínas al añadir al precipitado 500 μ L de un tampón formado por Tris-HCl 50 mM pH 8, sacarosa 100 mM, SDS al 3,5% (p/v), EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol al 0,07% (v/v). Se dejó a temperatura ambiente durante 30 min y a 70 °C durante otros 20 min. Las muestras atemperadas se centrifugaron a 20.000 g durante 15 min, valorando el contenido de proteínas de membrana según el método de Lowry *et al.* (1951) descrito anteriormente. Los resultados de cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, tejido, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación se expresaron en mg·g PF⁻¹.

3.2.6.6.4. Cuantificación de Rubisco por electroforesis SDS-PAGE y densitometría

Se valoró el contenido de proteína Rubisco en las muestras de la hoja bandera de los experimentos 1 y 2 a partir de los extractos de proteína soluble. Se prepararon geles de poliacrilamida para la electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970), cuantificando el contenido del enzima por densitometría a partir de las bandas correspondientes a la subunidad grande y pequeña de la Rubisco (Pérez *et al.*, 2011b). Utilizando un volumen con una cantidad de proteína soluble conocida se mezcló con 5 volúmenes de acetona al 100%, previamente enfriada, para la precipitación de las proteínas solubles durante al menos 3 h a -20 °C. Seguidamente, se centrifugó a 20.000 g durante 15 min a 4 °C, retirando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con un tampón que contenía Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, sacarosa 3 M, SDS al 5% (p/v), azul de bromofenol (3,3,5,5-tetrabromofenol sulfonftaleína) al 0,01% (p/v) en etanol y β -mercaptoetanol 0,3 M. La mezcla se calentó a 96 °C durante 5 min y se diluyó a una concentración optimizada para la electroforesis, conservándola a -20 °C hasta su cargado en geles de electroforesis.

Se prepararon geles de poliacrilamida de 0,75 mm de grosor utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). El gel separador se preparó a partir de poliacrilamida al 12,5% (p/v), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS al 0,1% (p/v) y persulfato de amonio (APS) al 0,05% (p/v), y el gel de cargado de poliacrilamida al 5% (p/v), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS al 0,15% (p/v) y APS al 0,05% (p/v), añadiendo a ambos N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) al final para la polimerización.

Durante la polimerización de los geles, se descongelaron y se calentaron las muestras junto a los patrones a 96 °C durante 5 min. Como patrón de peso molecular se utilizaron unos marcadores para un rango de 14-97 kDa (LMW-SDS Marker Kit, GE Healthcare), y como patrón de concentración se usó BSA (Protein Micro Standard, Sigma-Aldrich). Se efectuó el cargado en los geles de los patrones (4,3 µg de los marcadores de peso molecular y 675 ng de BSA) y las muestras (1,5 µg de proteína soluble), y se utilizó como tampón de electroforesis en la cubeta Tris 25 mM, Gly 0,2 M y SDS al 0,001% (p/v). El proceso electroforético se llevó a cabo a 200 V y temperatura ambiente durante aprox. 1 h. utilizando una fuente de alimentación EC 250-90 (EC Apparatus Corporation). Una vez finalizado, se lavó el gel 3 veces con agua durante 5 min, se fijó con una solución de agua, metanol y ácido acético en proporción 20:6:3 (v/v/v) durante 15 min en un calentador de geles GelAir Dryer (BioRad), y se mantuvo durante 1 h en agitación a temperatura ambiente, lavando posteriormente con agua del modo anterior. La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie (EZBlue Gel Staining Reagent, Sigma-Aldrich) durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de la solución de tinte, se escaneó el gel en un ChemiDoc MP Imaging System (BioRad) usando el programa Image Lab (Fig. 3.2.6.6.4a). El contenido de Rubisco se expresó en base al área foliar en $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ y como porcentaje de Rubisco en proteína soluble o porcentaje de Rubisco sobre el N foliar. También se calculó la razón subunidad grande:subunidad pequeña (rbcL:rbcS). Se utilizaron cuatro repeticiones biológicas por cada tratamiento, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación, con dos repeticiones técnicas de cada gel.

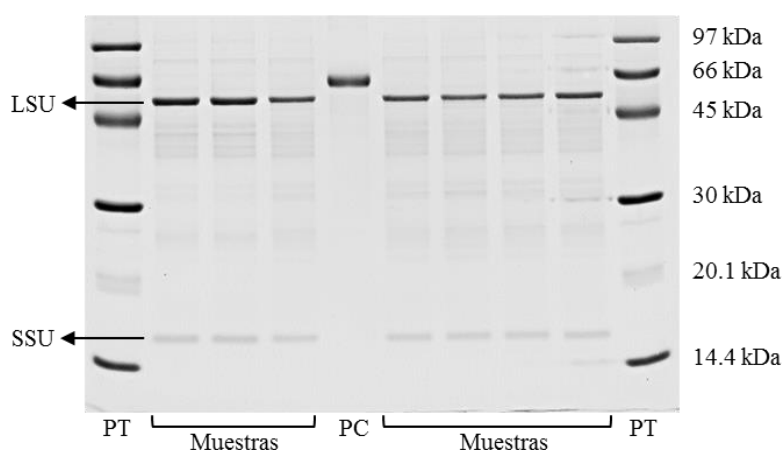


Fig. 3.2.6.6.4a. Gel de poliacrilamida de muestras de proteína soluble de la hoja bandera. Se indican la subunidad grande (LSU) y pequeña (SSU) de la Rubisco, los patrones de tamaño (PT) y el patrón de concentración BSA (PC).

3.2.7. Análisis de actividades enzimáticas

3.2.7.1. Ensayo *in vitro* de la actividad Rubisco

Se valoró la actividad *in vitro* de la proteína Rubisco en las muestras de la hoja bandera del experimento 1 y 2. Se ha puesto a punto el método a partir del descrito por Lilley & Walker (1974), modificado posteriormente por Ward & Keys (1989) y Sharkey *et al.* (1991). El método se fundamenta en una cascada de reacciones en las que participa la Rubisco y en la que su actividad se calcula espectrofotométricamente por seguimiento de la oxidación del NADH que se produce en una de las reacciones (Fig. 3.2.7.1a). En primer lugar, la Rubisco cataliza la fijación de CO_2 en la RuBP generando dos moléculas de 3PGA. Éstas se transforman en 2 moléculas de glicerato-1,3-bisfosfato

mediante la acción del enzima PGK, en una reacción dependiente de la concentración de ADP. Como éste actúa de inhibidor, se mantiene una alta razón ATP:ADP mediante la reacción que cataliza la creatina quinasa. Por último, se generan dos moléculas de GAP a partir de las dos de glicerato-1,3-bisfosfato en la reacción catalizada por la GAPDH, en la que se produce la oxidación de NADH a NAD⁺.

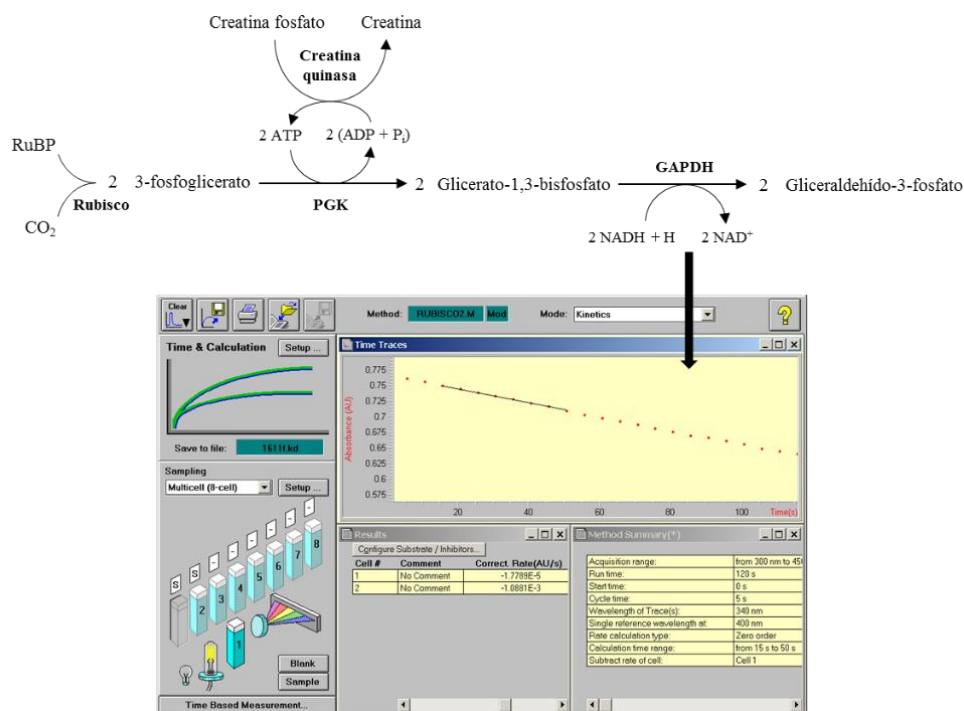


Fig. 3.2.7.1a. Esquema de las reacciones involucradas en el análisis de la actividad Rubisco. Se muestra el descenso de absorbancia asociado a la oxidación del NADH, equivalente a la actividad Rubisco. Rubisco, ribulosa-1,-5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa; PGK, fosfoglicerato quinasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Para el análisis, se maceraron 80 mg del material vegetal de la hoja bandera almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un mortero enfriado con N líquido, y se homogeneizó con 4 mL de tampón de extracción. Este tampón estaba formado por: bicina-NaOH 100 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, dicloro-difenil-tricloroetano (DTT) 0,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, benzamidina 1 mM, ácido ϵ -aminocaproico 1 mM, leupeptina 10 μM , PMSF 1 mM, Tritón X-100 al 0,2% (v/v), BSA al 0,025% (p/v) y glicerol al 20% (v/v). El extracto se centrifugó a 13.200 rpm durante 60 s y, a partir de una alícuota del sobrenadante, se midió la actividad Rubisco inicial (ARI) antes de que pasaran 2,5 min desde el inicio de la extracción usando un cóctel de análisis. Éste incluía todos los componentes necesarios para que se desencadene la cascada de reacciones antes indicada: bicina-NaOH 100 mM pH 8,2, MgCl₂ 20 mM, NaHCO₃ 10 mM, RuBP 0,6 mM, KCl 18 mM, NADH 0,2 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,02% (p/v), creatina fosfato 5 mM, creatina quinasa 25 U·mL⁻¹, PGK 47 U·mL⁻¹ y GAPDH 47 U·mL⁻¹. Los enzimas comerciales usados (Sigma-Aldrich) se precipitaron para eliminar el (NH₄)₂SO₄ de la solución original y se resuspendieron en glicerol al 20% (v/v). El descenso de NADH se midió en un espectrofotómetro UV-Visible 8453 (Hewell-Packard) usando cubetas de vidrio a 340 nm (400 nm de referencia). El coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm fue de 6,22 mM⁻¹·cm⁻¹. La pendiente del descenso del NADH, lineal durante los primeros 30-60 s (Fig. 3.2.7.1a), se correspondió en valores absolutos con la ARI tras considerar que la estequiometría entre la oxidación del NADH y la carboxilación de la RuBP por la Rubisco es 2:1.

Para medir la actividad Rubisco total (ART) se incubó la muestra durante 10 min con un cóctel de activación, formado por bicina-NaOH pH 8,2 100 mM, MgCl₂ 20 mM, BSA al 0,02% (p/v) y NaHCO₃ 10 mM. Con ello, se consiguió la activación de todos los centros activos del enzima al incluir Mg²⁺ y bicarbonato (NaHCO₃) como equivalente al CO₂. Transcurrido el tiempo de la incubación, se midió la ART de igual modo que la ARI, usando el cóctel de análisis indicado anteriormente. Los valores de la ARI y la ART se expresaron en función del área foliar en $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, con los cuales se pudo calcular el estado de activación del enzima como el porcentaje del cociente entre la ART y la ARI. También se determinó la eficiencia catalítica del enzima, k_{cat} (s⁻¹), dividiendo la ART por el número de centros activos del enzima, que se obtienen de multiplicar los moles de Rubisco por 8 (Pérez *et al.*, 2011a). Los resultados representan los valores promedios de cuatro repeticiones biológicas por tratamiento, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación.

3.2.7.2. Ensayo *in vitro* de la actividad nitrato reductasa

La actividad *in vitro* del enzima NR se valoró en las muestras de la hoja bandera y la raíz del experimento 1 y 2, para lo cual se siguió el método de MacKintosh (1992), considerando las modificaciones añadidas por Scheible *et al.* (1997c). En concreto, se midió el NO₂⁻ producido por la reacción catalizada por la NR en ausencia o presencia de cationes divalentes de Mg²⁺ para determinar la actividad máxima (ANRm; enzima desfosforilado) o selectiva (ANRs; enzima fosforilado), respectivamente. Se comenzó pulverizando unos 120-150 mg de la hoja bandera y 150-200 mg de la raíz del material congelado a -80 °C en un mortero enfriado previamente con N líquido. El material vegetal se homogeneizó con cuatro volúmenes (p/v) de tampón de extracción enfriado en hielo compuesto por HEPES-KOH 100 mM pH 7,5, glicerol al 10% (v/v), EDTA 1 mM, acetato de magnesio 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% (v/v), BSA al 0,5% (p/v), Na₂MoO₄ 5 μM , polivinilpirrolidona (PVPP) al 1% (p/v) y, justo en el momento de su uso, se añadieron DTT 5 mM, leupeptina (en el caso de hojas) o quimostatina (en el caso de raíces) 25 μM , FAD 20 μM y PMSF 0,5 mM. Se valoró la ANRm al incubar el extracto anterior a 30 °C en distintos intervalos de tiempo con cinco volúmenes de un tampón de ensayo, formado por HEPES-KOH 100 mM pH 7,5, KNO₃ 5 mM, EDTA 5 mM, leupeptina (hojas) o quimostatina (raíces) 15 μM , FAD 10 μM , DTT 0,25 mM, Na₂MoO₄ 5 μM y NADH 0,5 mM. La reacción se paró al mezclar una alícuota de la mezcla de incubación con 25 μL de acetato de zinc 0,6 M. Este compuesto facilitó la agregación y precipitación de las proteínas, entre ellas la NR, al formarse complejos de Zn²⁺ con los grupos SH de las cisteínas de las proteínas. Los intervalos de tiempo fueron de 2 min durante un total de 6 min para las hojas y cada 4 min durante un total de 12 min para las raíces, debido a las diferencias en la actividad NR. De forma simultánea, se valoró la ANRs al incubar el extracto con otros cinco volúmenes de otro tampón de ensayo, cuyos componentes fueron HEPES-KOH 100 mM pH 7,5, KNO₃ 5 mM, acetato de magnesio 10 mM, leupeptina (hojas) o quimostatina (raíces) 15 μM , FAD 10 μM , DTT 0,25 mM, Na₂MoO₄ 5 μM y NADH 0,5 mM, siguiendo el mismo protocolo descrito para la ANRm. Se prepararon controles a tiempo cero con o sin 10 nmoles de NO₂⁻ (NaNO₂), en presencia de acetato de zinc.

A todas las alícuotas obtenidas en los distintos intervalos de tiempo se les añadieron 75 μL de metosulfato de fenazina (PMS) 250 μM , y se incubaron después de ser homogeneizadas por agitación a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad. Este compuesto oxida el NADH que pudiera estar en exceso y, a su vez, pudiera interferir con la determinación del NO₂⁻. Seguidamente, se añadieron 300 μL de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 3 N y 300 μL de N-naftiletildiamina (NNEDA) al 0,02% (p/v) en agua, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 min. Este paso

facilitó la interacción del diazocompuesto, producido en la reacción de la sulfanilamida con el NO_2^- , con la amina aromática del NNEDA, generándose un compuesto coloreado que presenta un máximo de absorción a 540 nm. Una vez centrifugadas las muestras a 13.200 rpm durante 5 min, se procedió a medir la absorbancia en el sobrenadante a 540 nm en un espectrofotómetro 8452A Diode Array (Hewell-Packard) con cubetas de vidrio. Se realizó así un seguimiento de la reacción durante los tiempos de incubación mencionados para cada muestra. La ANRm y la ANRs se calcularon a partir de la consideración de que la diferencia de absorbancias entre los controles a tiempo cero, con o sin NO_2^- , es el equivalente a 10 nmoles de NO_2^- . Los resultados de cuatro repeticiones biológicas por tratamiento se expresaron como $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, excepto para las raíces del experimento 2, en el que se usaron 12 repeticiones por tratamiento. El estado de activación de la NR se calculó como el porcentaje del cociente entre la ANRs y ANRm.

3.2.8. Análisis de la expresión de genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno por qRT-PCR

La transcripción reversa seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR, “Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction”) es una técnica extremadamente sensible, rápida y específica para la detección y cuantificación del ARNm, con un gran potencial para la medida de transcritos que sean poco abundantes. La qRT-PCR es una técnica cinética que permite el análisis continuado de la amplificación del ADN (Higuchi *et al.*, 1993), gracias a la disponibilidad de fluoróforos que se unen al ADN de doble cadena inespecíficamente y de equipos de PCR en tiempo real que permiten medir la fluorescencia al final de cada ciclo de PCR.

Los genes del metabolismo del C y N que se han incorporado en la plataforma desarrollada para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro, se seleccionaron entre aquellos cuya expresión génica varió en respuesta a cambios en la disponibilidad de C y N en estudios previos con plantas de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004; Bläsing *et al.*, 2005; Osuna *et al.*, 2007). También se consideraron ciertos genes involucrados en la captación de la luz y la generación de energía en la fotosíntesis y en el metabolismo del C, N y de los ácidos orgánicos que mostraron cambios notables en su expresión a $[\text{CO}_2]$ elevadas en estudios del transcriptoma con diferentes especies vegetales. Estos estudios incluyen plantas C_3 como *Arabidopsis* (Miyazaki *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2012; Markelz *et al.*, 2014a; Markelz *et al.*, 2014b; Watanabe *et al.*, 2014) arroz (Fukayama *et al.*, 2009; Fukayama *et al.*, 2011), soja (Ainsworth *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009b) y tomate (Li *et al.*, 2013), además de plantas C_4 como maíz (Kim *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2011) y caña de azúcar (de Souza *et al.*, 2008), y plantas leñosas del género *Populus*, como *P. x euramericana* (Taylor *et al.*, 2005; Tallis *et al.*, 2010), *P. deltoides* (Druart *et al.*, 2006), *P. tremuloides* (Gupta *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2013). Aun cuando la investigación de los TFs en trigo es bastante escasa, se han incorporado a la plataforma varios TFs, que desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo del C y N, identificados por estudios de similitud de secuencias en otras especies vegetales. Entre los TFs, se incluyen MYB13 involucrado en la activación de las FTs (Xue *et al.*, 2011), Dof1 y NF-YB3 que participan en la regulación de genes del metabolismo del N (Chen *et al.*, 2005b) y de genes fotosintéticos (Stephenson *et al.*, 2011), respectivamente, AGL1 relacionado con la activación de la floración (Zhao *et al.*, 2006), además de WM30 con una elevada homología con ANR1-MADS-box, regulador clave del desarrollo de raíces laterales en respuesta a señales externas mediadas por NO_3^- (Zhang & Forde, 1998).

Para los genes seleccionados se realizó una búsqueda e identificación de los ortólogos del trigo, para los que se diseñaron *primers* (cebadores) específicos siguiendo criterios estrictos y rigurosos (Fig. 3.2.8a). Este trabajo se realizó en colaboración con el Prof. Dr. Björn Usadel de la RWTH Universidad de Aachen (Aquisgrán, Alemania) durante una estancia investigadora (EEBB-I-12-05402). La eficiencia y especificidad de los *primers* diseñados para los genes de estudio fue convenientemente evaluada, al igual que la estabilidad en la expresión de los genes de referencia, lo cual permitió tanto la validación de los *primers* como la selección del gen de referencia más apropiado para la normalización de los datos de expresión (Fig. 3.2.8a).

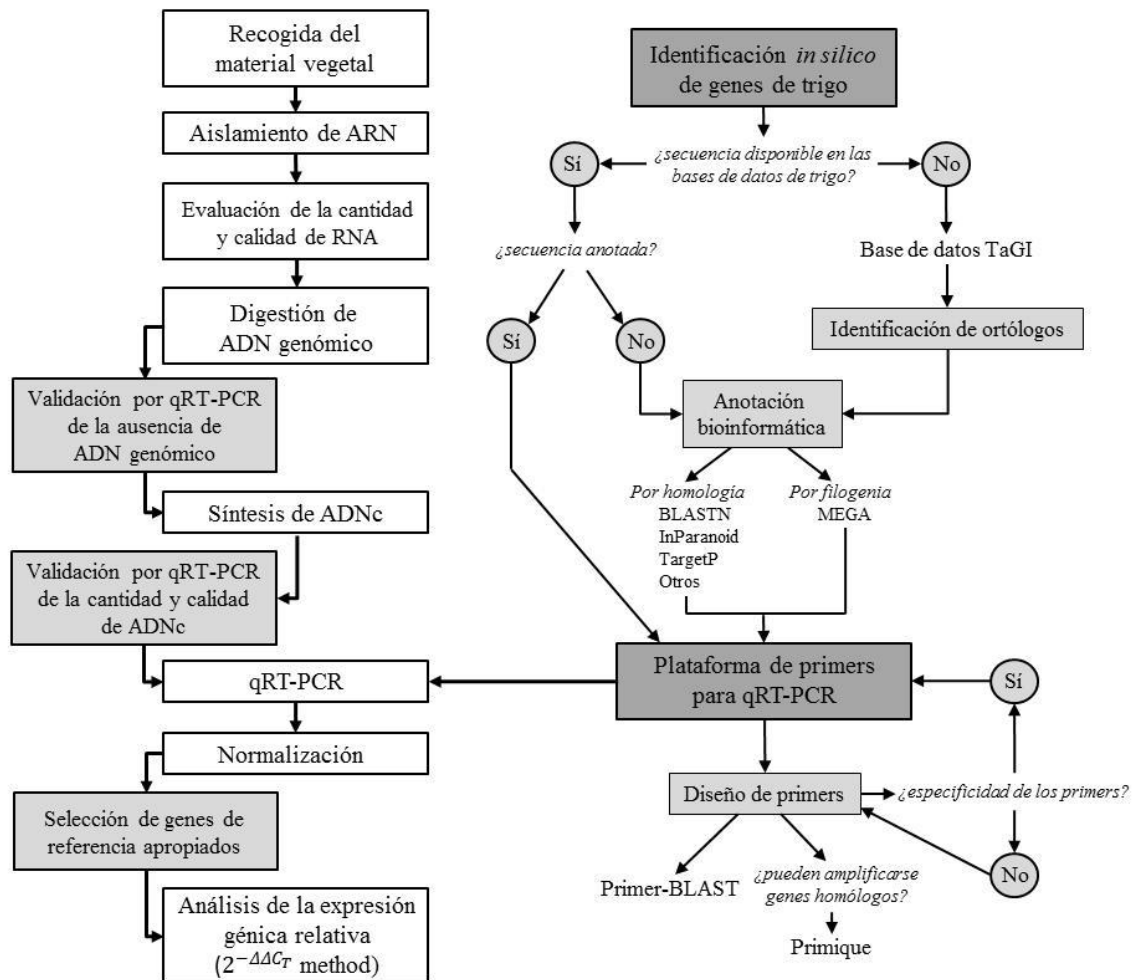


Fig. 3.2.8a. Esquema de los pasos seguidos para el análisis de expresión génica por qRT-PCR y del algoritmo utilizado para el diseño y optimización de la plataforma de primers para genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en trigo duro.

3.2.8.1. Identificación de los genes de estudio

La búsqueda e identificación de los genes que codifican proteínas del metabolismo del C y N (véase Tabla 4.1.7.2a) se realizó utilizando el algoritmo que se detalla en la Fig. 3.2.8a. Las bases de datos usadas para la búsqueda de secuencias de ARN, ADN, EST (“Expressend Sequence Tag”) o secuencias aminoacídicas de proteínas fueron GenBank, UniProtKB/Swiss-Prot, ENA (EMBL-EBI), GrainGenes o TIGR, aunque la mayoría de las secuencias que se obtuvieron pertenecían al trigo hexaploide. Las bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot, para proteínas anotadas con elevada fiabilidad, y GenBank fueron las más útiles en nuestro estudio, para las que se utilizó el operador booleano

"(gene name) AND wheat[ORGN]". En la actualidad (enero 2015), se dispone de una colección de 1,6 millones de secuencias de nucleótidos (0,1% para *Triticum durum*) y 1,4 millones de ESTs (1,4% para *Triticum durum*) para las especies Triticeae en GenBank, junto a 104.156 y 611 secuencias de aminoácidos para trigo blando y duro, respectivamente, en UniProtKB/Swiss-Prot. Aunque se priorizó la selección de secuencias en la especie de estudio, dada su escasez se optó por utilizar secuencias de otras especies de la tribu Triticeae en base a la gran similitud entre los genomas A, B y D (Dvorak *et al.*, 2006) (Fig. 3.2.8.1a).

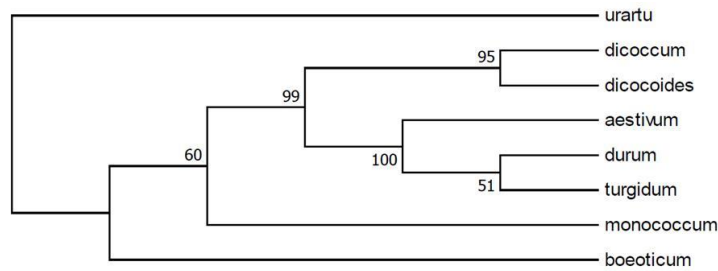


Fig. 3.2.8.1a. Análisis de la similitud genética entre los genomas A de ocho especies de *Triticum* spp., representado en un dendograma usando el método UPGMA (Ehtemam *et al.*, 2010). En base a la similitud genética del genoma A entre trigo duro y otras especies de *Triticum* y por su presencia en las bases de datos, se utilizaron secuencias de *Triticum aestivum* (0,89) y *Triticum monococcum* (0,85).

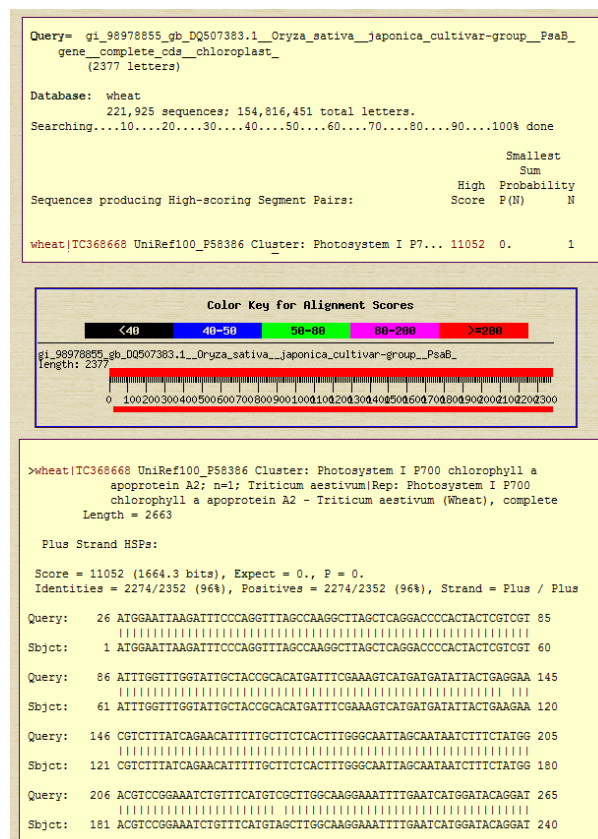


Fig. 3.2.8.1b. Identificación del gen ortólogo que codifica la proteína PsaB en trigo (contig TC368668), utilizando una secuencia anotada de la proteína A2 del fotosistema I de arroz (DQ507383) en la base de datos TaGI, con la que muestra una excelente similitud.

En muchas de las proteínas de interés, las secuencias que se localizaron en dichas bases de datos estaban bien anotadas y se incorporaron a la plataforma de qRT-PCR. Sin embargo, en otros muchos genes o proteínas, en los que las secuencias de nucleótidos o aminoácidos o bien no existían o estaban poco bien anotadas, se propusieron genes ortólogos. La base de datos DFCI *T. aestivum* Gene Index, TaGI (versión 12.0 de abril de 2010, Computational Biology and Functional Genomics Laboratory, Dana Farber Cancer Institute and Harvard School of Public Health), se utilizó para localizar los “contigs” con mayor similitud con secuencias de nucleótidos o aminoácidos de proteínas bien anotadas de otras especies próximas (Joye *et al.*, 2010). Un contig consiste en un conjunto de segmentos de ADN que se solapan y juntos representan un fragmento consenso de ADN de mayor tamaño. Entre estas especies, se utilizaron arroz, cebada, *Brachypodium distachyon* o, en última instancia, *Arabidopsis thaliana* (Fig. 3.2.8.1b). TaGI representa una recopilación de genes de trigo blando no repetitiva con una descripción virtual (Quackenbush *et al.*, 2001), que cuenta con 221.925 contigs únicos (93.508 secuencias tentativas consenso, TC, y 128.417 singletons). De esta manera, se identificaron 32 genes ortólogos que se incorporaron a la plataforma. Cuando una secuencia TC mostró un 100% de solapamiento y similitud con una secuencia de trigo en GenBank, el número de acceso se sustituyó por el de ésta.

Se utilizaron las herramientas BLASTN, InParanoid, TargetP1.1, alineamientos múltiples y árboles filogenéticos para proponer la función o localización subcelular de las secuencias de trigo que estaban pobremente anotadas y en los genes ortólogos identificados. Para la búsqueda de homología con todas las secuencias disponibles en las bases de datos y relacionar con la que tuviera un mejor valor, se realizaron alineamientos de secuencias con la aplicación BLASTN del NCBI (Altschul *et al.*, 1990), que compara la similitud entre secuencias nucleótido a nucleótido, o con el programa InParanoid (Remm *et al.*, 2001), que determina los ortólogos por alineamiento de secuencias de aminoácidos y árboles filogenéticos. La presencia de señales en la secuencia de aminoácidos que indiquen la localización subcelular de las proteínas se comprobó con el programa TargetP1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000), que analiza la presencia de péptidos señales en la secuencia problema. También se usaron otros programas con funciones similares como InterProScan, Predotar y PSORT para corroborar o complementar las predicciones realizadas con las herramientas previamente descritas. En algunos casos, los genes ortólogos se introdujeron en el programa CDD (“Conserved Domain Database”) del NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2011) para localizar huellas de dominios conservados y sitios funcionales inferidos de esas huellas que confirmaran su función biológica. Los alineamientos múltiples de secuencias (MSA, “Multiple Sequence Alignment”) se realizaron con el método ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), implementado en el paquete MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando las secuencias de estudio, preferiblemente de aminoácidos, junto con secuencias perfectamente conocidas de otras especies próximas (arroz, cebada, *Brachypodium*, etc.) e incluso la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Los MSAs se construyeron en base al método conocido como “progressive sequence alignment”, en el que se alinearon las secuencias más similares y progresivamente se añadieron las más divergentes. Los árboles filogenéticos, basados en los MSAs, permiten detectar ortólogos de la forma más correcta, ya que por definición éstos están relacionados por la historia evolutiva (Remm *et al.*, 2001). Se construyeron según el método de “neighbor-joining” (Saitou & Nei, 1987), junto a las herramientas implementadas en el paquete MEGA5. Este método se fundamenta en las distancias de una matriz, calculadas para todas las combinaciones posibles entre las secuencias según el porcentaje de diferencia entre éstas. Dentro de este método, se emplearon los distintos modelos de sustitución disponibles para calcular las distancias evolutivas, siendo el más habitual el del número de diferencias. Se realizó un análisis “bootstrap” (Felsenstein, 1985) para asegurarse de la fiabilidad estadística de cada rama del árbol filogenético. Consiste en la toma de submuestras de los

datos de modo aleatorio y la construcción de árboles de cada submuestra, realizado 1.000 veces, calculando la frecuencia de cada parte del árbol filogenético consenso. Alguno de los ortólogos de trigo para TFs claves en Arabidopsis se han propuesto utilizando árboles filogenéticos y el buscador BLAST de GramineaeTFDB (Mochida *et al.*, 2011), seguido de otro BLAST frente a la base de datos TAIR con la secuencia de trigo encontrada, método conocido como BLAST bidireccional (Pavlopoulou & Michalopoulos, 2011).

3.2.8.2. Diseño de primers

Para el diseño de los primers específicos para las secuencias de los genes se utilizó el programa Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012), siguiendo criterios estrictos y rigurosos que incluían un tamaño de primer entre 18 y 25 nucleótidos, un contenido de guanina y citosina entre el 40-60%, un tamaño del amplicón de 60-150 nucleótidos y una T_m (temperatura de fusión) de 60 ± 1 °C (Udvardi *et al.*, 2008). El diseño de primers se realizó en el programa Primique (Fredslund & Lange, 2007) cuando existían secuencias con gran homología con la de estudio, con o sin la misma función (Fig. 3.2.8.2a). Si al menos uno de los primers solapaba con una región con múltiples SNPs, se consideró suficiente para lograr la especificidad deseada (Uauy *et al.*, 2009). Cuando se desconocían los genes homólogos, sólo se diseñó el primer en el gen conocido sin considerar ninguna restricción, comprobando posteriormente si la PCR generaba uno o varios amplicones. Las secuencias de los primers fueron ‘blasteadas’ en GenBank con criterios muy estrictos para demostrar su especificidad con, al menos, las secuencias disponibles en la base de datos hasta la fecha. Después se importaron en el programa Oligo Analyzer (Owczarzy *et al.*, 2008) para comprobar las condiciones de PCR, la posible formación de estructuras secundarias como horquillas o la complementariedad entre la pareja de primers, entre otros. La síntesis de los primers se solicitó a empresas especializadas (Biomers e Integrate DNA Technologies).

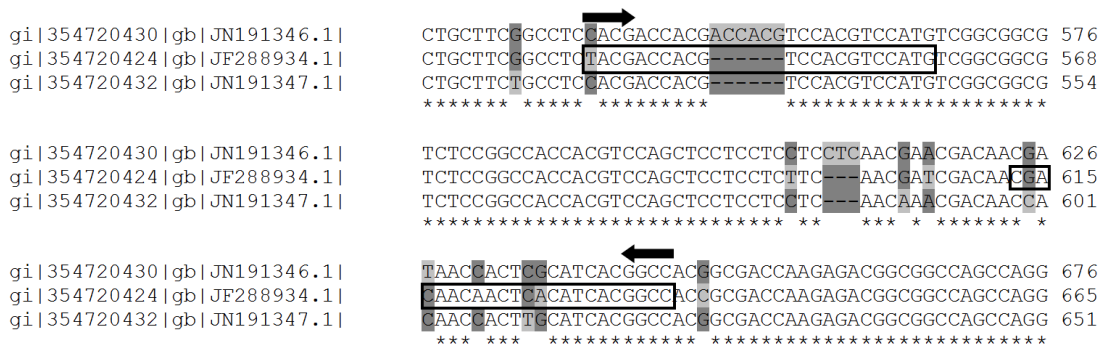


Fig. 3.2.8.2a. Diseño específico de primers para el gen MYB13-1 (JF288934.1) dentro de la familia MYB13, compuesta por 3 genes homólogos. Se muestra una parte del alineamiento con ClustalW y los primers diseñados dentro de los cuadros.

3.2.8.3. Aislamiento y cuantificación de ARN

Para el aislamiento de ARN se siguió el protocolo descrito por Morcuende *et al.* (1998), basado en aquellos propuestos por Logemann *et al.* (1987) y Sambrook *et al.* (1989). Se utilizó material vegetal de la hoja bandera y de la raíz de los experimentos en cultivos hidropónicos y de la hoja bandera del experimento de campo. Durante todo el proceso, se tomaron precauciones para mantener las condiciones de esterilidad de los reactivos e instrumentos y del entorno de trabajo: autoclavado de

todo el material a 120 °C y 1,06 kg·cm⁻² de presión durante 20 min en un Autester 437-G (JP Selecta) y limpieza del entorno y material de trabajo con el producto RNase away (Molecular Bioproducts).

Unos 100 mg de material foliar pulverizado en morteros enfriados con N líquido se transfirieron a un eppendorf estéril y se homogeneizaron con 450 µL de tampón de extracción, compuesto por guanidina 6 M pH 7, EDTA 20 mM y ácido 2-etanosulfónico (MES) 20 mM, sometido a filtración estéril a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm (Fischerbrand) acoplado a una jeringa desechable estéril, y al que justo antes de su uso se añadió β-mercaptoetanol a una concentración final en la solución de 50 mM. Seguidamente, se añadieron 450 µL de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (Sigma-Aldrich). Las muestras se agitaron vigorosamente y se mantuvieron en hielo durante el proceso. Se centrifugaron 15 min a 4 °C y 13.200 rpm para facilitar la separación de fases. A continuación, se recogió el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se añadieron 1/20 volúmenes del sobrenadante recuperado de ácido acético 1 M y 0,7 volúmenes de etanol al 100% (v/v). Después de agitar las muestras, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min para facilitar la precipitación del ARN. Se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores y el sobrenadante se retiró. Al precipitado se añadieron 450 µL de acetato sódico 3 M pH 5,5, se agitó y centrifugó nuevamente otros 15 min en las mismas condiciones, eliminando el sobrenadante. El ARN precipitado se resuspendió en 450 µL de etanol al 70% (v/v), que se eliminó posteriormente después de una centrifugación. Los restos de etanol se dejaron evaporar a temperatura ambiente. A continuación, el ARN se disolvió con H₂O-DEPC (agua ultrapura con dietileno pirocarbonato al 0,1% (v/v)) provista de inhibidor de ARNasas al 0,5% (v/v) (RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega), para evitar su degradación. Con objeto de facilitar una mejor disolución del ARN, las muestras se calentaron 5 min a 50 °C. En el caso de las muestras de raíz, se utilizó una mayor cantidad de material vegetal y, para incrementar la eficiencia en la extracción del ARN, se prepararon dos eppendorfs con unos 200 mg de material por muestra, a los cuales se añadieron 700 µL de tampón de extracción y de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Tras la separación de fases, los sobrenadantes de las dos extracciones se recogieron en un único eppendorf, y se continuó con la precipitación con ácido acético y etanol en la proporción adecuada al sobrenadante recogido conjuntamente. El protocolo se siguió de la manera anteriormente descrita para las hojas.

La cantidad y calidad del ARN obtenido se analizó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), utilizando 1 µL de muestra y H₂O-DEPC como blanco. La absorbancia a 260 nm permitió cuantificar la cantidad de ARN en ng·µL⁻¹, mientras que la calidad se comprobó con las absorbancias a 230, 260 y 280 nm (Fig. 3.2.8.3a). Se consideró que el procedimiento de aislamiento generó ARN de elevada calidad cuando las razones A₂₆₀:A₂₈₀ y A₂₆₀:A₂₃₀ fueron superiores a 1,8 y 2, respectivamente (Udvardi *et al.*, 2008). La integridad del ARN aislado se evaluó por separación electroforética de los ácidos nucleicos en geles desnaturizantes de agarosa, utilizando formaldehído como agente desnaturizante (Fig. 3.2.8.3a), el cual evitaría la formación de estructuras secundarias intracatenarias del ARN que dificultarían la visualización nítida de las bandas del ARNr (Sambrook *et al.*, 1989). Para preparar el gel, se disolvió la agarosa en proporción al 1,5 % (p/v) en agua estéril por calentamiento en un microondas, se dejó atemperar y se añadió, para una concentración final de la mezcla, formaldehído al 6% (v/v) y tampón 10×MEN, compuesto por ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS) 0,02 M, acetato sódico 5 mM y EDTA 1 mM. Dicha mezcla se homogeneizó y se vertió en una cubeta electroforética horizontal Mini-Sub Cell GT (BioRad). Después de la polimerización, se llenó la cubeta con tampón 1×MEN (tampón 10×MEN diluido 1:10). Unos 2 µg de ARN para hojas y 0,2 µg para raíz (por la escasez de ARN obtenido en comparación con las hojas) se mezclaron con un tampón formado por 1,8 µL de 10×MEN, 7,5 µL de formamida, 2,1 µL

de formaldehído al 37% (v/v) y 0,15 μL de bromuro de etidio. Se incubaron a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min, dejando posteriormente atemperar para su cargado en el gel. La separación electroforética se produjo a un voltaje de 100 V durante aprox. 45 min, y se comprobó con luz UV en un transiluminador GeneGenius Imaging System con el programa GeneSnap (Syngene). Las muestras de ARN se almacenaron a -20°C .

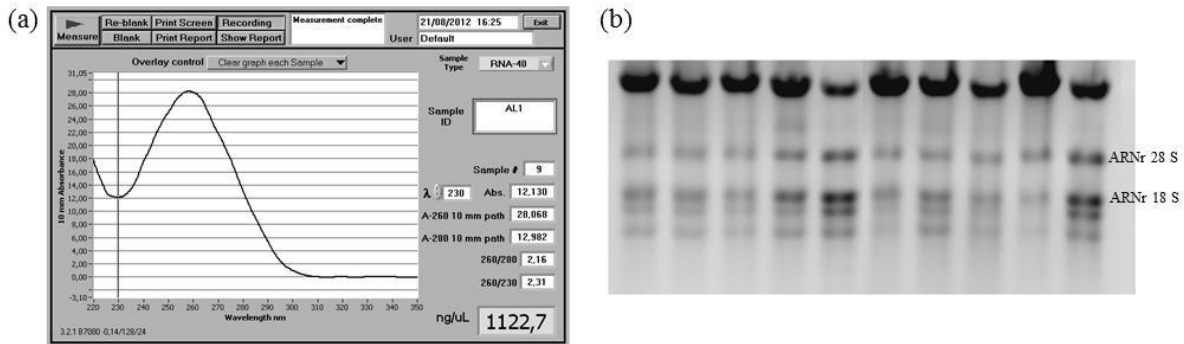


Fig. 3.2.8.3a. (a) Cuantificación del ARN de una muestra de raíz utilizando el Nanodrop ND-1000 y (b) muestras de ARN de la hoja bandera separadas por electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa. La razón de absorbancia $A_{260}:A_{280}$ se utilizó como indicador de la pureza del ARN, ya que la absorbancia próxima a 280 nm pueda aumentar debido a la presencia de ADN, fenoles residuales, proteínas u otros contaminantes (Bustin *et al.*, 2009), y la razón $A_{260}:A_{230}$ se usó como medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos.

3.2.8.4. Digestión de ADN genómico

En la mayoría de protocolos de aislamiento de ARN es frecuente la contaminación de las muestras con ADN genómico (ADNg). Su digestión se realizó con el kit Turbo DNA-free (Ambion), que contiene una ADNasa con una eficiencia catalítica muy elevada que permite la degradación del ADN hasta un límite no detectable por PCR. Se preparó una mezcla a partir de 10 μg del ARN extraído, 5 μL de tampón 10 \times ADNasa Turbo, 2 U de ADNasa Turbo y el agua del kit hasta completar 50 μL . Después de incubar la mezcla a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, se añadieron 5 μL de un agente de inactivación de la ADNasa y se dejó actuar durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 90 s a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se recogió el sobrenadante (ARN libre de contaminación genómica) para continuar con la síntesis de ADN complementario (ADNc). Alícuotas del ARN digerido se cargaron en un gel desnaturalizante de agarosa al 1,5%, como el descrito en el apartado anterior, para comprobar que se mantuvo la integridad del ARN tras la digestión del ADNg (Fig. 3.2.8.4a).

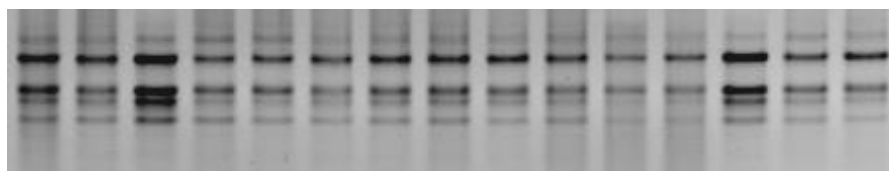


Fig. 3.2.8.4a. Muestras de ARN de la hoja bandera después de la digestión de ADNg separadas por electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa.

La posible contaminación de las muestras de ARN digeridas con ADNg se comprobó por qRT-PCR. Para ello, se usó una pareja de primers que fueron diseñados en distintos exones, dejando un intrón en

medio, para el gen “housekeeping” que codifica la subunidad grande de la ARN polimerasa I (AB647308; Fw, ATCAGCTAACATTGGCACGC; Rev, TCCTTCCACAACATCAGCCA). Tanto el ARN digerido como el ADNc sintetizado se utilizaron en la qRT-PCR con los primers indicados. Los productos se cargaron en geles de agarosa de alta calidad MS8 (Conda) disuelta en tampón 0,5×TBE (EDTA 4 mM, Tris base 45 mM, H₃BO₃ 45 mM) al 3,5% (p/v). También se utilizó este tampón para rellenar la cubeta electroforética. Previo a su cargado, los productos de la qRT-PCR se mezclaron a razón 2:1 con el tampón de muestra, constituido por glicerina al 4,4% (v/v), orange G al 1,4% (p/v), azul de bromofenol al 3,5% (p/v), xilencianol al 3,5% (p/v) y bromuro de etidio al 0,006% (v/v). Se cargó también un marcador de longitud de los fragmentos de ADN de 25 a 500 pb (HyperLadder V, Bionline). La separación electroforética se produjo a un voltaje de 100 V durante unos 45 min y se observaron las bandas en el transiluminador. El diseño de los primers realizado para el gen de la ARN polimerasa muestra que el ARN digerido con ausencia de ADNg no produce ninguna banda, el ARN contaminado produce una de 232 pb, el ADNc con el ADNg digerido produce una de 120 pb (sin el intrón), y el ADNc contaminado produce dos, de 232 y 120 pb.

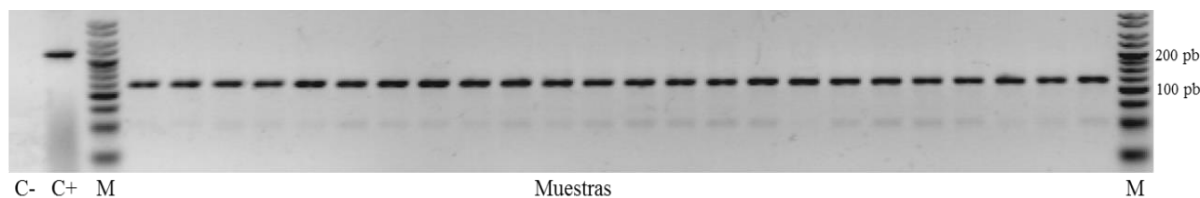


Fig. 3.2.8.4b. Productos de la qRT-PCR de muestras de ADNc de hoja bandera utilizando los primers para el gen que codifica la subunidad grande de la ARN polimerasa I separados en geles de agarosa, los cuales generan una banda de 120 pb, indicativo de que están libres de contaminación genómica. Se muestra un control negativo con agua (C-), un control positivo de ARN sin digerir que muestra una banda de 232 pb (C+), y los marcadores HyperLadder V (M).

3.2.8.5. Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADNc se realizó en un volumen de 20 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante para la SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen), en el que se mezclaron 11 µL de ARN libre de contaminación genómica, 1 µL de oligo(dT)₂₀ 50 µM (Invitrogen) y 1 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM cada uno (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Bionline). La mezcla se calentó a 65 °C durante 5 min y se enfrió en hielo otros 3 min. Se añadió 1 µL de inhibidor de ARNasas (Promega), 4 µL de tampón 5×First-Strand, 1 µL de DTT 0,1 M, y 200 U de la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). Esta transcriptasa reversa se caracteriza por presentar una alta estabilidad térmica y vida media y una reducida actividad ARNasa H. Después de una homogeneización suave de los componentes, la mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente y, posteriormente, 1 h a 50 °C. La reacción se inactivó por calentamiento durante 15 min a 70 °C. El ADNc generado se almacenó a -20 °C para su uso como molde en la qRT-PCR.

3.2.8.6. Condiciones de la qRT-PCR

La qRT-PCR se realizó utilizando el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que contenía la polimerasa AmpliTaq Gold (ADN polimerasa termoestable), los dNTPs, un tampón de reacción adecuado y SYBR Green I Dye, que es un fluoróforo que se une inespecíficamente, y de forma dependiente del número de copias, a todo ácido nucleico de doble cadena generando un

aumento de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN molde. Se utilizaron placas ópticas de 384 pocillos para la qRT-PCR (Applied Biosystems) en un volumen final de reacción de 10 μ L. A tal fin, se añadieron 5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix, 4 μ L de la mezcla de primers forward y reverse 0,5 μ M para cada uno de los genes de estudio y 1 μ L del ADNc, en la dilución correspondiente para lograr una buena amplificación (1:40 para la hoja bandera y 1:10 para la raíz). Se utilizó agua como control negativo. Con independencia del número de genes estudiados en cada una de las réplicas biológicas, se incluyeron también en el análisis los primers para el gen de referencia (apartado 3.2.8.8). En este estudio se emplearon tres réplicas biológicas para cada uno de los tratamientos, estadios de desarrollo y/o periodo de incubación de los experimentos realizados y dos repeticiones técnicas. En análisis previos se comprobó que ese número de réplicas técnicas fue suficiente para obtener una buena reproducibilidad de datos con el uso de pipetas multicanal para el cargado de los primers y de pipetas electrónicas para la dispensación de la mezcla de ADNc y SYBR Green. Una vez cargada la placa con todos los componentes, se cubrió con el film MicroAmp Optical Adhesive Film Kit (Applied Biosystems). El seguimiento de la qRT-PCR se realizó en el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando el programa SDS v2.4 (protocolo “Standard”).

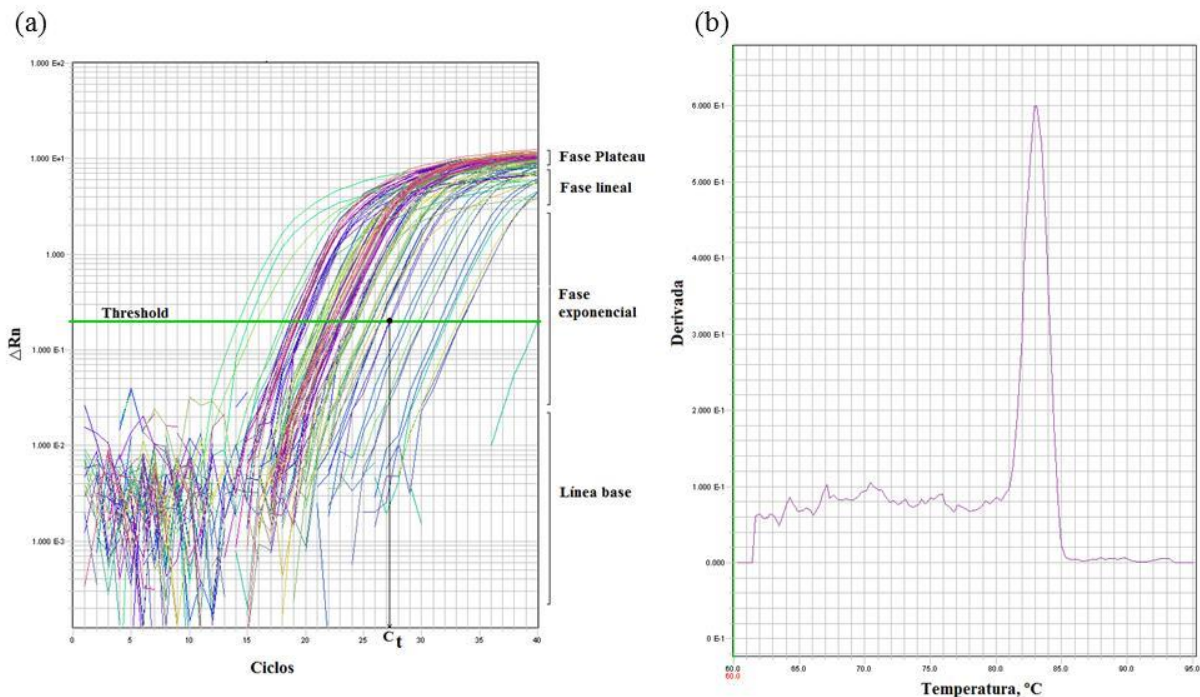


Fig. 3.2.8.6a. (a) Gráfico de amplificación y (b) curva de disociación de la qRT-PCR de muestras de trigo duro utilizando el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System y el programa SDS v2.4. La fase exponencial de la amplificación tiene forma de recta al usar una escala logarítmica, seguida de una fase “plateau” final en la que se atenúa la fluorescencia al agotarse los reactivos.

El perfil térmico utilizado fue: (i) un ciclo de 2 min a 50 °C (pretratamiento UDG), (ii) un ciclo de 10 min a 95 °C para que se produzca la activación de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold DNA Polymerase, (iii) 40 ciclos para la amplificación de los transcritos de estudio, con un primer paso de 15 s a 95 °C para producir la desnaturalización del ADNc de doble cadena, y un segundo paso de 60 s a 60 °C (T_m) para que se produzca la hibridación de los primers con las secuencias diana y la extensión de éstos, y (iv) un ciclo de 15 s a 95 °C y 15 s a 60 °C para obtener la curva de disociación. Se

obtuvieron los gráficos de amplificación (Fig. 3.2.8.6a), que muestran la señal de fluorescencia de cada una de las muestras que se obtiene en cada ciclo, ΔR_n . Para analizar la expresión se utilizó la fase exponencial por ser la zona en la que se cumple que el número de transcritos (N) aumentan de la forma $N \times 2^n$, siendo n el valor de C_t (“cycle threshold”). El C_t se corresponde con el ciclo en el cual la fluorescencia para la muestra alcanza un valor arbitrario umbral de ΔR_n , conocido como “threshold” (Fig. 3.2.8.6a), que queda dentro de la fase exponencial. Las curvas de disociación se generaron inmediatamente después de la qRT-PCR y de forma independiente, permitiendo comprobar la especificidad de los primers diseñados y la detección de productos inespecíficos.

3.2.8.7. Validación de los primers diseñados

La validación de los primers diseñados para las secuencias de los genes diana fue exhaustiva debido a que la mayoría de los primers fueron diseñados en secuencias de trigo blando. Se evaluó por medio de las curvas de disociación de los productos de la qRT-PCR, por la separación electroforética de dichos productos y por la secuenciación de algunos de ellos. En primer lugar, se validaron los primers al comprobar que los productos de la qRT-PCR producían un único pico en las curvas de disociación (Fig. 3.2.8.6a) y un único producto del tamaño esperado en geles de agarosa al 3,5% (p/v), utilizando varias réplicas biológicas de distintos tratamientos. Paralelamente, también se comprobó si producían una única banda del tamaño esperado en geles de agarosa al 3,5% (p/v) al amplificar las muestras por PCR convencional en un termociclador TProfessional Basic (Biometra), siguiendo las instrucciones del fabricante para el kit Herculase II Fusion DNA Polymerase (Stratagene). Por otra parte, se secuenciaron 15 productos de la qRT-PCR de muestras de la hoja bandera escogidos aleatoriamente para otros tantos genes de estudio, para determinar con exactitud si se correspondían con las secuencias de las bases de datos. Los productos se purificaron por medio de la adición de la mezcla proporcionada en el kit Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare) en proporción 1:2,5 al producto de la PCR. Se incubó 15 min a 37 °C y, posteriormente, otros 15 min a 80 °C. En la primera incubación, se eliminaron los productos sobrantes de la qRT-PCR, ya que la exonucleasa I añadida facilitó la digestión del ADNc de una sola cadena presente en la muestra, liberando desoxirribonucleósidos monofosfatos (dNMPs), mientras que la fosfatasa alcalina añadida catalizó la desfosforilación de los nucleótidos no incorporados y los dNMPs, quedando el producto de PCR purificado intacto. En la segunda incubación se inactivaron ambas enzimas. Unos 50 ng del producto purificado y 3,2 pmoles de cada primer en un volumen final de 8 μ L se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. Mediante el uso de un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystem), se secuenció el mismo producto en un sentido usando el primer forward (5'→3') y en el otro sentido usando el primer reverse (3'→5'), ya que los amplicones generados en la qRT-PCR eran pequeños y los primeros nucleótidos de cada secuenciación no se leen perfectamente (Fig. 3.2.8.7a). Los cromatogramas se editaron manualmente con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v7.1.11 (Hall, 1999). Finalmente, se realizó un alineamiento de las dos lecturas para cada gen y la secuencia sobre la que se diseñaron los primers con el programa MUSCLE (Edgar, 2004).

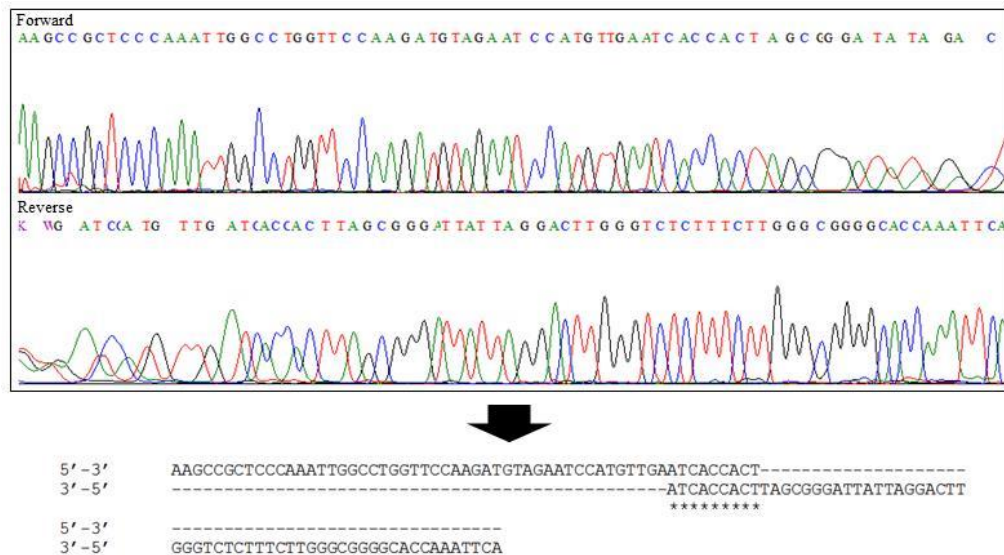


Fig. 3.2.8.7a. Cromatogramas de las secuenciaciones del producto de la qRT-PCR para el gen *psaA* (TC432721) con el primer forward y reverse. Las secuencias obtenidas de ambos cromatogramas se alinearon con MUSCLE.

3.2.8.8. Normalización y análisis de los resultados de expresión génica

La cuantificación de los transcritos se realizó en términos relativos, es decir, se expresó el cambio en los niveles de expresión de ARNm entre los genes de estudio con respecto a un gen control, también conocido como gen de referencia, estándar interno o “housekeeping”, según el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). De este modo, el nivel de expresión de cada gen de estudio se normalizó con la expresión de un gen de referencia que se presume que es representativo de la concentración de ADNc en cada muestra, y que está sujeto a los mismos errores durante la preparación de ADNc que los genes de estudio (Bustin *et al.*, 2005), tales como la variabilidad en la cantidad y calidad del ARN, y la eficiencia en la retrotranscriptasa y la PCR, entre otros factores (Hruz *et al.*, 2011). El paso crítico para la correcta normalización de los datos de expresión génica es la selección de un gen de referencia con un nivel de expresión estable en todas las condiciones experimentales y estadios de desarrollo estudiados, y cuya abundancia muestre una fuerte correlación con la cantidad total de ARNm (Hruz *et al.*, 2011).

Se seleccionaron siete genes de referencia candidatos entre los propuestos por Paolacci *et al.* (2009) en trigo blando (Tabla 3.2.8.8a). La validación de dichos genes en trigo duro se realizó por qRT-PCR, con los pares de primers abajo descritos, tras comprobar experimentalmente que amplificaban un único producto con el tamaño deseado. Para evaluar la estabilidad en la expresión de los genes de referencia candidatos y la reproducibilidad de su patrón de expresión en nuestras condiciones experimentales, se utilizó ADNc del material vegetal correspondiente a la hoja bandera de los tres experimentos realizados. Se utilizaron un total de 96 muestras foliares pertenecientes a plantas crecidas con diferentes niveles de CO₂, temperatura y disponibilidad de N, recogidas en distintos estadios de desarrollo y horas del día. También se examinó la variabilidad en la expresión de los genes de referencia candidatos en otras condiciones experimentales diferentes a las nuestras, para lo que se utilizó la herramienta RefGenes de Genevestigator (Hruz *et al.*, 2011). Esta base de datos incorporaba resultados de expresión génica de 1.532 microarrays de trigo (abril de 2013). Los resultados experimentales y los de RefGenes nos permitieron la selección del gen de referencia más apropiado

para la normalización de los resultados de expresión génica en la hoja. Por último, el gen de referencia seleccionado como más estable en el amplio abanico de condiciones experimentales estudiadas en la hoja se validó en 48 muestras de material radicular de los dos experimentos hidropónicos.

Tabla 3.2.8.8a. Secuencias de los genes de referencia candidatos utilizados en la selección del más apropiado para la normalización de datos de expresión génica en trigo duro.

Unigene	Identificación	Secuencia 5'→3' (Forward, F; Reverse, R)		Producto (pb)
Ta54825	Actina	F	TGACCGTATGAGCAAGGAG	215
		R	CCAGACAACCTCGCAACTTAG	
Ta25534	α -tubulina	F	GCCATCTACGACATCTGC	150
		R	GGTCTGGAACCTCGGTTATG	
Ta2291	Factor de ribosilación-ADP, ADP-RF	F	GCTCTCCAACAACATTGCCAAC	165
		R	GCTTCTGCCTGTCACATACGC	
Ta44405	β -tubulina	F	GCTTGCTGTCAATCTCATC	136
		R	CTTGGCATCCCACATTTG	
Ta50503	Ubiquitina	F	GCACCTTGGCGGACTACAACATTC	131
		R	GACACCGAAGACGAGACTTGTGAACC	
Ta2776	Proteína similar al inhibidor ARNasa L, RLI	F	CGATTACAGAGCAGCGTATTGTTG	242
		R	AGTTGGTCGGGTCTCTTCTAAATG	
Ta54227	Proteína de control de división celular, superfamilia AAA de ATPasas, CDC	F	CAAATACGCCATCAGGGAGAATC	227
		R	CGCTGCCGAAACCACGAGAC	

La intensidad de fluorescencia durante la qRT-PCR está determinada por la concentración inicial del ADNc de estudio y por la eficiencia de la amplificación, como se muestra en la ecuación $X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$, donde X_n es el número de copias del gen de estudio en el ciclo n , X_0 es el número de copias iniciales del gen de estudio, E_x es la eficiencia de la amplificación y n es el número de ciclos (valor de C_t). El valor de C_t se obtuvo de la fase exponencial de la qRT-PCR fijando un valor umbral “*threshold*” de $\Delta R_n = 0,2$ (Fig. 3.2.8.6a). Para amplicones menores a 150 pb, con una concentración de primer y Mg^{2+} optimizada, la eficiencia es próxima a 1 (Livak & Schmittgen, 2001). Se comprobó la eficiencia de la qRT-PCR en 1.728 muestras seleccionadas aleatoriamente para un grupo variado de genes con el programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009). Este método se basa en la cinética de la reacción, calculando la eficiencia a partir de la regresión lineal de la fase exponencial. Se obtuvo un valor medio de eficiencia en la fase exponencial de $0,95 \pm 0,04$, próximo a 1 y con una desviación pequeña. Por ello, se aceptó para todos los cálculos el valor teórico de 1. La cantidad de copias del gen de estudio normalizado con el gen de referencia y relativo a un control se calculó del siguiente modo:

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_{T,GE} - C_{T,GR} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T,GE} - \Delta C_{T,GC} \\ \text{Fold change}_{GE} &= 2^{-\Delta\Delta C_T}\end{aligned}$$

donde $_{GE}$ hace referencia al gen de estudio, $_{GR}$ al gen de referencia y $_{GC}$ al gen de estudio en el tratamiento control. El término $\Delta C_{T,GC}$ indica el promedio de todas las réplicas biológicas del tratamiento control. En los experimentos 1 y 2 se consideró como tratamiento control aquel con una $[CO_2]$ ambiente para ambas concentraciones de N (EL vs AL; EH vs AH), mientras que para el experimento 3 se tomó como único control el tratamiento con una $[CO_2]$ y temperatura ambiente y un aporte de N alto (tratamiento AIH). Por definición, $\Delta\Delta C_T$ en el tratamiento control es 0, y 2^0 es igual a 1, de este modo el valor del *fold change* en el resto de tratamientos hacen referencia a las veces que el nivel de expresión del gen de estudio cambia con respecto al control. Sin embargo, estos datos no se utilizaron para su representación ni para su análisis estadístico al no estar distribuidos normalmente

(los resultados por debajo del control van de 1 a 0, y por encima de 1 a ∞). Para evitar dicha discrepancia y que todos los valores fuesen normales, se presentaron de la forma siguiente (Zaragosi *et al.*, 2011; van Peer *et al.*, 2012):

$$\text{Expresión génica} = \log_2(\text{fold change}_{\text{GE}})$$

Los cálculos de la significación estadística se realizaron con los datos correspondientes a $2^{-\Delta C_T}$ para cada tratamiento, incluido el control (Schmittgen & Livak, 2008). En este caso, los valores para cada gen se expresaron en función del valor del gen de referencia, corrigiendo dicho valor con la inversa negativa en el caso de que la expresión del gen fuera menor a la del de referencia. De este modo el análisis estadístico se realizó con datos simétricos, lo que no ocurriría si se usaran los valores \log_2 , que son logarítmicos y no siguen la misma escala.

3.2.9. Visualización de datos biológicos en rutas metabólicas

Se integran los cambios en el contenido de metabolitos, transcritos y la proteína Rubisco de los experimentos 1 y 2 mediante la visualización conjunta de estos parámetros por rutas biológicas o áreas con una función biológica común con el programa MapMan v3.5.1R2 (Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2005; Usadel *et al.*, 2009). La visualización de los resultados por grupos con una determinada función común mejora la interpretación de los resultados, al menos en el caso de la expresión génica (Usadel *et al.*, 2009). A cada transcrito, metabolito o proteína se le asignó un código BIN y subBIN de forma manual, que simbolizan una categoría funcional. Para aquellos componentes que no disponían de un BIN, se les asignó uno nuevo. El conjunto de los BINs para los parámetros estudiados se cargó en la pestaña “Mappings” del programa (Tabla 3.2.9a). Se diseñó un diagrama del metabolismo primario del C y del N para poder mostrar los resultados de transcritos, metabolitos y proteína Rubisco analizados en una única figura, creada tras una revisión bibliográfica pormenorizada (Vijn & Smeekens, 1999; Lancien *et al.*, 2000; Kruger & von Schaewen, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2008; Timm *et al.*, 2008; Foyer *et al.*, 2009; Taiz & Zeiger, 2010; Endler & Persson, 2011; Foyer *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). La ruta se importó en la pestaña “Pathways”, sobre la que se distribuyeron los BINs manualmente en su posición final para su visualización. Los resultados de los experimentos se importaron en la pestaña “Experiments”, indicando los códigos “Identifier” que se cargaron en el mapa y su valor numérico en una escala \log_2 . Finalmente, se visualizaron automáticamente los resultados para cada tratamiento, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación, seleccionando la escala de colores apropiada.

Tabla 3.2.9a. Estructura básica del mapa previo al cargado de los datos experimentales en MapMan.

Bincode	Name	Identifier	Description	Type
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	AJ635207	Putative photosystem II chlorophyll a-b binding protein LHCI, cab	T
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	M21352	Photosystem II protein D1, psbA	T
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	EU492899	Photosystem II protein D2, psbD	T
1.1.2.1	PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	FJ797425	Putative photosystem I chlorophyll a-b binding protein LHCI, CBP	T
1.3.1008	PS.calvin cycle.Rubisco protein	Rubisco	Rubisco protein	P
2.1.2.1001	major CHO metabolism.synthesis.starch	starch	Starch	M

Este trabajo también se realizó en la RWTH Universidad de Aachen (Aquisgrán, Alemania) con la colaboración del Prof. Dr. Björn Usadel durante otra estancia investigadora (EEBB-I-13-06806). Adicionalmente, durante esta estancia se llevó a cabo la secuenciación y análisis *de novo* del transcriptoma (RNA-Seq) de material vegetal perteneciente a la hoja bandera. Para ello, se utilizaron las plantas de trigo duro crecidas en el campo en el estadio de desarrollo correspondiente a la emergencia de la espiga bajo condiciones de CO₂ elevado y altas temperaturas. Los datos procedentes del RNA-Seq se están analizando en colaboración con D. Tony Bolger y el Prof. Dr. Björn Usadel.

3.2.10. Tratamiento estadístico y representación gráfica de los datos

Se utilizó un número de repeticiones biológicas por análisis suficiente para obtener resultados fiables y representativos. Se recogió el material vegetal de plantas seleccionadas aleatoriamente dentro del conjunto de plantas disponibles para cada tratamiento, estadio de desarrollo y/o periodo de incubación en cada uno de los experimentos. El efecto del CO₂ elevado (700 frente a 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) sobre todos los parámetros analizados, para cada aporte de N (0,5 y 5 mM NO₃⁻ en el experimento 1; 0,25 y 2,5 mM en el experimento 2) y estadio de desarrollo o periodo de incubación de forma independiente, se determinó en los experimentos hidropónicos a partir del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor con el programa Genstat 6.2 (VSN International Ltd). El análisis con un factor (dos niveles de CO₂ para cada disponibilidad de N) se eligió debido a la heterogeneidad de las varianzas del error cuando se utilizaron dos factores (dos niveles de CO₂ \times dos niveles de N). En este caso, la prueba de Fisher tendió a subestimar los efectos del CO₂ de crecimiento. También se contempló el análisis de la varianza para el efecto del aporte de N sobre cada variable, agrupando para cada uno de los aportes de N a comparar los resultados obtenidos para cada [CO₂]. Por otro lado, el experimento de campo tuvo un diseño de tres bloques con todas las combinaciones factoriales de dos niveles de CO₂ (370 y 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), temperatura (ambiente y 4 °C más elevada) y fertilización nitrogenada (15 y 140 kg N $\cdot\text{ha}^{-1}$). El efecto de los tratamientos y las interacciones se determinaron a partir del ANOVA de tres factores (CO₂ \times temperatura \times N).

El criterio utilizado para analizar las diferencias entre tratamientos fue la mínima diferencia significativa (test LSD), definida como el error estándar de la media multiplicado por el valor tabular de T para los grados de libertad y nivel de significación correspondientes. Se aceptó un nivel de significación de $P < 0,05$. Se trata de un p-valor que considera la significación con un 95% de exactitud, para evitar un error tipo I (rechazo indebido de la hipótesis nula). Además del análisis univariable para cada parámetro estudiado mediante el empleo de ANOVAs, se realizó un análisis multivariable de los efectos de la [CO₂] de crecimiento, la disponibilidad de N y su combinación utilizando los resultados para los metabolitos, proteínas, iones y actividades enzimáticas en los diferentes tratamientos del experimento 2. En concreto, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de redundancia (RDA) con el programa CANOCO 4.5 (Biometris, Plant Research International). La significación en el análisis RDA fue determinada por el test Monte Carlo con 999 permutaciones aleatorias.

Para la presentación de los datos en los gráficos de barras y/o diagramas de cajas se utilizó el programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.). La representación esquematizada de los datos de metabolitos y transcritos por grupos funcionales mediante una escala de color se efectuó con los mapas de calor (“heat maps”) creados con el formato condicional de Excel 2010 (Microsoft). Además, en el experimento de campo se creó un heat map con clusters con todos los datos fisiológicos,

bioquímicos y de transcritos obtenidos. Los clusters se crearon tanto para los tratamientos como para los parámetros analizados, utilizando el entorno de R (R Development Core Team, 2008). Para ello, los datos se importaron en formato .csv, se convirtieron a una matriz numérica y, con el paquete ‘gplots’, se obtuvo el heat map con clusters con una escala de colores utilizando los siguientes comandos:

```
> data<- read.csv("C:/data.csv", sep="; ")
> row.names(data) <- data$PARAMETER
> data<-data[,2:9]
> matrix_data<-data.matrix(data)
> install.packages( pkgs= "gplots" )
> library(gplots)
> my.breaks<-c(seq(-2,0,by=0.1), seq(0,2,by=0.1))
> heatmap.2(matrix_data, col=redblue, breaks=my.breaks, trace="none", key=T, keysize=1.5, lhei=c(1,8),
  lwid=c(1,4), margins=c(8,10))
```

Se construyeron redes de correlación entre parámetros biológicos (“association networks”), utilizando como punto de partida las regresiones lineales entre parámetros dos a dos. Cada valor (x,y) de cada regresión implica un valor “x” de una variable y un valor “y” de otra variable para el mismo individuo (datos pareados). Las regresiones lineales parten como predicciones de relaciones causales, determinando el grado de asociación entre dos variables siempre y cuando la relación sea lineal. Partiendo de un conjunto de datos, ya sea de metabolitos, transcritos, parámetros fisiológicos, etc. de uno o varios experimentos para todos los tratamientos analizados, se construyeron matrices de correlaciones en R utilizando el coeficiente de correlación de Pearson ($-1 \leq R \leq 1$):

```
> data<- read.csv("C:/data.csv", sep="; ")
> correlation_matrix<-cor(data, method="pearson")
> install.packages(pkgs="MASS")
> library(MASS)
> write.matrix(correlation_matrix, file="matrix.txt")
```

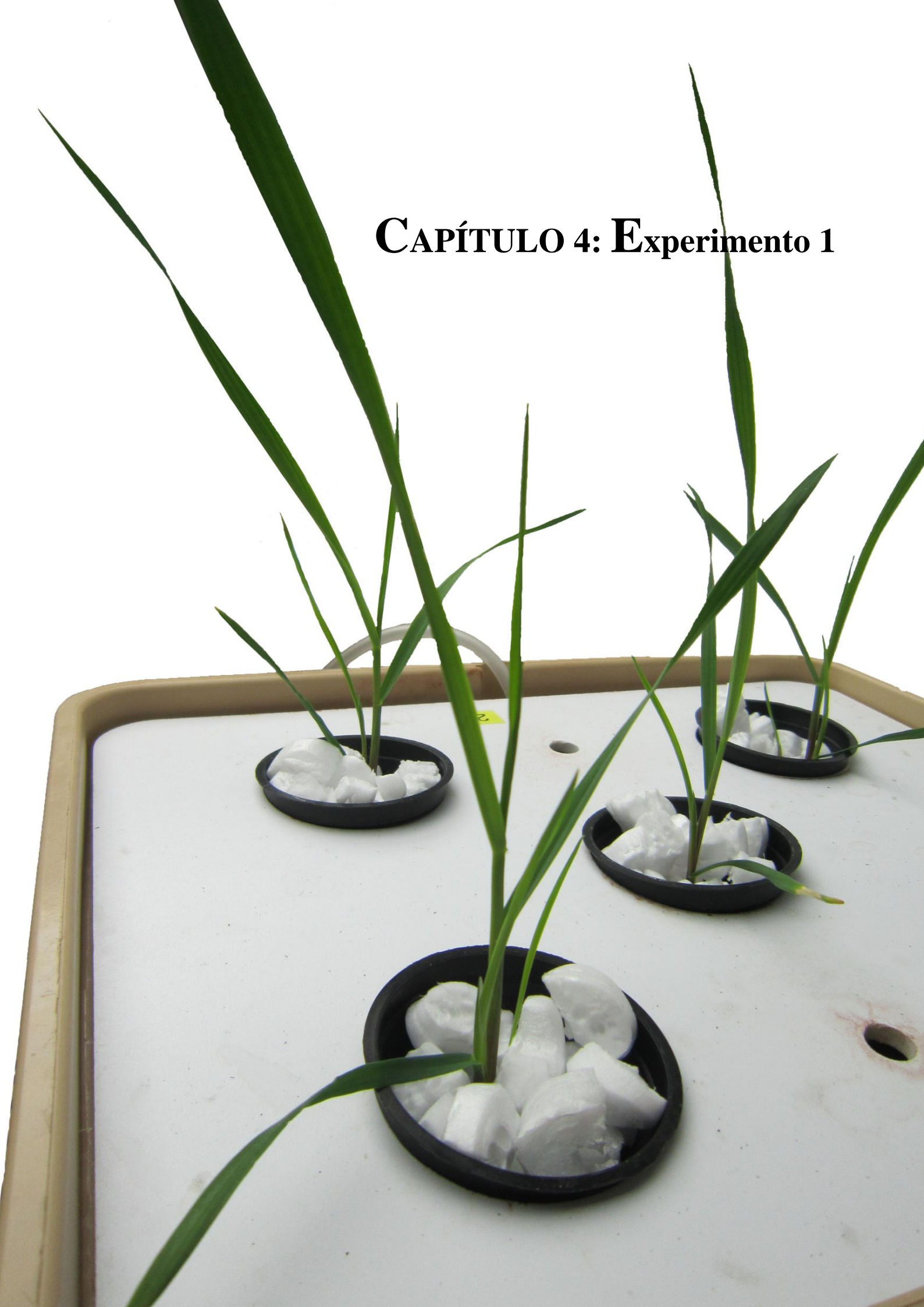
Fue posible obtener la matriz de correlación con los valores de P asociados en la misma tabla al crear una función nueva (cor.prob) y aplicarla a la matriz, como se detalla en los siguientes comandos. De este modo, se contrastó la hipótesis de no correlación ($R=0$) de acuerdo al valor de la t de Student ($P<0,05$). Los datos se dispusieron en cuatro columnas gracias a otra función (flattenSquareMatrix): la primera y la segunda para las variables utilizadas en la regresión, la tercera para el valor del coeficiente de correlación y la cuarta para P . Ambas funciones se obtuvieron de la web r-bloggers (<http://www.r-bloggers.com/>).

```
> data<- read.csv("C:/data.csv", sep="; ")
> correlation_matrix<-cor(data, method="pearson")
> cor.prob <- function (X, dfr = nrow(X) - 2) {
R <- cor(X, use="pairwise.complete.obs", method="pearson")
above <- row(R) < col(R)
r2 <- R[above]^2
Fstat <- r2 * dfr / (1 - r2)
R[above] <- 1 - pf(Fstat, 1, dfr)
R[row(R) == col(R)] <- NA
R
}
> correlation_matrix_pvalue<-cor.prob(data)
> flattenSquareMatrix <- function(m) {
if( (class(m) != "matrix") | (nrow(m) != ncol(m))) stop("Must be a square matrix.")
if(!identical(rownames(m), colnames(m))) stop("Row and column names must be equal.")
ut <- upper.tri(m)
data.frame(i = rownames(m)[row(m)[ut]],
```

```
j = rownames(m)[col(m)[ut]],  
cor=t(m)[ut],  
p=m[ut])  
}  
> flattenSquareMatrix(cor.prob(correlation_matrix_pvalue))  
> write.matrix(correlation_matrix_pvalue, file="matrix.txt")
```

Finalmente, se seleccionaron las regresiones lineales significativas según el coeficiente de correlación y el valor de P como se indica en Resultados. A partir de estas regresiones, se construyeron la redes de correlación entre parámetros al importar los datos en el software *Cytoscape 3.x* (Shannon *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 4: Experimento 1



4.1. Resultados del experimento 1

4.1.1. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el crecimiento de las plantas

4.1.1.1. Peso seco de las diferentes partes de la planta

En la antesis, el crecimiento en CO₂ elevado condujo, en comparación con las plantas crecidas en CO₂ ambiente, a una disminución del peso seco del resto y del total de la parte aérea con abundancia de N (Tabla 4.1.1.1a), y no tuvo efecto en aquellas con deficiencia de N. Un mayor aporte de N aumentó el peso seco de las distintas partes y del total de la planta, exceptuando el del último entrenudo del tallo, que tuvo un aumento próximo a la significación ($P=0,057$; Tabla 4.1.1.1a).

Al inicio del llenado del grano, el CO₂ elevado disminuyó la biomasa del total de los tallos seleccionados, como resultado del descenso del peso seco del último entrenudo del tallo y del resto del tallo en plantas con un aporte de N bajo, y tendió a disminuir la biomasa de la planta con N abundante ($P=0,052$; Tabla 4.1.1.1a). Un mayor aporte de N aumentó el peso de la planta y la mayoría de sus partes, exceptuando el de la espiga, el último entrenudo del tallo y el resto del tallo de los tallos seleccionados. La relación parte aérea:raíz fue mayor en plantas con N abundante con respecto a aquellas con N deficiente en los dos estadios de desarrollo investigados.

Tabla 4.1.1.1a. Peso seco (g) de las diferentes partes y relación parte aérea:raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=4$).

		AL	EL	AH	EH	<i>P_N</i>	lsd _N	<i>P_{CO2L}</i>	lsd _{CO2L}	<i>P_{CO2H}</i>	lsd _{CO2H}
Espiga	Ant	1,70	1,49	1,84	2,07	0,041	0,35	0,252	0,41	0,436	0,66
	ILG	3,38	2,87	3,26	3,55	0,466	0,80	0,123	0,69	0,684	1,66
Hoja bandera	Ant	0,30	0,35	0,49	0,50	<0,001	0,04	0,119	0,07	0,595	0,08
	ILG	0,34	0,32	0,53	0,54	<0,001	0,07	0,374	0,05	0,961	0,15
Últ. entren. tallo	Ant	1,13	1,07	1,29	1,28	0,057	0,19	0,606	0,27	0,967	0,34
	ILG	1,58	1,25	1,51	1,50	0,307	0,18	0,012	0,24	0,904	0,34
Resto hojas	Ant	1,42	1,21	2,50	1,92	<0,001	0,32	0,163	0,33	0,066	0,63
	ILG	1,59	1,50	2,00	2,14	0,011	0,38	0,645	0,42	0,669	0,75
Resto tallo	Ant	4,02	2,98	4,35	3,91	0,033	0,57	0,051	1,05	0,188	0,73
	ILG	4,90	3,45	4,78	4,23	0,242	0,58	0,014	1,03	0,144	0,80
Total selecc.	Ant	8,57	7,09	10,47	9,68	0,002	1,20	0,114	1,96	0,340	1,85
	ILG	11,79	9,39	12,08	11,95	0,030	1,26	0,015	1,74	0,888	2,22
Resto parte aérea	Ant	15,90	11,53	72,82	59,63	<0,001	6,04	0,207	7,54	0,029	11,28
	ILG	20,48	18,02	83,10	86,65	<0,001	20,06	0,383	6,38	0,852	44,60
Parte aérea	Ant	24,47	18,62	83,28	69,31	<0,001	7,09	0,173	9,26	0,038	12,94
	ILG	32,27	27,42	95,18	98,60	<0,001	21,02	0,141	7,01	0,863	46,69
Raíz	Ant	7,67	6,08	11,05	10,47	<0,001	1,70	0,222	2,86	0,594	2,53
	ILG	8,74	8,06	10,62	11,24	0,026	2,18	0,530	2,49	0,731	4,22
Planta	Ant	32,14	24,70	94,33	79,78	<0,001	8,45	0,179	11,97	0,052	14,72
	ILG	41,01	35,48	105,80	109,84	<0,001	22,92	0,196	9,29	0,851	50,6
Parte aérea:raíz	Ant	3,19	3,09	7,54	6,70	<0,001	0,56	0,636	0,49	0,123	1,15
	ILG	3,71	3,43	8,91	8,74	<0,001	0,73	0,207	0,48	0,804	1,58

4.1.1.2. Contenido de agua de las diferentes partes de la planta

En la antesis, el enriquecimiento en CO₂ incrementó el contenido de agua de la raíz en plantas con un mayor suministro de N. La abundancia de N aumentó, en comparación con plantas deficientes en N, el porcentaje de humedad del total de los tallos seleccionados y algunas de sus partes, como la espiga, el último entrenudo y el resto del tallo, y del resto y el total de la parte aérea de la planta (Tabla 4.1.1.2a).

Al inicio del llenado del grano, el CO₂ elevado aumentó el contenido porcentual de humedad del último entrenudo y resto del tallo, y del resto y total de la parte aérea de la planta con ambos niveles de N, el de la espiga y el total de los tallos seleccionados con un aporte bajo de N y el de la planta entera con un aporte alto de N. Además, la abundancia de N incrementó el contenido de agua de todas las partes separadas de la planta y del total de la misma, a excepción del resto de hojas de los tallos seleccionados (Tabla 4.1.1.2a).

Tabla 4.1.1.2a. Contenido de agua (%) de las diferentes partes de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P_N</i>	lsd _N	<i>P_{CO2L}</i>	lsd _{CO2L}	<i>P_{CO2H}</i>	lsd _{CO2H}
Espiga	Ant	66,51	66,06	69,20	68,65	0,001	1,35	0,628	2,19	0,543	2,09
	ILG	64,30	65,59	67,39	67,35	<0,001	0,95	0,023	1,04	0,956	1,87
Hoja bandera	Ant	67,66	66,29	69,73	67,90	0,092	2,19	0,458	4,22	0,127	2,54
	ILG	62,59	64,11	66,84	65,63	0,049	2,86	0,374	3,87	0,587	5,13
Últ. entren. tallo	Ant	74,16	76,29	78,61	78,76	0,002	1,91	0,159	3,21	0,900	2,81
	ILG	65,97	69,85	73,22	75,06	<0,001	1,45	0,019	3,00	0,013	1,30
Resto hojas	Ant	70,97	72,53	73,55	73,91	0,151	2,81	0,434	4,53	0,850	4,39
	ILG	69,09	67,77	72,54	69,54	0,208	4,28	0,730	8,94	0,083	3,53
Resto tallo	Ant	75,31	77,63	81,12	81,86	<0,001	1,72	0,127	3,21	0,433	2,14
	ILG	70,95	75,77	77,30	79,22	<0,001	1,12	0,001	1,99	0,023	1,54
Total selecc.	Ant	72,84	74,36	77,30	77,55	<0,001	1,62	0,198	2,57	0,817	2,58
	ILG	68,13	70,99	73,53	73,96	<0,001	1,10	0,011	1,91	0,527	1,57
Resto parte aérea	Ant	74,65	75,81	79,02	79,69	<0,001	1,60	0,314	2,59	0,538	2,51
	ILG	69,00	71,61	74,82	76,17	<0,001	0,88	0,005	1,51	0,040	1,27
Parte aérea	Ant	74,03	75,26	78,82	79,42	<0,001	1,54	0,257	2,40	0,579	2,50
	ILG	68,69	71,43	74,67	75,92	<0,001	0,86	0,004	1,49	0,048	1,23
Raíz	Ant	88,99	89,03	88,07	89,85	0,914	0,93	0,957	1,39	0,032	1,57
	ILG	86,63	85,96	87,57	87,93	<0,001	0,51	0,103	0,86	0,283	0,76
Planta	Ant	80,44	81,08	80,58	81,87	0,449	1,29	0,454	1,97	0,189	2,13
	ILG	75,66	76,85	77,09	78,17	0,001	0,72	0,060	1,26	0,041	1,02

4.1.1.3. Área verde de las diferentes partes de la planta

El crecimiento a concentraciones elevadas de CO₂ redujo la superficie verde del total de los tallos seleccionados en plantas deficientes en N, y del resto y total de la parte aérea de la planta en aquellas con N abundante en la antesis (Tabla 4.1.1.3a). Mientras que al inicio del llenado del grano únicamente disminuyó el área verde del resto del tallo de los tallos seleccionados en plantas con abundancia de N. El mayor aporte de N aumentó notablemente el área verde de todas las partes de la planta analizadas en los dos estadios de desarrollo investigados (Tabla 4.1.1.3a).

Tabla 4.1.1.3a. Área verde (cm²) de las diferentes partes de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Espiga	Ant	103,2	91,4	142,2	129,5	<0,001	16,3	0,096	14,6	0,389	33,6
	ILG	111,0	103,9	142,7	141,0	<0,001	17,3	0,437	20,9	0,905	32,8
Hoja bandera	Ant	43,6	44,6	66,1	60,8	0,004	12,0	0,854	13,2	0,598	23,5
	ILG	39,1	35,3	65,3	62,9	<0,001	12,5	0,620	17,7	0,790	21,8
Últ. entren. tallo	Ant	63,7	62,4	84,0	90,0	<0,001	7,2	0,762	10,0	0,290	12,6
	ILG	66,8	65,9	82,1	88,7	<0,001	7,5	0,770	7,6	0,320	14,9
Resto hojas	Ant	195,1	170,5	246,7	232,3	0,001	29,6	0,158	37,33	0,545	54,9
	ILG	192,9	183,6	245,9	218,3	0,024	36,9	0,485	30,63	0,414	76,9
Resto tallo	Ant	177,2	151,1	203,9	200,1	0,002	20,2	0,085	31,0	0,784	33,1
	ILG	157,3	146,4	232,7	188,0	<0,001	21,0	0,389	28,7	0,027	37,4
Total selecc.	Ant	582,8	520,1	743,0	712,6	<0,001	45,2	0,035	56,5	0,412	84,4
	ILG	567,1	535,1	768,6	698,8	<0,001	46,5	0,122	43,6	0,122	95,0
Resto parte aérea	Ant	1238,5	915,2	6435,2	5538,9	<0,001	383,9	0,134	457,3	0,024	731,2
	ILG	1158,5	1150,9	5912,9	6570,7	<0,001	1309,9	0,963	382,7	0,601	2917,1
Parte aérea	Ant	1821,3	1435,3	7178,1	6251,5	<0,001	403,7	0,100	485,8	0,025	765,7
	ILG	1725,6	1686,0	6681,4	7269,5	<0,001	1316,7	0,813	392,9	0,641	2931,3

4.1.1.4. Peso seco por área foliar

En la antesis, el crecimiento en CO₂ elevado aumentó, en comparación con las plantas de CO₂ ambiente, el peso seco por área foliar cuando el suministro de N fue bajo, mientras que no tuvo efecto con N alto, al igual que al inicio del llenado del grano con independencia de la disponibilidad nutricional (Tabla 4.1.1.4a). Por otro lado, el aumento del aporte de N en la solución nutritiva condujo a un incremento del peso seco por área foliar en la antesis y no tuvo efecto en estadios más avanzados del desarrollo de las plantas de trigo (Tabla 4.1.1.4a).

Tabla 4.1.1.4a. Peso seco por área foliar (g·m⁻²) de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
PS/A _{foliar}	Ant	63,98	72,22	75,68	72,51	0,050	5,99	0,030	7,16	0,521	11,40
	ILG	78,44	70,26	76,21	81,30	0,308	9,02	0,249	15,70	0,368	12,80

4.1.1.5. Número de tallos y espigas por planta y longitud de la raíz

El CO₂ alto no tuvo efecto significativo en el número de espigas y tallos por planta ni en la antesis ni al inicio del llenado del grano (Tabla 4.1.1.5a). En plantas con un mayor aporte de N aumentó el ahijamiento y el número de tallos con espiga o productivos y disminuyó la longitud de la raíz en ambos estadios de desarrollo (Tabla 4.1.1.5a).

Tabla 4.1.1.5a. Número de tallos y espigas por planta y longitud de la raíz (cm) de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Tallos	Ant	23,3	27,8	43,5	46,3	<0,001	6,1	0,165	7,0	0,590	11,8
	ILG	17,0	16,0	43,3	46,8	<0,001	4,2	0,738	7,0	0,218	6,2
Espigas	Ant	12,3	11,3	39,8	35,3	<0,001	2,8	0,502	3,4	0,086	5,4
	ILG	11,3	12,3	38,8	42,3	<0,001	8,5	0,439	3,0	0,664	18,8
Longitud raíz	Ant	63,5	63,4	38,2	39,0	<0,001	4,0	0,967	8,5	0,541	2,8
	ILG	66,5	61,6	38,7	40,6	<0,001	6,8	0,438	14,3	0,423	5,6

4.1.2. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la absorción de solución nutritiva y nitrato

Como se ha indicado en el capítulo de Materiales y Métodos, en las fases de desarrollo correspondientes a la antesis y el inicio del llenado del grano se incubaron plantas en un volumen fijo de solución nutritiva, lo cual permitió estimar la absorción de NO₃⁻ y el volumen de solución nutritiva absorbida por unidad de masa de raíz y por planta (Tabla 4.1.2a). En los dos estadios de desarrollo investigados, el CO₂ elevado condujo a una mayor absorción de solución nutritiva por unidad de masa de raíz en plantas con un menor aporte de N. Las plantas deficientes en N absorbieron, en comparación con las plantas crecidas con N abundante, menos volumen de solución nutritiva por unidad de masa de raíz y por planta durante las 24 h de incubación.

El enriquecimiento en CO₂ no afectó significativamente a la absorción de NO₃⁻ por unidad de peso seco de raíz en la antesis, y al inicio del llenado del grano redujo la absorción de NO₃⁻ por unidad de peso seco de raíz y por planta con un suministro de N bajo (Tabla 4.1.2a). Es importante señalar que durante las 24 h de incubación el NO₃⁻ de la solución no se agotó, estimándose los remanentes con respecto al total en un 36% y 71% en plantas con bajo y alto aporte de N, respectivamente, en la antesis, y en un 40% y 68% al inicio del llenado del grano. La absorción de NO₃⁻ por unidad de peso seco de raíz y por planta fue mayor con N abundante que con deficiencia de dicho nutriente tanto en la antesis como en el inicio del llenado del grano.

Tabla 4.1.2a. Solución absorbida por unidad de peso seco de raíz (mL·g PS⁻¹·d⁻¹) y por planta (mL·planta⁻¹·d⁻¹), y nitrato absorbido por unidad de peso seco de raíz (μmol·g PS⁻¹·d⁻¹) y por planta (mmoles·planta⁻¹·d⁻¹) en trigo cultivado en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Solución absorbida											
Por raíz	Ant	32,77	37,20	68,40	69,84	<0,001	5,45	0,013	3,08	0,776	11,85
	ILG	29,97	34,46	68,59	65,70	<0,001	5,73	0,031	3,93	0,585	12,25
Por planta	Ant	250,0	225,0	755,0	717,5	<0,001	46,9	0,499	85,1	0,191	62,3
	ILG	260,0	275,0	725,0	730,0	<0,001	116,6	0,510	52,4	0,964	256,5
NO₃⁻ absorbido											
Por raíz	Ant	88,0	90,3	243,2	284,7	<0,001	55,4	0,747	17,1	0,442	123,2
	ILG	95,7	54,9	320,7	336,7	<0,001	28,9	0,007	24,7	0,539	60,0
Por planta	Ant	0,67	0,55	2,70	2,84	<0,001	0,45	0,298	0,26	0,727	0,98
	ILG	0,83	0,44	3,41	3,76	<0,001	0,65	0,009	0,25	0,574	1,44

4.1.3. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido y la distribución del nitrógeno en la planta

En este trabajo se ha evaluado si el CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de N modifican el contenido y la distribución de N en las distintas partes de la planta y/o en el total de la misma. A continuación, se describen los resultados correspondientes al porcentaje de N en materia seca, el contenido de N por órgano, la distribución porcentual de N entre órganos sobre el total de la planta, y el contenido de N por superficie foliar, junto al contenido de NO₃⁻ en la hoja bandera y la raíz.

4.1.3.1. Porcentaje de nitrógeno en materia seca de las diferentes partes de la planta

En la antesis, el crecimiento de las plantas en CO₂ elevado condujo a un aumento del porcentaje de este nutriente en el resto del tallo, el total del tallo seleccionado y en el resto y el total de la parte aérea, y a un aumento próximo a la significación en la planta entera ($P=0,057$) cuando el aporte de N fue bajo (Tabla 4.1.3.1a). Al inicio del llenado del grano, el CO₂ elevado aumentó también el porcentaje de N de las diferentes partes de la planta con N bajo, exceptuando la hoja bandera, el resto de hojas y la raíz (Tabla 4.1.3.1a), mientras que no tuvo efecto en plantas con un aporte de N alto en ninguno de los estadios de desarrollo investigados. Además, la abundancia de N incrementó, en comparación con las plantas deficientes en dicho nutriente, el porcentaje de N de todas las partes de la planta analizadas en ambos estadios de desarrollo.

Tabla 4.1.3.1a. Porcentaje de N (% en materia seca) en las diferentes partes de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=4$).

		AL	EL	AH	EH	<i>P_N</i>	lsd _N	<i>P_{CO2L}</i>	lsd _{CO2L}	<i>P_{CO2H}</i>	lsd _{CO2H}
Espiga	Ant	1,69	1,77	2,05	1,99	0,033	0,26	0,660	0,43	0,735	0,40
	ILG	1,70	1,93	1,99	2,00	<0,001	0,08	0,007	0,14	0,876	0,12
Hoja bandera	Ant	3,18	3,47	4,75	4,42	<0,001	0,37	0,372	0,73	0,096	0,40
	ILG	3,31	3,40	4,09	4,34	<0,001	0,28	0,496	0,32	0,302	0,54
Últ. entren. tallo	Ant	1,36	1,55	2,31	2,20	<0,001	0,17	0,167	0,29	0,355	0,25
	ILG	1,11	2,29	1,90	1,90	0,045	0,19	<0,001	0,22	0,987	0,38
Resto hojas	Ant	1,45	1,52	2,78	2,91	<0,001	0,32	0,580	0,29	0,640	0,67
	ILG	1,99	2,15	3,23	3,09	<0,001	0,50	0,693	0,99	0,546	0,52
Resto tallo	Ant	0,52	0,68	1,56	1,89	<0,001	0,20	0,021	0,12	0,109	0,42
	ILG	0,50	0,75	1,51	1,71	<0,001	0,17	0,007	0,15	0,211	0,35
Total selecc.	Ant	1,12	1,32	2,19	2,28	<0,001	0,18	0,035	0,19	0,532	0,36
	ILG	1,20	1,62	2,09	2,19	<0,001	0,11	<0,001	0,15	0,250	0,19
Resto parte aérea	Ant	1,33	1,62	2,65	2,49	<0,001	0,14	0,019	0,22	0,123	0,23
	ILG	1,29	1,55	2,31	2,52	<0,001	0,15	0,010	0,17	0,139	0,30
Parte aérea	Ant	1,25	1,50	2,59	2,45	<0,001	0,13	0,015	0,18	0,194	0,23
	ILG	1,26	1,58	2,28	2,48	<0,001	0,13	0,001	0,13	0,128	0,27
Raíz	Ant	0,78	0,69	2,52	2,42	<0,001	0,13	0,304	0,19	0,309	0,22
	ILG	0,74	0,78	2,25	1,99	<0,001	0,17	0,338	0,09	0,150	0,38
Planta	Ant	1,14	1,30	2,59	2,45	<0,001	0,12	0,057	0,17	0,190	0,22
	ILG	1,14	1,40	2,28	2,43	<0,001	0,12	<0,001	0,10	0,209	0,26

4.1.3.2. Contenido de nitrógeno por órgano

En la antesis, el crecimiento a concentraciones elevadas de CO₂ disminuyó el contenido de N del resto y el total de la parte aérea, y de la planta entera cuando el suministro de N fue alto, y no tuvo efecto cuando el N fue bajo (Tabla 4.1.3.2a). Al inicio del llenado del grano, el CO₂ elevado aumentó el contenido de N del último entrenudo del tallo en plantas crecidas con un aporte de N bajo y, a diferencia del anterior estadio de desarrollo, no tuvo efecto en aquellas crecidas con un aporte de N alto (Fig. 4.1.3.2a). La abundancia de N, como era previsible, condujo a un aumento del contenido de N en cada una de las partes y en el total de la planta en ambos estadios de desarrollo, a excepción de la espiga al inicio del llenado del grano (Tabla 4.1.3.2a).

Tabla 4.1.3.2a. Contenido de N por órgano (N_i, mg N·órgano⁻¹) de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, P<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Espiga	Ant	28,49	26,33	37,75	40,44	0,001	6,06	0,556	8,47	0,559	10,65
	ILG	57,43	55,48	65,07	70,86	0,135	15,63	0,681	11,05	0,685	33,32
Hoja bandera	Ant	9,61	12,12	23,09	22,28	<0,001	2,46	0,109	3,27	0,673	4,45
	ILG	11,14	10,84	21,77	23,42	<0,001	3,67	0,765	2,35	0,629	7,91
Últ. entren. tallo	Ant	15,36	16,61	29,71	28,15	<0,001	3,84	0,507	4,33	0,629	7,45
	ILG	17,52	28,43	28,76	28,28	0,008	3,81	<0,001	3,04	0,889	8,01
Resto hojas	Ant	20,34	18,39	69,93	55,12	<0,001	9,67	0,210	3,40	0,142	21,44
	ILG	31,06	31,01	64,38	65,83	<0,001	10,25	0,988	6,31	0,878	22,15
Resto tallo	Ant	20,90	20,21	67,83	72,90	<0,001	5,99	0,784	5,84	0,346	12,13
	ILG	24,37	25,59	72,16	72,25	<0,001	7,27	0,648	6,20	0,988	15,11
Total selecc.	Ant	94,70	93,66	228,30	218,90	<0,001	12,81	0,888	17,22	0,357	23,06
	ILG	141,51	151,35	252,13	260,64	<0,001	14,09	0,172	15,52	0,479	27,57
Resto parte aérea	Ant	207,5	185,0	1931,4	1479,7	<0,001	129,9	0,531	82,6	0,008	279,7
	ILG	262,7	281,7	1933,1	2160,4	<0,001	492,3	0,650	97,6	0,632	1101,4
Parte aérea	Ant	302,2	278,7	2159,7	1698,6	<0,001	133,9	0,554	91,7	0,008	286,4
	ILG	404,2	433,1	2185,2	2421,0	<0,001	502,6	0,495	97,4	0,626	1124,7
Raíz	Ant	58,41	41,56	278,27	251,04	<0,001	19,64	0,064	18,21	0,148	40,17
	ILG	64,45	63,09	239,85	221,24	<0,001	38,50	0,871	19,69	0,608	84,20
Planta	Ant	360,6	320,3	2437,9	1949,6	<0,001	142,5	0,385	105,2	0,008	302,3
	ILG	468,6	496,2	2425,1	2642,3	<0,001	529,8	0,579	114,9	0,669	1184,4

4.1.3.3. Distribución porcentual del nitrógeno entre órganos sobre el total de la planta

En este apartado se describe la distribución porcentual de N expresada como el porcentaje de N de las diferentes partes sobre el total de la planta. En la antesis, el enriquecimiento en CO₂ aumentó la adscripción de N a la espiga, la hoja bandera (incremento del 0,19% sobre el total), el último entrenudo y el resto del tallo y el total de los tallos seleccionados en plantas con N abundante, y a la parte aérea, en especial a la hoja bandera (1,45%), en aquellas con deficiencia de N. Si bien, redujo la adscripción de N al resto de la parte aérea con N alto y a la raíz con bajo (Tabla 4.1.3.3a, Fig. 4.1.3.3a).

Al inicio del llenado del grano, el CO₂ elevado únicamente aumentó la adscripción de N al último entrenudo de los tallos seleccionados en plantas con un aporte de N bajo. Por otro lado, la abundancia

de N redujo, en comparación con las plantas deficientes en N, la adscripción de N a la raíz, a cada una de las partes separadas y al total de los tallos seleccionados, y aumentó la adscripción de N al resto y al total de la parte aérea de la planta en ambos estadios de desarrollo (Tabla 4.1.3.3a).

Tabla 4.1.3.3a. Distribución porcentual de N entre órganos sobre el total de la planta (N_d , %) en trigo cultivado en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	P_{CO_2L}	lsd _{CO2L}	P_{CO_2H}	lsd _{CO2H}
Espiga	Ant	8,06	8,28	1,54	2,07	<0,001	1,23	0,853	2,75	0,006	0,32
	ILG	12,32	11,34	2,85	2,65	<0,001	1,40	0,431	2,84	0,732	1,33
Hoja bandera	Ant	2,40	3,85	0,95	1,14	<0,001	0,53	0,032	1,27	0,046	0,19
	ILG	2,38	2,22	0,94	0,90	<0,001	0,33	0,558	0,63	0,820	0,38
Últ. entren. tallo	Ant	4,32	5,27	1,21	1,44	<0,001	0,72	0,195	1,61	0,048	0,23
	ILG	3,74	5,81	1,28	1,09	<0,001	0,44	<0,001	0,81	0,474	0,58
Resto hojas	Ant	5,79	5,81	2,89	2,85	<0,001	0,91	0,972	1,75	0,934	1,07
	ILG	6,66	6,50	2,81	2,58	<0,001	1,33	0,888	2,65	0,681	1,36
Resto tallo	Ant	5,87	6,35	2,80	3,77	<0,001	0,75	0,450	1,45	0,034	0,87
	ILG	5,21	5,31	3,15	2,85	<0,001	1,01	0,899	1,85	0,599	1,33
Total selec.	Ant	26,76	29,57	9,39	11,27	<0,001	3,17	0,363	6,97	0,021	1,49
	ILG	30,32	31,19	11,03	10,07	<0,001	3,78	0,792	7,71	0,535	3,54
Resto parte aérea	Ant	56,94	57,54	79,15	75,84	<0,001	3,60	0,854	7,62	0,025	2,73
	ILG	55,95	56,17	78,84	81,42	<0,001	4,01	0,941	6,91	0,314	5,76
Parte aérea	Ant	83,70	87,10	88,54	87,12	0,009	1,71	0,048	3,35	0,109	1,86
	ILG	86,27	87,35	89,86	91,49	<0,001	1,55	0,198	1,84	0,226	2,96
Raíz	Ant	16,30	12,90	11,46	12,88	0,009	1,71	0,048	3,35	0,109	1,86
	ILG	13,73	12,65	10,14	8,51	<0,001	1,55	0,198	1,84	0,226	2,96

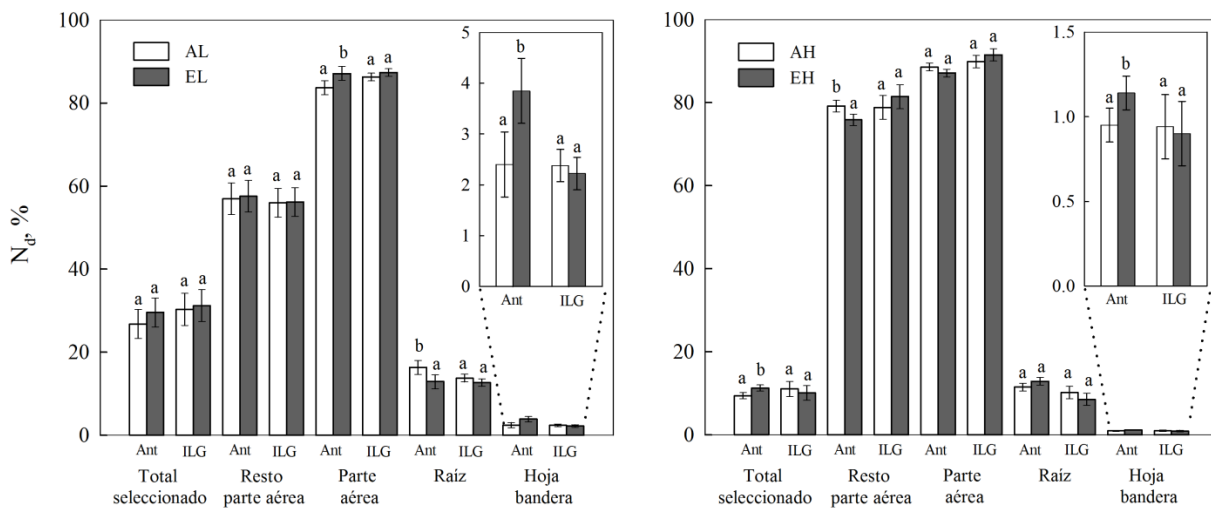


Fig. 4.1.3.3a. Distribución porcentual de N entre órganos sobre el total de la planta (N_d) en las diferentes partes de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). Se representan las partes de la planta de mayor interés analizadas. Las líneas verticales representan la l.s.d. del efecto del CO_2 (n=4) para cada muestreo, parte analizada y nivel de N. Las barras con distinta letra muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.1.3.4. Contenido de nitrógeno por superficie foliar

El CO₂ alto incrementó el contenido de N por superficie foliar en plantas con un aporte de N bajo en la antesis, y no tuvo efecto en aquellas con N abundante en ninguno de los estadios de desarrollo investigados. Una mayor disponibilidad de N condujo a un aumento del contenido de N por superficie foliar tanto en la antesis como al inicio del llenado del grano (Tabla 4.1.3.4a).

Tabla 4.1.3.4a. Contenido de N por superficie foliar (N_A, g·m⁻²) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, P<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
N por superficie foliar	Ant	1,90	2,50	3,59	3,20	<0,001	0,31	0,014	0,41	0,129	0,55
	ILG	2,60	2,39	3,12	3,51	<0,001	0,38	0,423	0,62	0,154	0,58

4.1.3.5. Contenido de nitrato en la hoja bandera y la raíz

En la antesis, el crecimiento en CO₂ elevado aumentó el contenido foliar de NO₃⁻ en plantas deficientes en N y lo redujo en aquellas con N alto, y no tuvo efecto significativo en el contenido de la raíz (Tabla 4.1.3.5a). Al inicio del llenado del grano, el CO₂ alto tendió a aumentar el contenido de NO₃⁻ en la hoja bandera y la raíz de las plantas con un menor aporte de N sin llegar a alcanzar significación estadística (P=0,067). El mayor aporte de N en la solución nutritiva aumentó el contenido de NO₃⁻ tanto en la hoja bandera como en la raíz en las fases del desarrollo investigadas.

Tabla 4.1.3.5a. Contenido de nitrato (μmol·g PS⁻¹) en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, P<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Hoja bandera	Ant	88,8	143,2	272,2	214,7	<0,001	20,2	0,006	31,50	0,011	35,41
	ILG	149,1	122,9	182,5	199,4	0,001	27,0	0,067	28,78	0,468	55,20
Raíz	Ant	43,5	54,3	483,2	495,9	<0,001	135,6	0,286	22,70	0,922	303,6
	ILG	32,7	55,6	371,1	529,3	<0,001	112,0	0,067	25,08	0,173	250,2

4.1.4. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el intercambio gaseoso

Como se ha mencionado en el capítulo de Materiales y Métodos, en las fases de desarrollo correspondientes a la antesis y el inicio del llenado del grano, se realizaron medidas de intercambio gaseoso a 390 y 700 μmol·mol⁻¹ de CO₂ con una intensidad luminosa saturante de 1.500 μmol·m⁻²·s⁻¹ en la hoja bandera. Las medidas de A_n a las respectivas concentraciones de CO₂ de crecimiento, pusieron de manifiesto que la fotosíntesis aumentó en plantas crecidas con CO₂ alto independientemente de la disponibilidad nutricional (Tabla 4.1.4a). En la antesis, cuando las medidas de intercambio gaseoso se realizaron a una concentración común de CO₂ en la medida, la fotosíntesis no disminuyó en las plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂ comparadas con aquellas mantenidas a concentraciones ambientales con independencia de la disponibilidad de N (Tabla 4.1.4a). El CO₂ elevado condujo a un aumento de g_s y C_i en plantas con un mayor aporte de N con 700 μmol·mol⁻¹ de CO₂ en la medida, y a un descenso de C_i en plantas deficientes en N cuando la medida

se realizó con $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 . Asimismo, la abundancia de N aumentó, en comparación con las plantas deficientes en N, la fotosíntesis con $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y g_s con ambos niveles de CO_2 en la medida, y no tuvo efecto en E y C_i (Tabla 4.1.4a).

Al inicio del llenado del grano, el crecimiento en CO_2 elevado disminuyó A_n en plantas con N abundante cuando la medida se realizó con $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 . El descenso de A_n no se acompañó de una disminución de C_i sino de un aumento, indicativo de una limitación no estomática de la fotosíntesis en dichas condiciones (Tabla 4.1.4a). Con $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida, el CO_2 elevado únicamente redujo E en plantas crecidas con N abundante. La abundancia de N no tuvo efecto en ninguno de los parámetros de intercambio gaseoso cualquiera que fuese el CO_2 de medida.

Tabla 4.1.4a. Parámetros de intercambio gaseoso medidos a 390 y $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1.500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390 ; E, $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, $0,5$; H, 5 mM NO_3^-). A_n , asimilación fotosintética del carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); g_s , conductancia estomática ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); E, transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); C_i , concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Los parámetros se midieron a 20°C y $1,01 \pm 0,13 \text{ kPa}$ de déficit de presión de vapor. P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ ($n=5$).

		[CO ₂]	AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
A _n	Ant	390	21,55	23,32	24,55	25,44	0,102	3,13	0,471	5,39	0,633	4,15
		700	32,10	32,38	39,09	35,81	0,022	4,34	0,937	7,85	0,187	5,25
	ILG	390	21,48	19,88	22,92	20,14	0,498	2,60	0,191	2,57	0,240	5,04
		700	32,02	28,80	35,76	27,66	0,390	3,13	0,062	3,43	0,013	5,87
g _s	Ant	390	576,2	503,3	672,4	647,8	0,026	104,0	0,324	159,7	0,733	160,2
		700	475,6	549,5	526,0	757,8	0,025	110,7	0,352	172,7	0,013	167,8
	ILG	390	645,3	515,3	652,6	637,2	0,403	159,4	0,325	286,1	0,861	196,0
		700	576,0	551,0	582,6	696,5	0,280	144,3	0,810	232,1	0,249	211,4
E	Ant	390	4,63	4,31	4,79	4,76	0,252	0,54	0,474	0,96	0,937	0,70
		700	4,11	4,70	4,26	4,81	0,677	0,64	0,270	1,16	0,142	0,79
	ILG	390	4,59	4,53	5,11	3,96	0,936	0,54	0,847	0,73	0,022	0,93
		700	4,26	4,96	4,76	4,30	0,764	0,56	0,094	0,86	0,255	0,87
C _i	Ant	390	298,4	281,0	293,0	289,0	0,834	13,2	0,022	14,2	0,721	24,9
		700	532,0	549,6	514,1	560,5	0,772	35,4	0,337	39,7	0,023	38,3
	ILG	390	295,7	283,9	295,5	301,2	0,297	16,8	0,450	34,2	0,331	12,7
		700	548,9	548,2	536,2	576,8	0,525	26,0	0,975	48,4	0,012	29,1

Con las curvas de respuesta de la fotosíntesis al CO_2 (datos no mostrados), se obtuvieron varios parámetros fotosintéticos según el modelo propuesto por Sharkey *et al.* (2007). En la antesis, el crecimiento de las plantas en CO_2 elevado disminuyó g_m en plantas con un mayor aporte de N, al igual que g_s , y no tuvo efecto en $V_{c,\text{max}}$, J y R_d (Tabla 4.1.4b). La abundancia de N aumentó J y no modificó significativamente $V_{c,\text{max}}$, R_d y g_m (Tabla 4.1.4b). Al inicio del llenado del grano, el crecimiento a concentraciones elevadas de CO_2 disminuyó J en plantas con N abundante (Tabla 4.1.4b), a la vez que disminuyó A_n .

Tabla 4.1.4b. Parámetros fotosintéticos $V_{c,max}$, velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); J , velocidad de transporte electrónico ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); R_d , velocidad de respiración mitocondrial en la luz ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); y g_m , conductancia del mesófilo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). Los parámetros fueron medidos a 1.500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, 20 °C y 1,01 \pm 0,13 kPa de déficit de presión de vapor. P , probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ ($n=5$).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
$V_{c,max}$	Ant	102,1	122,2	129,5	146,8	0,069	28,3	0,163	30,3	0,478	53,7
	ILG	87,0	119,6	103,9	93,7	0,657	21,3	0,114	42,4	0,244	18,6
J	Ant	176,9	184,2	219,7	214,0	0,004	22,9	0,651	35,9	0,711	34,5
	ILG	169,4	169,0	191,5	160,3	0,415	17,0	0,968	23,9	0,035	28,3
R_d	Ant	3,15	2,60	3,22	3,73	0,338	1,29	0,482	1,72	0,611	2,22
	ILG	2,16	2,89	2,38	3,31	0,412	0,80	0,241	1,33	0,091	1,12
g_m	Ant	3,08	2,62	3,53	2,33	0,822	0,72	0,450	1,35	0,007	0,74
	ILG	6,46	2,51	3,68	3,19	0,441	2,82	0,148	5,68	0,641	2,31

En la antesis, la respuesta de aclimatación de la fotosíntesis al CO_2 elevado fue menor con N alto que con N bajo, en las que fue incluso positiva (Tabla 4.1.4c). Dicha respuesta disminuyó en etapas más avanzadas del desarrollo con independencia del suministro de N, en mayor medida en plantas con N abundante, en las que A_n disminuyó significativamente (Tabla 4.1.4a). La respuesta directa al aumentar el CO_2 de medida de 390 a 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ mostró una estimulación de la fotosíntesis a corto plazo con ambos niveles de N en los dos estadios de desarrollo investigados. La respuesta neta de A_n al CO_2 elevado tuvo una pauta de cambio similar a la respuesta de aclimatación tanto en la antesis como en el inicio del llenado del grano. Así, la respuesta neta fue mayor en plantas con un aporte de N bajo que en las de alto, y se observa una ligera atenuación del efecto con la progresión del desarrollo de las plantas (Tabla 4.1.4c).

Tabla 4.1.4c. Respuestas de aclimatación, directa y neta de la velocidad de asimilación fotosintética del carbono al CO_2 elevado en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía con suministro bajo o alto de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). Se indica el valor medio \pm la desviación estándar ($n=5$).

		Ant	ILG
Respuesta aclimatación [A(e,E)/A(a,E)]	L	1,12 \pm 0,18	0,90 \pm 0,12
	H	0,94 \pm 0,16	0,80 \pm 0,19
Respuesta directa [A(a,E)/A(a,A)]	L	1,50 \pm 0,08	1,49 \pm 0,07
	H	1,60 \pm 0,09	1,45 \pm 0,07
Respuesta neta [A(e,E)/A(a,A)]	L	1,68 \pm 0,32	1,34 \pm 0,14
	H	1,52 \pm 0,34	1,16 \pm 0,29

En la antesis, el CO_2 elevado incrementó significativamente la eficiencia en el uso del agua y del N en la fotosíntesis con ambos niveles de N (Tabla 4.1.4d). Al inicio del llenado del grano, el enriquecimiento en CO_2 aumentó la eficiencia en el uso del agua con ambos aportes de N, y la eficiencia en el uso del N únicamente en plantas con un aporte bajo de este nutriente. La abundancia de N disminuyó ambos parámetros en los dos estadios de desarrollo.

Tabla 4.1.4d. Eficiencia en el uso del agua (WUE, $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$) y del nitrógeno en la fotosíntesis (PNUE, $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g N}^{-1}$) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=4 para PNUE, n=5 para WUE).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
WUE	Ant	4,68	7,10	5,17	7,54	0,250	0,83	<0,001	0,76	0,010	1,64
	ILG	4,71	5,86	4,50	6,41	0,427	0,44	0,007	0,73	<0,001	0,63
PNUE	Ant	10,20	14,18	6,97	11,42	0,004	1,81	0,013	2,78	0,003	2,33
	ILG	8,45	11,99	7,56	8,69	0,014	1,59	0,016	2,60	0,183	1,85

4.1.5. Efecto del CO_2 de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de compuestos del metabolismo del carbono y nitrógeno

4.1.5.1. Contenido de carbohidratos en la hoja bandera y la raíz

En la antesis, el enriquecimiento en CO_2 condujo a un descenso del contenido foliar de carbohidratos solubles totales, como resultado de la disminución del contenido de sacarosa y fructanos, y de los niveles de fructosa y almidón en la raíz de plantas con un aporte de N bajo (Tablas 4.1.5a-4.1.5c). Además, en plantas con un aporte de N alto produjo un aumento del contenido de fructosa en la hoja bandera, e indujo una mayor acumulación de fructanos, próxima a la significación estadística, en la raíz ($P=0,054$). Un aumento del suministro de N disminuyó el contenido foliar de carbohidratos solubles totales, particularmente sacarosa y fructanos, y almidón (Tabla 4.1.5a). En la raíz, la pauta de cambio en el contenido de carbohidratos inducida por la abundancia de N fue similar a la descrita en la hoja bandera, a excepción del aumento del contenido de almidón, junto a un descenso de fructosa (Tabla 4.1.5b).

Con la progresión del desarrollo de las plantas, el CO_2 elevado disminuyó, al igual que en la antesis, el contenido de sacarosa, fructanos y carbohidratos solubles totales en la hoja bandera de plantas deficientes en N (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Asimismo, indujo un descenso significativo de fructanos y carbohidratos solubles totales, y de fructosa, próximo a la significación, $P=0,059$, en la raíz (Tablas 4.1.5b y 4.1.5c). En plantas con un mayor aporte de N, el CO_2 elevado aumentó el contenido foliar de glucosa, y el contenido de fructosa tanto en la hoja bandera como en la raíz (Tablas 4.1.5a y 4.1.5b). Una mayor disponibilidad de N disminuyó el contenido de todos los carbohidratos foliares, a excepción de la glucosa (Tabla 4.1.5a), y los niveles de fructosa, sacarosa y carbohidratos solubles totales en la raíz (Tabla 4.1.5b). Sin embargo, aumentó el contenido de almidón, al igual que en la antesis, y el de glucosa en la raíz.

4.1.5.2. Contenido foliar de clorofilas

En la antesis, el crecimiento a concentraciones elevadas de CO_2 indujo un aumento del contenido de chl a, chl b y chl total en plantas deficientes en N, y redujo el contenido de chl a en plantas con N abundante (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Con la progresión de la senescencia foliar, el efecto del CO_2 en el contenido de clorofilas en función de la disponibilidad de N en las plantas desapareció. El mayor aporte de N aumentó el contenido de chl a y chl total de la hoja bandera en los dos estadios de desarrollo investigados, y el de chl b al inicio del llenado del grano (Tabla 4.1.5a).

4.1.5.3. Contenido de hexosas fosfato en la hoja bandera y la raíz

En la antesis, la elevación de la concentración atmosférica de CO₂ condujo a un aumento del contenido foliar de G1P en plantas con un aporte de N bajo, y de G6P en plantas con un mayor aporte de N (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). En la raíz no tuvo efecto en los niveles de HPs con deficiencia de N y redujo los de la G1P con abundancia de dicho nutriente (Tablas 4.1.5b y 4.1.5c). Un aumento del aporte de N redujo significativamente el contenido de F6P, G1P y HPs totales en la hoja bandera (Tabla 4.1.5a). Sin embargo, en la raíz incrementó el contenido de G1P y HPs significativamente, y de F6P y G6P próximo a la significación, $P=0,087$ y $0,072$, respectivamente (Tabla 4.1.5b).

Al inicio del llenado del grano, el CO₂ elevado redujo el contenido foliar de G1P y tendió a disminuir, sin llegar a alcanzar significación estadística, el contenido de G6P y el total de HPs, $P=0,079$ y $0,073$, respectivamente, en plantas con un aporte de N bajo (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Mientras, no tuvo efecto en el contenido de HPs en las hojas de plantas con N abundante, ni tampoco en el de la raíz con independencia de la disponibilidad nutricional (Tablas 4.1.5a-4.1.5c). La abundancia de N condujo a un descenso próximo a la significación del contenido foliar de F6P, $P=0,055$, e incrementó el de G1P, G6P y el total de HPs en la raíz (Tablas 4.1.5a y 4.1.5b).

4.1.5.4. Contenido de 2-oxoglutarato en la hoja bandera y la raíz

El crecimiento a concentraciones elevadas de CO₂ produjo un incremento del contenido de 2-oxoglutarato en la hoja bandera de plantas con un aporte de N bajo en la antesis, y con un aporte alto en el inicio del llenado del grano (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c), pero no modificó el contenido de dicho metabolito en la raíz en ninguno de los estadios de desarrollo investigados (Tablas 4.1.5b y 4.1.5c). Por otro lado, la abundancia de N no tuvo efecto en los niveles de 2-oxoglutarato en la hoja bandera ni en la antesis ni en el inicio del llenado del grano, mientras que en la raíz aumentó su contenido en la fase más temprana del desarrollo del trigo (Tablas 4.1.5a y 4.1.5b).

4.1.5.5. Contenido de aminoácidos en la hoja bandera y la raíz

El CO₂ elevado aumentó el contenido de aminoácidos en la hoja bandera de plantas crecidas con un aporte de N bajo en la antesis y lo disminuyó en plantas crecidas con un aporte alto de dicho nutriente en ambos estadios de desarrollo (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Sin embargo, el aumento de CO₂ no produjo ningún efecto en la raíz a lo largo del desarrollo de las plantas (Tabla 4.1.5b y 4.1.5c). Además, un mayor aporte de N aumentó el contenido de aminoácidos en la hoja bandera y la raíz tanto en la antesis como en el inicio del llenado del grano (Tablas 4.1.5a y 4.1.5b).

Tabla 4.1.5a. Contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Glucosa (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	2,46	1,95	1,52	2,53	0,604	0,75	0,317	1,13	0,106	1,31
	ILG	4,91	5,06	1,94	5,19	0,072	1,57	0,895	2,59	0,019	2,44
Fructosa (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	1,33	1,53	0,81	1,69	0,309	0,38	0,197	0,35	0,037	0,80
	ILG	4,49	3,79	1,25	3,38	0,008	1,25	0,439	2,08	0,036	1,92
Sacarosa (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	60,78	47,51	31,52	36,32	< 0,001	5,98	0,009	8,56	0,307	10,85
	ILG	64,57	55,28	36,65	40,96	< 0,001	4,13	0,019	7,16	0,123	5,88
Fructanos (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	41,78	14,46	7,26	7,58	< 0,001	6,23	0,004	13,70	0,856	4,35
	ILG	42,69	21,69	14,32	11,22	< 0,001	6,38	0,003	10,92	0,429	9,28
CST (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	167,12	112,97	72,62	84,43	< 0,001	14,79	0,001	23,39	0,267	23,60
	ILG	181,24	141,10	90,82	101,70	< 0,001	13,80	0,009	26,06	0,164	16,79
Almidón (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	13,32	8,58	3,83	3,42	0,003	4,38	0,276	9,68	0,593	1,78
	ILG	7,20	6,67	2,54	2,62	< 0,001	1,62	0,711	3,38	0,890	1,36
Chl a (g·m ⁻²)	Ant	0,42	0,56	0,73	0,56	< 0,001	0,07	< 0,001	0,04	0,031	0,15
	ILG	0,50	0,56	0,68	0,69	0,007	0,11	0,385	0,13	0,949	0,20
Chl b (g·m ⁻²)	Ant	0,13	0,22	0,24	0,20	0,131	0,06	0,045	0,09	0,474	0,11
	ILG	0,19	0,24	0,26	0,26	0,047	0,05	0,166	0,08	0,844	0,06
Chl total (g·m ⁻²)	Ant	0,55	0,78	0,97	0,76	0,004	0,12	0,004	0,13	0,086	0,25
	ILG	0,69	0,80	0,94	0,95	0,009	0,14	0,270	0,21	0,920	0,25
Chl a:b	Ant	3,43	2,66	3,18	2,83	0,880	0,63	0,147	1,13	0,358	0,86
	ILG	2,75	2,31	2,65	2,62	0,525	0,35	0,117	0,58	0,871	0,52
F6P (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	230,41	207,13	181,05	169,65	0,003	25,23	0,204	39,94	0,514	40,21
	ILG	215,54	193,17	195,85	177,89	0,055	17,96	0,076	25,56	0,217	32,71
G6P (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	223,88	229,64	196,19	244,74	0,628	27,77	0,759	43,88	0,041	45,59
	ILG	254,78	218,69	231,46	212,31	0,182	22,82	0,079	41,73	0,166	29,75
G1P (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	91,45	114,58	75,42	84,10	0,004	13,41	0,017	16,19	0,424	25,62
	ILG	105,30	88,31	97,71	104,03	0,444	11,65	0,004	7,93	0,550	26,90
HPs (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	567,05	562,99	475,26	502,42	0,017	58,50	0,904	87,60	0,532	110,3
	ILG	568,98	505,55	515,07	496,56	0,122	41,16	0,073	71,60	0,468	58,4
2-oxoglutarato (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	72,59	87,73	77,18	80,15	0,794	12,41	0,042	14,30	0,770	9,65
	ILG	88,03	96,54	70,36	93,77	0,115	13,19	0,328	20,18	0,046	22,79
Aminoácidos (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	36,40	39,84	56,01	38,55	< 0,001	2,18	0,040	3,20	< 0,001	3,73
	ILG	30,81	32,11	64,63	52,94	< 0,001	2,79	0,417	3,66	0,005	5,88

Tabla 4.1.5b. Contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, P<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Glucosa libre (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	1,57	0,66	1,09	1,34	0,653	0,47	0,061	0,96	0,332	0,56
	ILG	1,21	0,76	2,48	1,46	0,013	0,74	0,196	0,75	0,160	1,59
Fructosa libre (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	2,38	1,22	0,99	1,20	0,002	0,37	0,012	0,74	0,349	0,51
	ILG	1,99	1,38	3,62	1,68	0,002	0,53	0,059	0,65	0,005	1,05
Sacarosa (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	12,66	15,42	8,70	9,56	0,003	2,87	0,271	5,75	0,573	3,54
	ILG	23,55	19,46	16,12	14,84	0,002	3,29	0,102	5,18	0,570	5,44
Fructanos (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	19,73	8,37	0,33	1,91	0,004	7,69	0,121	15,38	0,054	1,63
	ILG	39,92	12,21	12,23	7,99	0,002	8,32	0,010	17,60	0,213	7,64
CST (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	48,99	41,08	19,80	23,56	<0,001	11,69	0,464	24,77	0,329	8,67
	ILG	90,21	53,28	50,58	40,80	<0,001	11,88	0,010	24,58	0,061	10,38
Almidón (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	0,40	0,24	0,42	0,43	0,031	0,10	0,034	0,15	0,917	0,16
	ILG	0,59	0,43	0,54	0,50	0,860	0,18	0,276	0,33	0,690	0,23
F6P (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	11,67	11,51	13,76	13,49	0,087	2,40	0,935	4,68	0,804	2,58
	ILG	13,34	11,35	14,62	14,77	0,104	2,91	0,308	4,37	0,945	4,85
G6P (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	26,64	23,92	30,14	30,05	0,072	5,35	0,352	6,84	0,984	11,21
	ILG	37,02	31,68	47,16	39,56	0,008	6,19	0,195	8,95	0,131	10,63
G1P (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	5,75	6,23	10,38	7,78	<0,001	1,28	0,596	2,20	0,022	1,99
	ILG	6,28	7,21	10,61	11,01	0,006	2,55	0,500	3,49	0,836	4,67
HPs (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	47,35	41,00	56,54	54,43	0,022	9,35	0,279	13,03	0,764	16,47
	ILG	58,58	49,25	71,19	65,33	0,013	10,65	0,212	16,33	0,444	17,49
2-oxoglutarato (nmol·g PF ⁻¹)	Ant	8,69	5,83	9,83	9,53	0,044	2,34	0,119	3,86	0,841	3,61
	ILG	10,69	13,19	14,82	13,08	0,456	5,73	0,402	6,78	0,717	11,67
Aminoácidos (μmol·g PF ⁻¹)	Ant	3,63	3,59	4,97	4,10	0,013	0,69	0,901	0,79	0,163	1,34
	ILG	3,63	4,72	7,13	7,19	<0,001	1,35	0,166	1,70	0,955	2,50

Tabla 4.1.5c. Heat map del efecto del CO₂ en el contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía con diferente aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). Los datos se expresaron como log₂ del cociente del valor de cada metabolito a CO₂ elevado frente a CO₂ ambiente para cada aporte de N de forma independiente. Según el ANOVA, se designa a cada valor el símbolo * como significativo (0,05>P≥0,001) o ** como muy significativo (P<0,001).

	Heat map del efecto del CO ₂ en el contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía con diferente aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO ₃ ⁻). Los datos se expresaron como log ₂ del cociente del valor de cada metabolito a CO ₂ elevado frente a CO ₂ ambiente para cada aporte de N de forma independiente. Según el ANOVA, se designa a cada valor el símbolo * como significativo (0,05>P≥0,001) o ** como muy significativo (P<0,001).			
	Hoja bandera		Raíz	
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH
Antesis				
Glucosa libre	-0,34	0,74	-1,25	0,30
Fructosa libre	0,20	1,06*	-0,96*	0,28
Sacarosa	-0,36*	0,20	0,28	0,14
Fructanos	-1,53*	0,06	-1,24	2,53
Carbohidratos solubles totales	-0,56*		-0,25	0,25
Almidón	-0,63	-0,16	-0,74*	0,03
Clorofila a	0,42**	-0,38*		
Clorofila b	0,76*	-0,26		
Clorofila total	0,50*	-0,35		
Fructosa-6-fosfato	-0,15	-0,09	-0,02	-0,03
Glucosa-6-fosfato	0,04	0,32*	-0,16	0,00
Glucosa-1-fosfato	0,33*	0,16	0,12	-0,42*
Hexosas fosfato	-0,01	0,08	-0,21	-0,05
2-oxoglutarato	0,27*	0,05	-0,58	-0,04
Aminoácidos totales	0,13*	-0,54**	-0,02	-0,28
Inicio del llenado del grano				
Glucosa libre	0,04	1,42*	-0,67	-0,76
Fructosa libre	-0,24	1,44*	-0,53	-1,11*
Sacarosa	-0,22*	0,16	-0,28	-0,12
Fructanos	-0,98*	-0,35	-1,71*	-0,61
Carbohidratos solubles totales	-0,36*	0,16	-0,76*	-0,31
Almidón	-0,11	0,04	-0,46	-0,11
Clorofila a	0,16	0,02		
Clorofila b	0,34	0,00		
Clorofila total	0,21	0,02		
Fructosa-6-fosfato	-0,16	-0,14	-0,23	0,01
Glucosa-6-fosfato	-0,22	-0,12	-0,22	-0,25
Glucosa-1-fosfato	-0,25*	0,09	0,20	0,05
Hexosas fosfato	-0,17	-0,05	-0,25	-0,12
2-oxoglutarato	0,13	0,41*	0,30	-0,18
Aminoácidos totales	0,06	-0,29*	0,38	0,01

4.1.5.6. Contenido de proteínas totales, solubles y de membrana en la hoja bandera y la raíz

En la antesis, el crecimiento a concentraciones elevadas de CO₂ condujo a un aumento del contenido foliar de proteínas solubles y totales con respecto a las plantas crecidas a concentraciones ambientales cuando el suministro de N fue bajo (Tabla 4.1.5.6a). Sin embargo, el CO₂ elevado no tuvo efecto en las proteínas foliares de membrana y en el contenido de proteínas en la raíz cualquiera que fuera su naturaleza, al igual que en plantas con un suministro abundante en N.

En etapas más avanzadas del desarrollo, el efecto del CO₂ elevado en el contenido de proteínas foliares en plantas con N bajo desapareció, aun cuando se mantuvo una tendencia similar a la observada en la antesis pero lejos de lograr significación estadística, y tampoco tuvo efecto en el contenido de proteínas en la raíz (Tabla 4.1.5.6a). No obstante, el CO₂ elevado condujo a un descenso del contenido de proteínas totales y de membrana en la raíz y no modificó los niveles foliares de proteínas en plantas con N alto. En ambos estadios de desarrollo, la abundancia de N incrementó el contenido de proteínas solubles y de membrana, y el total de las mismas, tanto en las hojas como en la raíz con respecto a las plantas deficientes en dicho nutriente.

Tabla 4.1.5.6a. Contenido de proteínas totales, solubles y de membrana (mg·g PF⁻¹) en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Proteína total											
Hoja bandera	Ant	34,45	42,31	53,39	48,93	<0,001	4,32	0,011	5,34	0,226	8,09
	ILG	41,38	49,30	57,82	53,64	0,001	5,39	0,087	9,50	0,221	7,49
Raíz	Ant	0,99	0,93	1,75	1,45	<0,001	0,17	0,372	0,16	0,091	0,36
	ILG	1,07	1,17	2,42	1,96	<0,001	0,16	0,165	0,15	0,017	0,34
Proteína soluble											
Hoja bandera	Ant	17,92	25,10	32,30	28,02	<0,001	4,04	0,008	4,31	0,279	7,74
	ILG	22,85	27,65	34,39	31,27	<0,001	3,46	0,103	6,12	0,163	4,80
Raíz	Ant	0,45	0,44	0,76	0,62	<0,001	0,11	0,771	0,09	0,189	0,22
	ILG	0,47	0,55	1,12	0,89	<0,001	0,13	0,103	0,10	0,088	0,28
Proteína de membrana											
Hoja bandera	Ant	16,54	17,21	21,09	20,40	<0,001	1,89	0,594	2,94	0,598	3,06
	ILG	18,53	21,65	23,43	22,37	0,025	2,38	0,082	3,65	0,531	3,91
Raíz	Ant	0,54	0,49	0,99	0,83	<0,001	0,08	0,120	0,07	0,068	0,17
	ILG	0,60	0,62	1,29	1,07	<0,001	0,06	0,444	0,05	0,009	0,14

4.1.5.7. Contenido de proteína Rubisco

En la antesis, el CO₂ elevado aumentó la proteína Rubisco por superficie foliar, la fracción de Rubisco en el N foliar y la relación rbcL:rbcS en plantas con un aporte de N bajo (Tabla 4.1.5.7a). En plantas con un aporte de N alto, sólo el descenso de la relación rbcL:rbcS con el CO₂ elevado fue significativo, si bien la proteína Rubisco tendió a disminuir (*P*=0,096). El mayor suministro de N aumentó la proteína Rubisco, la fracción de Rubisco en la proteína soluble y la proporción de la subunidad grande con respecto a la subunidad pequeña de dicha proteína.

Al inicio del llenado del grano, el efecto inducido por el CO₂ elevado en plantas deficientes en N en la anterior fase del desarrollo desapareció, aunque disminuyó la fracción de Rubisco en la proteína soluble y en el N foliar en plantas con N abundante (Tabla 4.1.6.2a). El aporte de N alto aumentó de

nuevo el contenido de Rubisco por superficie foliar y la fracción de Rubisco en la proteína soluble, y también en el N foliar, mientras que no tuvo efecto en la relación de las subunidades de la proteína.

Tabla 4.1.5.7a. Contenido de proteína Rubisco por superficie foliar ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$), fracción de Rubisco en la proteína soluble (% en proteína), fracción de Rubisco en el N foliar (% en N) y relación rbcL:rbcS en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=4$).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
Rubisco	Ant	1,74	2,55	4,08	3,13	<0,001	0,60	0,023	0,66	0,096	1,17
	ILG	1,63	1,83	3,37	2,66	<0,001	0,51	0,515	0,73	0,101	0,89
% proteína soluble	Ant	44,05	47,51	50,47	48,80	0,009	2,68	0,164	5,34	0,187	2,76
	ILG	33,39	34,94	42,02	35,88	<0,001	2,40	0,221	2,78	0,017	4,61
% N foliar	Ant	27,20	34,47	34,38	30,83	0,384	4,26	0,021	5,71	0,301	7,68
	ILG	22,88	28,64	35,29	25,84	0,011	3,47	0,094	7,09	<0,001	3,25
rbcL:rbcS	Ant	0,77	0,85	1,00	0,92	<0,001	0,04	0,030	0,07	0,012	0,06
	ILG	0,81	0,89	0,89	0,93	0,154	0,08	0,149	0,12	0,552	0,15

4.1.6. Efecto del CO_2 de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la actividad de enzimas del metabolismo del carbono y nitrógeno

4.1.6.1. Actividad Rubisco en la hoja bandera

El incremento de la concentración atmosférica de CO_2 aumentó la actividad Rubisco inicial en plantas deficientes en N en la antesis y la redujo en el inicio del llenado del grano, y tendió a disminuir, sin llegar a alcanzar significación estadística, la actividad Rubisco total en plantas con N abundante sólo en la antesis ($P=0,066$; Tabla 4.1.6.1a). Un mayor aporte de N condujo, en comparación con plantas deficientes en N, a un aumento de la actividad Rubisco total y a un descenso del estado de activación del enzima en la antesis, cambios similares a los observados al inicio del llenado del grano, junto a un aumento de la actividad Rubisco inicial (Tabla 4.1.6.1a). En ambos estadios de desarrollo, ni el CO_2 de crecimiento ni la disponibilidad de N modificaron significativamente la eficiencia catalítica de la Rubisco (Tabla 4.1.6.1a).

Tabla 4.1.6.1a. Actividad Rubisco inicial (ARI) y total (ART) por unidad de superficie foliar ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), estado de activación (%) y eficiencia catalítica de la Rubisco (s^{-1}) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=4$).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
ARI	Ant	20,03	37,01	34,87	31,95	0,225	8,33	0,022	13,54	0,599	12,92
	ILG	31,92	27,38	37,03	32,77	0,033	4,73	0,029	3,90	0,380	12,02
ART	Ant	33,78	48,72	67,59	55,26	0,002	10,72	0,111	19,56	0,066	13,55
	ILG	41,37	39,89	52,76	55,79	0,009	9,43	0,780	12,44	0,693	19,77
% activación	Ant	62,11	76,27	51,86	51,57	0,014	13,25	0,194	23,72	0,969	17,98
	ILG	78,04	69,98	58,41	65,47	0,024	10,22	0,253	15,61	0,345	16,83
k_{cat}	Ant	1,49	1,40	1,17	1,51	0,607	0,43	0,791	0,72	0,233	0,64
	ILG	1,99	1,65	1,54	1,52	0,342	0,39	0,124	0,62	0,624	0,62

4.1.6.2. Actividad nitrato reductasa en la hoja bandera y la raíz

En la antesis, el CO₂ elevado tendió a aumentar, sin lograr alcanzar significación estadística, la actividad NR máxima y selectiva en la hoja bandera de las plantas con independencia de la disponibilidad de N (Tabla 4.1.6.2a). En etapas más avanzadas del desarrollo, el enriquecimiento en CO₂ condujo a un descenso muy próximo a la significación de la actividad NR máxima y selectiva en plantas con N abundante, $P=0,052$ y $0,071$, respectivamente. Una mayor disponibilidad de N en las plantas incrementó la actividad NR máxima y selectiva y redujo el estado de activación del enzima en ambos estadios de desarrollo (Tabla 4.1.6.2a).

En la raíz, el crecimiento en CO₂ elevado no tuvo efecto ni en la actividad NR máxima ni en la selectiva en la antesis (Tabla 4.1.6.2a). Mientras que al inicio del llenado del grano, el CO₂ alto condujo a un aumento próximo a la significación de la NR máxima ($P=0,057$) en plantas deficientes en N, aunque redujo el estado de activación del enzima, y disminuyó tanto la actividad máxima como la selectiva en aquellas con un mayor aporte de N. La abundancia de N aumentó la actividad NR máxima y selectiva en la raíz al inicio del llenado del grano y no tuvo efecto en la antesis, si bien disminuyó el estado de activación del enzima en ambas fases del desarrollo del trigo.

Tabla 4.1.6.2a. Actividad nitrato reductasa máxima (ANRm) y selectiva (ANRs) por unidad de peso fresco ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y estado de activación del enzima (%) en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ ($n=4$).

		AL	EL	AH	EH	<i>P_N</i>	lsd _N	<i>P_{CO2L}</i>	lsd _{CO2L}	<i>P_{CO2H}</i>	lsd _{CO2H}
Hoja bandera											
ANRm	Ant	14,37	17,22	26,23	28,78	<0,001	2,77	0,115	3,84	0,246	4,87
	ILG	7,50	9,28	20,37	17,50	<0,001	1,72	0,165	2,81	0,052	2,92
ANRs	Ant	9,67	11,15	11,89	14,72	0,015	2,22	0,183	2,47	0,151	4,22
	ILG	3,08	4,71	8,01	6,13	<0,001	1,27	0,101	2,08	0,071	2,13
% activación	Ant	67,42	64,83	44,98	51,80	<0,001	8,41	0,479	8,73	0,343	16,21
	ILG	41,81	49,81	39,31	35,03	0,033	7,75	0,222	14,74	0,279	9,50
Raíz											
ANRm	Ant	0,88	0,87	1,15	1,18	0,154	0,41	0,934	0,42	0,943	0,82
	ILG	0,71	1,00	2,82	1,58	<0,001	0,39	0,057	0,30	0,010	0,82
ANRs	Ant	0,62	0,56	0,60	0,55	0,890	0,25	0,687	0,34	0,788	0,44
	ILG	0,56	0,67	1,12	0,51	0,026	0,17	0,390	0,28	0,002	0,27
% activación	Ant	69,68	62,76	51,20	46,44	<0,001	6,65	0,195	11,61	0,262	9,42
	ILG	74,16	59,76	41,03	32,45	<0,001	7,74	0,012	9,09	0,186	14,07

4.1.7. Diseño y optimización de una plataforma de PCR cuantitativa en tiempo real para estudios de expresión génica en trigo duro

4.1.7.1. Evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes de referencia para la normalización de resultados de la qRT-PCR

Como se ha indicado en el capítulo de Materiales y Métodos, se evaluó la estabilidad en la expresión de los genes de referencia seleccionados (véase apartado 3.2.8.8, Tabla 3.2.8.8a) en material foliar que incluía un amplio rango de condiciones experimentales, a fin de poder identificar aquel que presentase una expresión más uniforme y estable para ser utilizado en la normalización de los resultados de expresión.

Tabla 4.1.7.1a. Estabilidad en el nivel de expresión de los genes de referencia en la hoja bandera de trigo duro cultivado en hidroponía y en el campo. Los valores son medias del C_t de 96 muestras foliares \pm la desviación estándar, coeficiente de variación (CV) y diferencia de C_t (C_t máximo – C_t mínimo), junto a la intensidad de la señal para 1.532 muestras de microarrays de trigo blando en Genevestigator.

Unigene	Descripción	Resultados experimentales			Genevestigator	
		C_t	CV	ΔC_t	Intensidad señal	CV
Ta54825	Actina	19,95 \pm 1,05	5,25	4,48	17,15 \pm 0,62	3,62
Ta25534	α -tubulina	23,83 \pm 1,05	4,40	5,21	13,45 \pm 0,87	6,47
Ta2291	Factor de ribosilación-ADP, ADP-RF	22,71 \pm 0,61	2,67	2,80	16,60 \pm 0,51	3,07
Ta44405	β -tubulina	26,63 \pm 0,69	2,60	3,12	15,22 \pm 0,70	4,60
Ta50503	Ubiquitina	22,52 \pm 0,62	2,74	3,19	17,75 \pm 0,50	2,82
Ta2776	Proteína similar al inhibidor ARNasa L, RLI	24,87 \pm 0,85	3,43	4,02	14,85 \pm 0,53	3,57
Ta54227	Proteína de control de división celular, superfamilia AAA de ATPasas, CDC	21,40 \pm 0,88	4,12	4,60	15,86 \pm 0,68	4,29

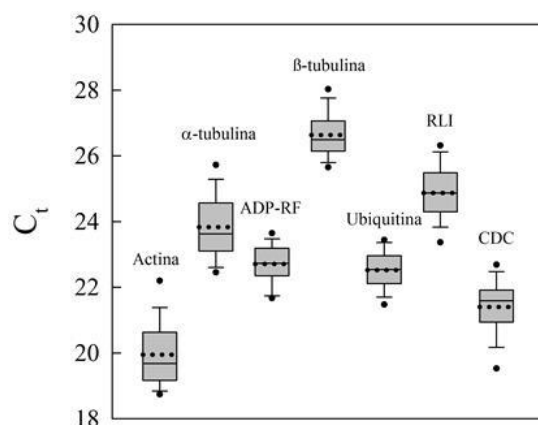


Fig. 4.1.7.1a. Niveles de expresión (C_t) para los 7 genes de referencia en la hoja bandera de trigo duro en las 96 muestras de los tres experimentos analizados. Los diagramas de caja representan la media (línea de puntos), la mediana (línea continua), los percentiles 25 y 75 (parte inferior y superior de la caja, respectivamente) y los percentiles 5 y 95 (punto inferior y superior fuera de la caja, respectivamente).

La expresión de los genes de referencia osciló en un rango de C_t comprendido entre 19,95-26,63, y se mantuvo, por lo general, bastante estable como indica la desviación típica (Tabla 4.1.7.1a, Fig. 4.1.7.1a). Dos de los genes de referencia más ampliamente utilizados, la actina y la α -tubulina, fueron los que mostraron una menor estabilidad en la expresión tanto en nuestras condiciones experimentales como en los datos de Genevestigator (Tabla 4.1.7.1a). La β -tubulina tuvo el menor coeficiente de variación en nuestros resultados experimentales pero mostró una mayor variabilidad en los resultados de arrays de Genevestigator. El factor de ribosilación-ADP y la ubiquitina presentaron una mayor uniformidad en la expresión en ambas condiciones experimentales que el resto de genes de referencia, con un coeficiente de variación para nuestros resultados de un 2,67% y 2,74% respectivamente, y en Genevestigator de un 3,07% y 2,82% para cada uno de ellos. La estabilidad en la expresión de los genes de referencia fue también evaluada en 48 muestras radiculares de los dos cultivos hidropónicos realizados, resultando el factor de ribosilación-ADP el más establemente expresado ($C_t = 22,95 \pm 0,79$; CV = 3,42%). Por tanto, el gen de referencia con mayor estabilidad en la expresión con independencia del tipo de tejido y condiciones experimentales analizadas fue el factor de ribosilación-ADP.

4.1.7.2. Validación de los genes incorporados a la plataforma para estudios de expresión génica

En el apartado de Materiales y Métodos se describen detalladamente todas las consideraciones y pasos que se siguieron en la búsqueda e identificación de las secuencias de los genes del metabolismo del C y N que fueron incorporados en la plataforma para estudios de expresión por qRT-PCR (ver apartado 3.2.8.1). Este trabajo permitió la identificación de 131 genes involucrados en la captación de luz y las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, el ciclo de Calvin-Benson y la fotorrespiración, la síntesis de

carbohidratos y la glicólisis, el ciclo TCA, la absorción de N y la asimilación e incorporación en compuestos orgánicos nitrogenados, junto a cinco TFs que desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo del C y N (Tabla 4.1.7.2a). Para las secuencias identificadas se diseñaron primers específicos (Anexo 3A), cuya especificidad fue validada en la hoja bandera y la raíz (Tabla 4.1.7.2a) al comprobar que generaron un único amplicón del tamaño previsible y un único pico en la curva de disociación. Del mismo modo, se procedió con los siete genes de referencia seleccionados para la evaluación de la estabilidad en la expresión génica en nuestras condiciones experimentales (véase apartado anterior y 3.2.8.8), y con el gen diseñado para verificar la ausencia de contaminación genómica (véase apartado 3.2.8.4).

Tabla 4.1.7.2a. Lista de genes seleccionados del metabolismo del C y N incorporados a la plataforma para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro. La validación se realizó en la hoja bandera (H) y la raíz (R), indicándose el funcionamiento en dichos tejidos. Se adjunta el número EC de los enzimas (Enzyme Commission number).

Nº acceso	Descripción	Enzima	Tejido
Transporte electrónico fotosintético			
FJ797425	Probable proteína cosechadora de luz asociada a clorofilas del fotosistema I, LHCI		H
AJ635207	Probable proteína cosechadora de luz asociada a clorofilas del fotosistema II, LHCI		H
TC432721	Probable apoproteína A1 de P700 del fotosistema I (87% similar a L36246 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PsaA		H
TC368668	Probable apoproteína A2 de P700 del fotosistema I (97% similar a DQ507383 de <i>Oryza sativa</i>), PsaB		H
M21352	Proteína D1 del fotosistema II (<i>psbA</i>)		H
EU492899	Proteína D2 del fotosistema II (<i>psbD</i>)		H
AY123422	Proteína ferrosulfurada de Rieske del complejo citocromo b ₆ f	EC 1.10.9.1	H
BE216924	Plastocianina, PC		H
X75089	Ferredoxina (<i>petF</i>), Fd		H
AJ457980	Ferredoxina-NADP reductasa (<i>pfnrII</i>), FNR	EC 1.18.1.2	H
Energía			
M16843	Subunidad β de la ATP sintasa del cloroplasto, ATPasa	EC 3.6.3.14	H
X74545	Subunidad β de la ATP sintasa de la mitocondria, ATPasa	EC 3.6.3.14	H
EF105343	Subunidad B1 de la ATP sintasa de la vacuola, ATPasa		H
Síntesis de clorofilas			
AB678199	Glutamyl-tARN reductasa (<i>hemA1</i>), GluTR	EC 1.2.1.70	H
Ciclo oxidativo y reductivo de las pentosas fosfato (cloroplasto)			
AY328025	Subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (<i>rbcL</i>), Rubisco	EC 4.1.1.39	H
AB020957	Subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (<i>rbcS</i>), Rubisco	EC 4.1.1.39	H
AJ635203	Rubisco activasa (<i>rba1</i>), RBA		H
X07851	Subunidad α de la chaperona de ensamblaje de las subunidades de Rubisco, cpn60		H
BE213258	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	EC 4.2.1.1	H
TC389217	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	EC 4.2.1.1	H
TC393400	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	EC 4.2.1.1	H
TC442386	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	EC 4.2.1.1	H
DQ290746	Fosfoglicerato quinasa (<i>pgk1</i>), plastídica, PGK	EC 2.7.2.3	H
TC379293	Probable gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, plast. (72% similar a M64114 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), GAPDH	EC 1.2.1.13	H
TC389847	Probable triosa fosfato isomerasa, plastídica (72% similar a AY087893 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), TPI	EC 5.3.1.1	H
FJ625793	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, plastídica, FBA	EC 4.1.2.13	H
X07780	Fructosa-1,6-bisfosfatasa, plastídica, FBPassa	EC 3.1.3.11	H
TC370604	Probable transquetolasa, plastídica (77% similar a AY133860 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), TK	EC 2.2.1.1	H
X65540	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, SBPassa	EC 3.1.3.37	H
TC374908	Probable ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, plastídica (85% similar a AF047444 de <i>Oryza sativa</i>), RPE	EC 5.1.3.1	H
TC405712	Probable ribosa-5-fosfato isomerasa, plastídica (68% similar a AY045785 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), RPI	EC 5.3.1.6	H
X51608	Fosforribuloquinasa/ribulosa-5-fosfato quinasa, plastídica, PRK	EC 2.7.1.19	H
BE216942	Probable proteína CP12		H
Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (citosol)			
TC410105	Probable ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, citosólica (80% similar a AF189365 de <i>Oryza sativa</i>), RPE	EC 5.1.3.1	H
TC391593	Probable ribosa-5-fosfato isomerasa, citosólica (65% similar a AY054172 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), RPI	EC 5.3.1.6	H
Fotorrespiración			
TC391192	Probable fosfoglicolato fosfatasa (75% similar a AY094446 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PGLP	EC 3.1.3.18	H
BE216989	Probable glicolato oxidasa, GO	EC 1.1.3.15	H
D86327	Catalasa (<i>cat1</i>), CAT	EC 1.11.1.6	H
TC405186	Probable glutamato-glioxilato aminotransferasa (74% similar a AF479639 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), GGAT	EC 2.6.1.4	H
TC416357	Probable serina-glioxilato aminotransferasa (71% similar a AB048945 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), SGAT	EC 2.6.1.45	H
AJ635205	Probable subunidad P del complejo glicina descarboxilasa (<i>gly1</i>), gdcP	EC 1.4.4.2	H
AY123417	Probable subunidad H del complejo glicina descarboxilasa, gdcH		H
DQ862827	Serina hidroximetil transferasa, predicción mitocondrial, SHMT	EC 2.1.2.1	H
TC391765	Probable hidroxipiruvato reductasa, peroxisomal (74% similar a AY099552 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), HPR1	EC 1.1.1.29	H
TC394252	Probable glicerato quinasa (69% similar a AF360156 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), GLYK	EC 2.7.1.31	H
Síntesis y degradación de carbohidratos			
JQ673331	Pirofosfatasa inorgánica (<i>IPPI-1</i>)	EC 3.6.1.1	H
AJ319659	ADP-glucosa pirofosfatasa, AGPPasa	EC 3.1.4.?	H
DQ406820	Subunidad grande de la ADP-glucosa pirofosforilasa, plastídica, AGPasa	EC 2.7.7.27	H, R
AF492644	Subunidad pequeña de la ADP-glucosa pirofosforilasa, plastídica, AGPasa	EC 2.7.7.27	H, R
AJ635204	Probable almidón sintasa, isoforma SSI	EC 2.4.1.21	H, R
AF258608	Almidón sintasa, isoforma SSIII	EC 2.4.1.21	H
AY044844	Almidón sintasa, isoforma SSIV	EC 2.4.1.21	H
AJ301647	Isoamilasa 1 (<i>iso1</i>), ISO1	EC 3.2.1.68	H
JN412069	Isoamilasa 3 (<i>iso3</i>), ISO3	EC 3.2.1.68	H
AF314182	Translocador de triosas fosfato/fosfato (<i>tp1</i>), TPT		H
AF548741	Translocador de glucosa-6-fosfato/fosfato, GPT		H

Tabla 4.1.7.2a. Continuación.

Nº acceso	Descripción	Enzima	Tejido
TC374000	Probable fructosa-1,6-bisfosfatasa, citosólica (83% similar a AB007193 de <i>Oryza sativa</i>), FBPasa	EC 3.1.3.11	H
TC380863	Probable nucleósido bisfosfato quinasa 1, citosólica (76% similar a D16292 de <i>Oryza sativa</i>), NDK	EC 2.7.4.6	H
BT009219	Probable UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (95% similar a X91347 de <i>Hordeum vulgare</i>), UGPasa	EC 2.7.7.9	H
AF310160	Sacarosa-fosfato sintasa (<i>SPSI</i>), SPS	EC 2.4.1.14	H, R
AF321556	Sacarosa-fosfato fosfatasa (<i>SPP1</i>), SPP	EC 3.1.3.24	H
AJ001117	Sacarosa sintasa (<i>Sus1</i>), SUS	EC 2.4.1.13	H
AM295169	Invertasa alcalina, predicción citosólica (<i>AINV</i>)	EC 3.2.1.26	H, R
EU981912	Sacarosa:sacarosa-1-fructosiltransferasa (<i>I-SST</i>), 1-SST	EC 2.4.1.99	H, R
EU981911	Sacarosa:fructano-6-fructosiltransferasa (<i>6-SFT</i>), 6-SFT	EC 2.4.1.10	H, R
AB088409	Fructano:fructano-1-fructosiltransferasa (<i>I-FFT-A</i>), 1-FFT	EC 2.4.1.100	H, R
AB088410	Fructano:fructano-1-fructosiltransferasa (<i>I-FFT-B</i>), 1-FFT	EC 2.4.1.100	H, R
AJ564996	Fructano-1-exohidrolasa (<i>I-FEH w3</i>), 1-FEH	EC 3.2.1.153	H
AB089269	Fructano-6&1-exohidrolasa, 6&1-FEH	EC 3.2.1.?	H
AB089270	6-kestosa exohidrolasa, 6-KEH	EC 3.2.1.154	H
JQ073560	Trehalosa-6-fosfato sintasa, TPS	EC 2.4.1.15	H
AK331310	Probable trehalasa (85% similar a AK108163 de <i>Oryza sativa</i>), TRE	EC 3.2.1.28	H
Pared celular			
AB158407	Probable celulosa sintasa (<i>CesA</i>), CESA	EC 2.4.1.12	H
AF030421	Invertasa de pared celular (<i>IVR3</i>), cwINV	EC 3.2.1.26	H
Glicólisis			
AY974231	Hexoquinasa, HXK	EC 2.7.1.1	H, R
BQ606334	Probable fosfoglucomutasa, plastídica (70% similar a AJ242601 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PGM	EC 5.4.2.2	H
AJ313311	Fosfoglucomutasa, citosólica, PGM	EC 5.4.2.2	H
AK333308	Probable fosfoglucomutasa isomerasa, plastídica, PGI	EC 5.3.1.9	H
DQ456872	Fosfoglucomutasa isomerasa, citosólica, PGI	EC 5.3.1.9	H
AY130765	Pirofosfato fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, PFP	EC 2.7.1.90	H
TC391986	Probable 6-fosfofructoquinasa (72% similar a NM_124155 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PFK	EC 2.7.1.11	H
AK333335	Probable fructosa-2,6-bisfosfatasa/6-fosfofructo-2-quinasa (91% similar a AF456329 de <i>Oryza sativa</i>), F2KP	EC 3.1.3.46 / EC 2.7.1.105	H
AJ420778	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, citosólica, FBA	EC 4.1.2.13	H
AJ278243	Triosa fosfato isomerasa, citosólica, TPI	EC 5.3.1.1	H
FN429985	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica, GAPC	EC 1.2.1.12	H
AF521191	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica (no fosforilante), GAPN	EC 1.2.1.9	H
X15232	Fosfoglicerato quinasa (<i>pgk2</i>), citosólica, PGK	EC 2.7.2.3	H
AF475111	Fosfoglicerato mutasa, PGAM	EC 5.4.2.1	H
AJ007705	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (<i>PEPC</i>), PEPC	EC 4.1.1.31	H
AK332778	Probable piruvato quinasa (86% similar a NM_001072281 de <i>Oryza sativa</i>), PK	EC 2.7.1.40	H, R
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos			
GUS563379	Probable subunidad E1- α del complejo piruvato deshidrogenasa, predicción mitocondrial, PDC	EC 1.2.4.1	H
TC378665	Probable citrato sintasa, mitocondrial (74% similar a AF387018 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), CS	EC 2.3.3.1	H, R
AK331640	Probable isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD, mitoc. (87% similar a AB189169 de <i>Oryza sativa</i>), IDH	EC 1.1.1.41	H
DR740472	Probable isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, cit. (88% similar a GQ848053 de <i>Oryza sativa</i>), ICDH	EC 1.1.1.42	H
TC392831	Probable sub. E1 del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (76% similar a AK229884 de <i>A. thaliana</i>), OGDH	EC 1.2.4.2	H, R
Asimilación de nitrógeno			
AY525637	Transportador de amonio (<i>AMT1.1</i>), AMT		R
AY525638	Transportador de amonio (<i>AMT1.2</i>), AMT		H, R
AY428038	Transportador de amonio (<i>AMT2.1</i>), AMT		H, R
HF544985	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.1A</i>), NRT1		H, R
HF544986	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.1B</i>), NRT1		H, R
AY587264	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.2</i>), NRT1		R
HF544990	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.3A</i>), NRT1		H, R
HF544993	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.5B</i>), NRT1		H, R
HF544995	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.7B</i>), NRT1		H, R
HF544997	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.8B</i>), NRT1		H
AF332214	Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2.1</i>), NRT2		R
AF288688	Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2.2</i>), NRT2		H, R
AY053452	Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2.3</i>), NRT2		R
AY763794	Componente del transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NAR2.1</i>), NAR2		H, R
AY763795	Componente del transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NAR2.2</i>), NAR2		H, R
AK333426	Nitrato reductasa dependiente de NADH (88% similar a X57845 de <i>Hordeum vulgare</i>), NR	EC 1.7.1.1	H, R
AK333382	Cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa (95% similar a AF268595 de <i>Hordeum vulgare</i>), MoCo		H, R
FJ527909	Nitrato reductasa dependiente de ferredoxina (<i>nir</i>), NiR	EC 1.7.7.1	H, R
DQ124209	Glutamina sintetasa (<i>GS1a</i>), citosólica, GS1	EC 6.3.1.2	H, R
AY491968	Glutamina sintetasa (<i>GSr1</i>), citosólica, GS1	EC 6.3.1.2	H
DQ124212	Glutamina sintetasa (<i>GS2a</i>), plastídica, GS2	EC 6.3.1.2	H
DQ124213	Glutamina sintetasa (<i>GS2b</i>), plastídica, GS2	EC 6.3.1.2	H
TC387834	Probable glutamato sintasa dependiente de NADH (86% similar a AB008845 de <i>Oryza sativa</i>), NADH-GOGAT	EC 1.4.1.14	H, R
TC394038	Probable glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (86% similar a AB008845 de <i>Oryza sativa</i>), Fd-GOGAT	EC 1.4.7.1	H, R
HQ821868	Glutamato deshidrogenasa (<i>GDH1</i>), GDH	EC 1.4.1.2	H, R
EU346759	Aspartato aminotransferasa, citosólica, AAT	EC 2.6.1.1	H
EU885207	Aspartato aminotransferasa, plastídica, AAT	EC 2.6.1.1	H
AY621539	Asparagina sintetasa (<i>ASN1</i>), AS	EC 6.3.5.4	H, R
HM998551	Canal de cloro (<i>CLC1</i>), CLC		H
Estrés			
GQ240772	Proteína de choque térmico (<i>HSP90.1-A1</i>), HSP		H
GQ280382	Proteína de choque térmico (<i>HSP70</i>), HSP		H
Factores de transcripción			
JF288934	Factor de transcripción Myb (MYB13-1)		H
AY955493	Factor de transcripción Dof (Dof1)		H, R
JF830784	Factor de transcripción NF-Y (NF-YB3)		H
DQ512330	Factor de transcripción MADS-box (AGL1)		R
AM502900	Factor de transcripción MADS-box (WM30), similar a <i>ANR1</i> en <i>A. thaliana</i>		R

Para algunos de los genes ortólogos identificados se realizaron MSAs con genes de especies próximas y árboles filogenéticos para proponer la función biológica, localización subcelular, isoforma o familia génica (véase apartado 3.2.8.1), como por ejemplo para la GOGAT (Fig. 4.1.7.2a) y la AAT (Fig. 4.1.7.2b).

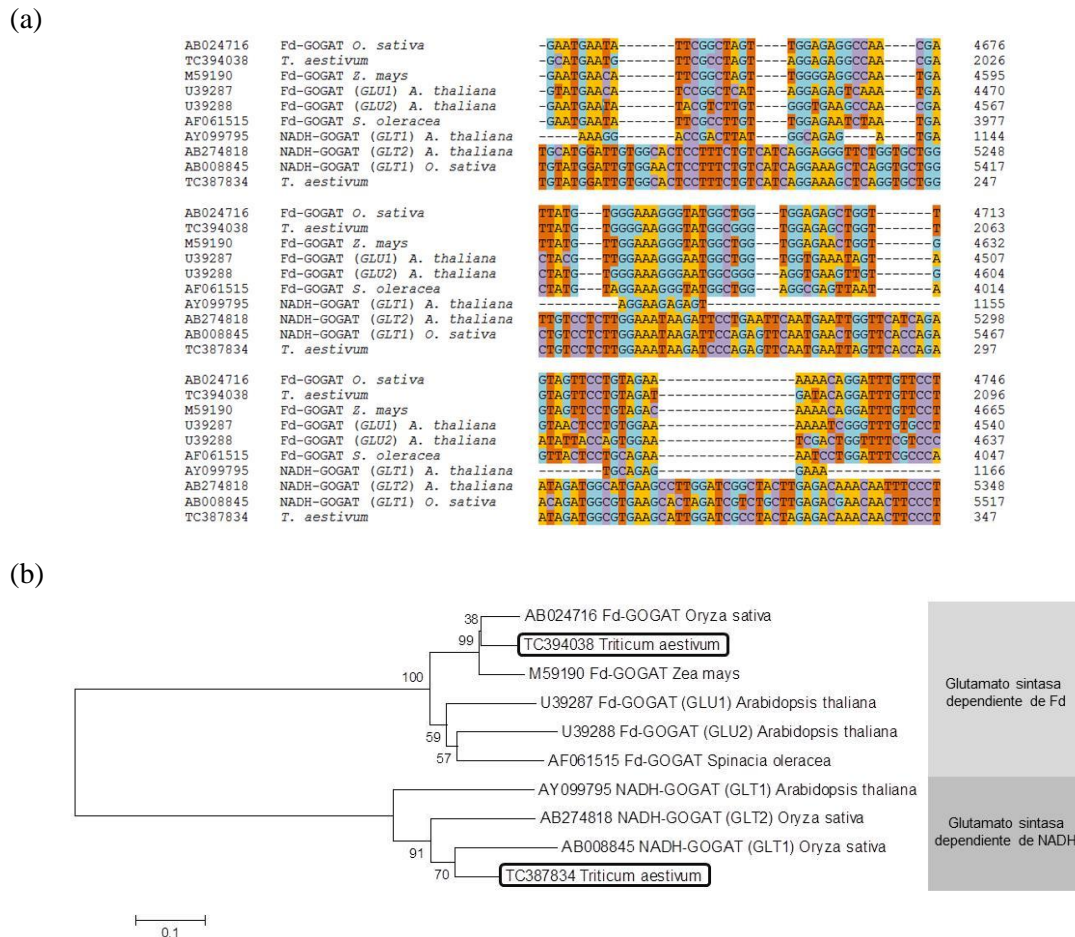


Fig. 4.1.7.2a. (a) Alineamiento múltiple de secuencias realizado con el método ClustalW con los parámetros por defecto y (b) árbol filogenético construido con el método neighbor-joining con un análisis bootstrap de 1.000 réplicas en MEGA 5 para la glutamato sintasa de dos genes ortólogos probables de trigo con otras secuencias bien anotadas de otras especies. Se indican los números de acceso de las secuencias en la base GenBank.

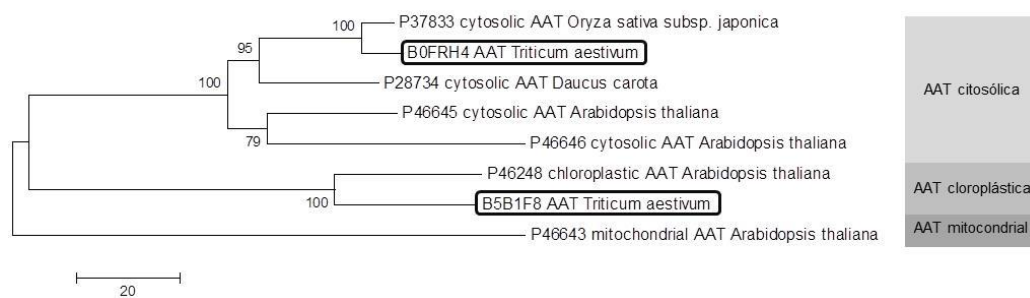


Fig. 4.1.7.2b. Árbol filogenético construido con el método neighbor-joining con un análisis bootstrap de 1.000 réplicas en MEGA 5 para la aspartato aminotransferasa de dos secuencias de trigo con otras secuencias bien anotadas de otras especies. Se indican los números de acceso de las secuencias aminoacídicas en la base UniProtKB/Swiss-Prot (B0FRH4 y B5B1F8), correspondientes con las secuencias EU346759 y EU885207 de GenBank, respectivamente.

En este estudio se han identificado algunos de los genes que codifican los transportadores de NO_3^- (NRT1, NRT2, NAR2 y CLC), que agrupan una familia de genes que en *Arabidopsis* están bastante bien caracterizados (véase capítulo de Introducción) y para algunos de ellos se han propuesto funciones específicas. Por la escasa información existente en trigo, en un intento de predecir la función específica de algunos de los transportadores identificados, se analizó la homología entre las secuencias aminoacídicas de trigo con las de *Arabidopsis* mediante árboles filogenéticos. A pesar de las dificultades encontradas para obtener un buen árbol filogenético para los transportadores NRT1 (Fig. 4.1.7.2c), con los resultados más fiables obtenidos se pudo comprobar que el gen *TaNRT1.3* y los genes *TaNRT1.1A* y *TaNRT1.1B* mostraron cierta similitud con sus homólogos en *Arabidopsis*.

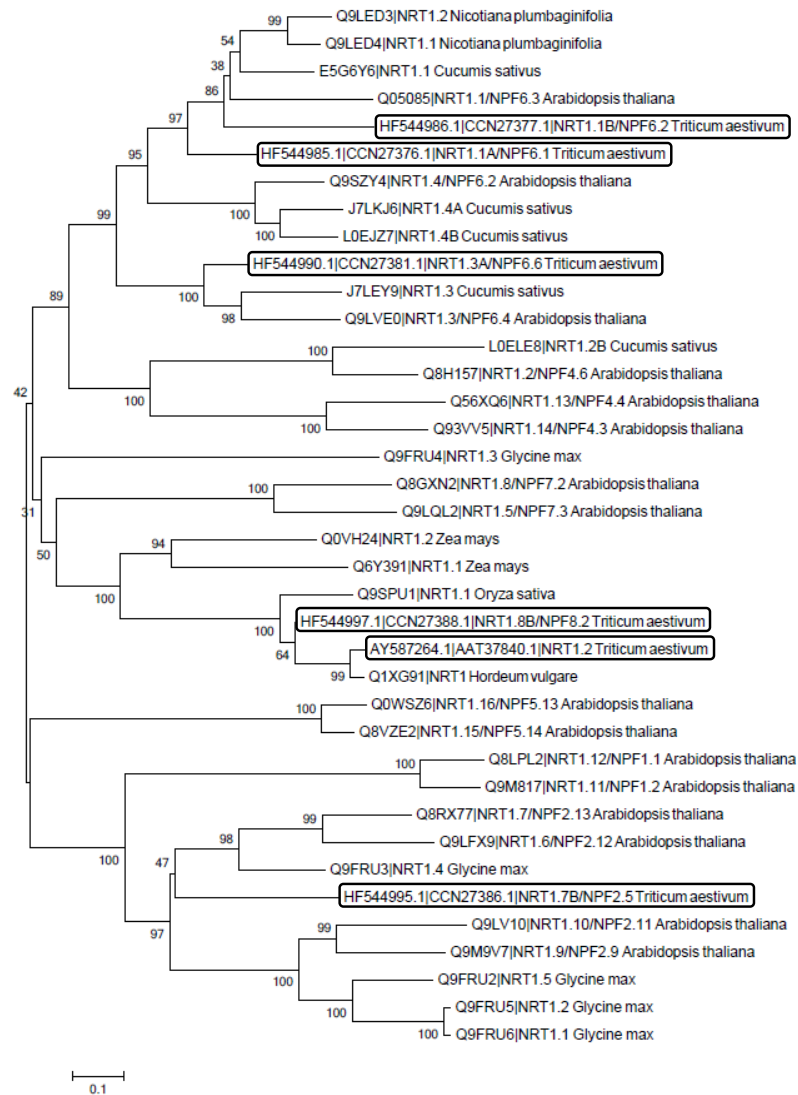


Fig. 4.1.7.2c. Árbol filogenético construido con el método neighbor-joining con un análisis bootstrap de 1.000 réplicas en MEGA 5 para la familia NRT1 de trigo y *Arabidopsis*. El MSA se realizó en ClustalW con los parámetros por defecto y las distancias evolutivas fueron computadas con el modelo Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992). El transportador *TaNRT1.5* fue eliminado por su escasa homología. Se indican los números de acceso de las secuencias aminoacídicas de Uniprot para las proteínas de *Arabidopsis* y de las secuencias nucleotídicas/aminoacídicas para las proteínas de trigo en GenBank.

Los transportadores *TaAMT1* y *TaAMT2* de trigo mostraron semejanza con los de *Arabidopsis* *AtAMT1* y *AtAMT2* (Fig. 4.1.7.2d). Los transportadores *TaNRT2* y *TaNAR2* se englobaron en las

correspondientes familias semejantes de *Arabidopsis*, aunque se agruparon entre ellos por similitud genotípica. En relación con los transportadores de NO_3^- en la vacuola, el gen *TaCLC1* de trigo mostró mayor semejanza con el gen *AtCLC-d* de *Arabidopsis* de función desconocida. Se sabe que el gen *AtCLC-d* está asociado a la región Trans-Golgi y tiene función antiporte (de Angeli *et al.*, 2007).

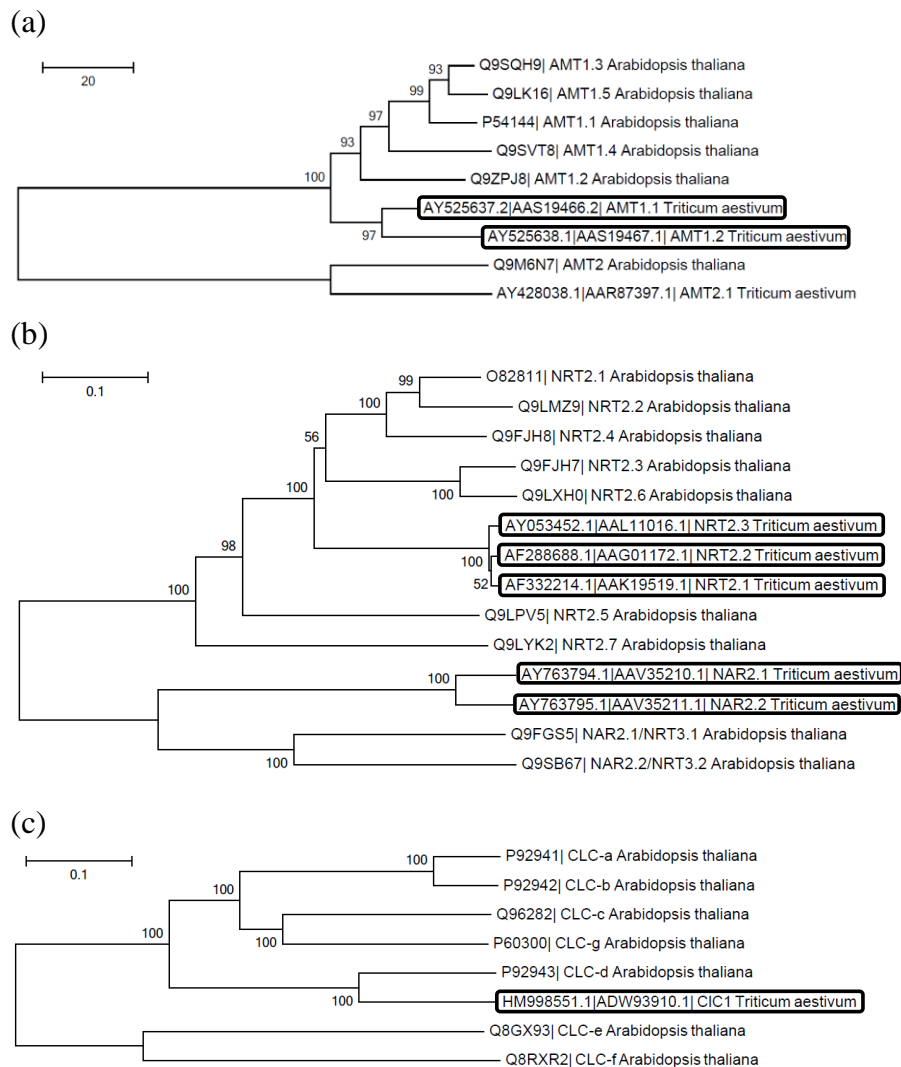


Fig. 4.1.7.2d. Árbol filogenético construido con el método neighbor-joining con un análisis bootstrap de 1.000 réplicas en MEGA 5 para las familias (a) AMT, (b) NRT2, NAR2 y (c) CLC de trigo y *Arabidopsis*. El MSA se realizó en ClustalW con los parámetros por defecto y las distancias evolutivas fueron computadas con el modelo número de diferencias. Se indican los números de acceso de las secuencias aminoacídicas de Uniprot para las proteínas de *Arabidopsis* y de las secuencias nucleotídicas/aminoacídicas para las proteínas de trigo en GenBank.

Un análisis aún más estricto de la especificidad de los primers que fueron diseñados, complementarios a los ya descritos, se realizó secuenciando los productos generados por qRT-PCR de algunos de ellos, en concreto, para 15 de los pares de primers específicos para las secuencias identificadas (Tabla 4.1.7.2b). De los cuales, 12 fueron diseñados en secuencias de *T. aestivum*, 2 en *T. durum* y 1 en *T. turgidum*. De este modo también se pudo comprobar la homología entre las secuencias de la especie de origen con la de la especie de estudio, *Triticum durum*. Con el software MUSCLE (Anexo 4) se realizó un alineamiento entre las secuencias de los productos de la qRT-PCR y la secuencia sobre la que se diseñaron los primers. Aun cuando se detectó algún error o sustitución en algunos de los

productos secuenciados (Tabla 4.1.7.2b), se consideraron insignificantes en el total (15/1.590; <1%). Además, se comprobó que cuando se realizó un BLAST en GenBank con la secuencia consenso de las originadas en ambos sentidos para cada producto, se obtuvo la secuencia de partida sobre la que fueron diseñados los primers como el mejor resultado.

Tabla 4.1.7.2b. Genes seleccionados para la secuenciación del producto de qRT-PCR obtenido con los primers diseñados y sustituciones encontradas entre el producto esperado y el obtenido.

Nº acceso	Descripción	Especie	Sustituciones
TC432721	Probable apoproteína A1 de P700 del fotosistema I, PsaA	<i>T. aestivum</i>	0 / 109
M21352	Proteína D1 del fotosistema II (<i>psbA</i>)	<i>T. aestivum</i>	0 / 141
AB020957	Subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (<i>rbcS</i>), Rubisco	<i>T. aestivum</i>	2 / 95
DQ290746	Fosfoglicerato quinasa (<i>pgk1</i>), plastídica, PGK	<i>T. turgidum</i>	0 / 138
TC379293	Probable gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, plastídica, GAPDH	<i>T. aestivum</i>	0 / 144
TC391593	Probable ribosa-5-fosfato isomerasa, citosólica, RPI	<i>T. aestivum</i>	0 / 141
EU981912	Sacarosa:sacarosa-1-fructosiltransferasa (<i>I-SST</i>), 1-SST	<i>T. durum</i>	0 / 142
EU981911	Sacarosa:fructano-6-fructosiltransferasa (<i>6-SFT</i>), 6-SFT	<i>T. durum</i>	0 / 146
AB158407	Probable celulosa sintasa (<i>CesA</i>), CESA	<i>T. aestivum</i>	1 / 136
AY130765	Pirofosfato fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, PFP	<i>T. aestivum</i>	5 / 144
GU563379	Probable subunidad E1- α del complejo piruvato deshidrogenasa, mitocondrial, PDC	<i>T. aestivum</i>	0 / 141
DQ124209	Glutamina sintetasa (<i>GS1a</i>), citosólica, GS1	<i>T. aestivum</i>	0 / 139
HF544985	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.1A</i>), NRT1	<i>T. aestivum</i>	0 / 112
HF544997	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.8B</i>), NRT1	<i>T. aestivum</i>	4 / 138
HQ821868	Glutamato deshidrogenasa (<i>GDH1</i>), GDH	<i>T. aestivum</i>	3 / 150

4.1.8. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la expresión de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz

En este apartado se describen los resultados de expresión génica obtenidos por qRT-PCR de los genes que codifican proteínas del metabolismo del C y N incorporados en la plataforma tanto en la hoja bandera como en la raíz (Tablas 4.1.8a y 4.1.8b). Se muestra la expresión relativa en CO₂ elevado con respecto a CO₂ ambiente de cada uno de los genes (\log_2 fold change) para cada nivel de N evaluado separadamente.

En la antesis, en la hoja bandera de plantas con un suministro de N bajo, el CO₂ elevado indujo los niveles de transcritos de genes que codifican la proteína cosechadora de luz del LHCI, las proteínas D1 y D2 del PSII, la FNR, la subunidad β de la ATPasa del cloroplasto, la GluTR involucrada en la síntesis de clorofilas, la subunidad pequeña de la Rubisco, la RBA, la TPI plastídica, la isoforma III de la SS, la PGM citosólica, la PFK, la PEPC, la IDH, el transportador de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.5B, la GS plastídica (*GS2a*) y la proteína de choque térmico HSP70 (Tabla 4.1.8a). Sin embargo, condujo también a un descenso de transcritos de las FTs (1-SST, 6-SFT y las isoformas A y B de la 1-FFT), la TPS, la INV de pared celular, la GS citosólica (*GS1a*), la GDH y los transportadores de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.7B y NRT1.8B (Tabla 4.1.8a).

En la hoja bandera de plantas con un suministro de N alto, el enriquecimiento en CO₂ redujo los niveles de transcritos de genes que codifican la PC y FNR involucradas en la CTEF, una de las CAs, la SBPasa y la PRK plastídica en el ciclo de Calvin-Benson, la RPI citosólica del OPPP, la PGLP que interviene en la fotorrespiración, la ISO1 implicada en el metabolismo del almidón, la TPS que cataliza la síntesis de trehalosa y la GS2 plastídica (*GS2b*) involucrada en la asimilación de N (Tabla 4.1.8a), mientras que indujo únicamente la expresión génica de la GDH. Estos resultados muestran que a nivel foliar la pauta de cambio inducida por el CO₂ elevado en la expresión génica fue opuesta en las plantas con un aporte de N bajo en comparación con aquellas con un aporte alto de dicho nutriente.

En la raíz de plantas deficientes en N, el CO₂ elevado condujo a un descenso de transcritos de los genes que codifican las dos subunidades de la AGPasa plastídica involucrada en la síntesis de almidón, de la CS mitocondrial del ciclo TCA, de los transportadores de NO₃⁻ NRT1.1B y NRT1.3A y de los TFs Dof1 y WM30, aunque aumentó los transcritos del transportador de baja afinidad NRT1.7B (Tabla 4.1.8b). Mientras que en las plantas con N abundante, el enriquecimiento en CO₂ disminuyó la expresión génica de la PK (glicólisis), de la subunidad E1 del OGDC (ciclo TCA) y de la GDH (asimilación de N), y aumentó la expresión de los transportadores de NH₄⁺ y NO₃⁻, en concreto del AMT1;2, NRT1.1B, NRT1.3A y NRT2.3 (Tabla 4.1.8b).

Al inicio del llenado del grano con la progresión del desarrollo de las plantas, un mayor número de genes respondieron al CO₂ alto con independencia de la disponibilidad de N en la solución nutritiva y del material vegetal evaluado (Tablas 4.1.8a y 4.1.8b). En la hoja bandera de plantas con un aporte de N bajo, el CO₂ elevado aumentó los transcritos de los genes que codifican las proteínas cosechadoras de luz del LHCI y LHCII, la proteína ferrosulfurada de Rieske del Cytb₆f, la subunidad β de la ATPasa plastídica, la GluTR, la subunidad grande de la Rubisco, la RBA, una CA plastídica, las proteínas plastídicas GAPDH, FBPasa, SBPasa, RPE y PRK, la proteína CP12, la PGLP, la SGAT, la subunidad P del GDC, la IPP, la FBPasa citosólica, la 6-KEH, la F2KP, el transportador de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.7B, la NR dependiente de NADH y la GS plastídica (*GS2a*) (Tabla 4.1.8a). Además, el enriquecimiento en CO₂ produjo un descenso de transcritos de las subunidades β de las ATPasas mitocondrial y vacuolar, la PGI citosólica, el transportador de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.5B, el cofactor MoCo de la NR, las isoformas de GS citosólica (*GS1a* y *GSr1*), la GDH y el CLC (Tabla 4.1.8a).

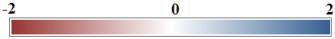
En plantas con un aporte de N alto, el crecimiento prolongado en CO₂ elevado condujo a un descenso de transcritos de los genes que codifican las proteínas cosechadoras de la luz del LHCI y LHCII, la apoproteína A1 del P700 del PSI, la PC, la Fd, las subunidades β de las ATPasas del cloroplasto y la mitocondria, la RBA, dos de las CAs plastídicas, las proteínas plastídicas GAPDH, FBA, FBPasa, TK y PRK, la RPE plastídica y citosólica, la RPI citosólica, la proteína CP12, todos los genes seleccionados de la fotorrespiración –excepto la SHMT mitocondrial y la GLYK, que no lograron alcanzar significación estadística–, la isoforma IV de la SS, la ISO1, la FBPasa citosólica, la SPS, la INV alcalina, la isoforma A de la 1-FFT, la 6-KEH, la TPS, la HXK, la PGI citosólica, la F2KP, la ICDH citosólica, los transportadores de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.1B y NRT1.7B, de alta afinidad NRT2.2, la NR dependiente de NADH, la NiR dependiente de Fd, una de las GS citosólicas y plastídicas (*GSr1* y *GS2b*), la proteína HSP70 y el TF Dof1. Si bien, aumentó también la expresión de la PGI plastídica, la PGK citosólica, la GDH y la AAT citosólica. En definitiva, frente a la estimulación de la expresión inducida por el CO₂ alto en plantas deficientes en N predominó la represión en aquellas con N abundante en etapas más tardías del desarrollo de las plantas de trigo (Tablas 4.1.8a).

En la raíz de plantas deficientes en N, el CO₂ elevado redujo los transcritos de los genes que codifican las subunidades grande y pequeña de la AGPasa, la SPS, la HXK, la subunidad E1 del OGDC, la GOGAT dependiente de Fd y la GDH, a la vez que aumentó el contenido de transcritos del componente del transportador de NO₃⁻ de alta afinidad NAR2.1 (Tabla 4.1.8b). Mientras que en las plantas con N abundante condujo a un descenso de la expresión génica de la 1-SST, la HXK, la PK, los transportadores de NO₃⁻ de alta afinidad NRT2.1, NRT2.2 y NRT2.3, y del componente del transportador de alta afinidad NAR2.2, la NR dependiente de NADH, la NiR, la GS citosólica (*GS1a*) y la GDH, y aumentó únicamente el transportador de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.2 (Tabla 4.1.8b).

Tabla 4.1.8a. Heat map del nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻) en la antesis y el inicio del llenado de grano. Los datos se muestran en log₂. Los genes inducidos o reprimidos varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente, según la escala de color. *, P<0,05; **, P<0,001 (n=3). Las abreviaturas de los transcritos se detallan en la Tabla 4.1.7.2a.

	Antesis		Inicio llenado grano			Antesis		Inicio llenado grano	
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH		EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH
Transporte electrónico fotosintético					Síntesis y degradación de carbohidratos				
LHCI	1,36*	-0,50	0,71*	-0,41*	1-SST	-1,62*	-1,67	-1,66	-1,12
LHCII	1,28	-0,42	2,79*	-1,08*	6-SFT	-1,54*	-0,57	-1,51	-1,26
PsaA	0,14	-0,39	0,06	-0,62*	1-FFT A	-1,19*	-0,32	-0,59	-1,14*
PsaB	0,41	-0,58	0,34	-0,15	1-FFT B	-0,85*	-0,13	-0,86	-0,95
D1	0,80*	-0,27	0,33	-0,01	1-FEH	0,08	-0,68	0,20	-0,13
D2	0,53*	-0,22	-0,20	-0,01	6&1-FEH	0,89	-0,27	0,47	-0,82
Cytb6f prot. Rieske	0,25	-0,35	0,84*	-0,44	6-KEH	-0,09	-0,34	1,76*	-1,59*
PC	0,53	-0,53*	0,20	-1,46*	TPS	-0,58*	-0,62*	-0,34	-0,74*
Fd	0,40	-0,31	-0,06	-1,03*	TRE	-0,54	-0,21	0,06	0,05
FNR	0,74*	-0,53*	0,54	-0,36	Pared celular				
Energía					CESA	-0,02	-0,36	-0,05	0,07
ATPasa β sub. chl.	0,94*	-0,26	0,54*	-0,65*	cwInv	-0,56*	-0,39	0,05	-0,34
ATPasa β sub. mit.	0,29	-0,26	-1,14*	-0,38*	Glicólisis				
ATPasa B1 sub. vac.	0,29	-0,15	-0,66**	-0,05	HXK	0,27	-0,61	-0,30	-0,86**
Síntesis de clorofilas					PGM plast.	0,45	-0,28	0,61	0,00
GluTR	1,64*	-0,80	1,34*	-1,06	PGM cit.	0,65*	-0,32	0,05	-0,16
Ciclo oxidativo y reductor de las pentosas fosfato (cloroplasto)					PGI plast.	0,27	0,09	0,08	0,52*
Rubisco sub. gr.	0,65	-0,64	0,52*	-0,94	PGI cit.	0,07	-0,09	-0,34*	-1,08*
Rubisco sub. peq.	1,24*	-0,31	0,77	-0,60	PFP	0,56	-0,30	0,21	-0,46
RBA	0,43*	-0,36	0,48*	-0,69*	PFK	0,81*	-0,16	-0,36	0,01
cpn60	0,64	-0,53	1,07	-0,26	F2KP	0,64	-0,64	0,75*	-0,51*
CA	1,21	0,35	0,74	-0,11	FBA cit.	-0,03	0,00	0,18	-0,07
CA	0,83	-0,64*	0,99*	-0,82*	TPI cit.	0,14	-0,37	0,79	-0,05
CA	0,52	-0,41	1,31	-0,72*	GAPC cit.	0,28	-0,26	-0,37	0,46
CA	-0,05	-0,39	0,54	-0,01	GAPN cit.	0,10	-0,46	0,53	-0,22
PGK plast.	0,64	-0,28	-0,02	-0,59	PGK cit.	0,14	-0,10	-0,44	0,40*
GAPDH plast.	0,67	-0,60	0,75*	-0,80*	PGAM	0,05	-0,19	-0,08	0,09
TPI plast.	0,57*	-0,24	0,95	-0,55	PEPC	0,20*	-0,12	0,34	-0,04
FBA plast.	0,72	-0,52	0,78	-0,89*	PK	-0,01	-0,27	0,17	0,01
FBPasa plast.	0,46	-0,43	1,62*	-0,72**	Ciclo de los ácidos tricarbónicos				
TK plast.	0,46	-0,49	1,49	-0,72*	PDC α-sub. mit.	0,02	-0,42	0,22	-0,23
SBPasa	0,45	-0,73*	1,23*	-0,90	CS mit.	0,19	0,01	-0,08	0,07
RPE plast.	0,44	-0,34	1,44*	-0,55*	IDH mit.	0,34*	-0,03	-0,19	-0,16
RPI plast.	0,06	-0,36	-0,33	0,04	ICDH cit.	-0,29	-0,48	-0,09	-0,69*
PRK plast.	0,28	-0,52*	0,67*	-0,64*	OGDC El sub.	0,02	-0,34	-0,09	0,06
CP12	0,42	-0,28	0,81*	-0,64*	Asimilación de nitrógeno				
Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (citósol)					AMT1:2	0,26	-0,19	0,06	-0,43
RPE cit.	0,28	-0,32	0,63	-0,95**	AMT2:1	-0,39	0,19	0,08	0,71
RPI cit.	-0,22	-0,68*	0,01	-0,93*	NRT1.1A	0,14	-0,18	0,09	0,13
Fotorrespiración					NRT1.1B	-0,02	0,18	-0,68	-0,99*
PGLP	-0,41	-0,63*	0,39*	-0,66*	NRT1.3A	0,34	-0,08	-0,21	-0,22
GO	0,12	-0,66	-0,65	-0,48*	NRT1.5B	1,31*	-0,38	-0,15*	-1,02
CAT	0,29	0,38	0,44	-0,64*	NRT1.7B	-0,56*	0,29	0,93*	-0,46*
GGAT	0,61	-0,34	0,49	-0,62*	NRT1.8B	-0,74*	-0,61	-0,52	-0,58
SGAT	-0,03	-0,41	0,38*	-0,42*	NRT2.2	0,58	-0,70	-0,21	-0,76*
GDC sub. P	0,15	-0,49	0,42*	-0,66*	NAR2.1	0,05	0,02	-0,07	-0,05
GDC sub. H	0,20	-0,40	0,61	-0,60*	NAR2.2	0,57	-0,23	-0,31	0,10
SHMT mit.	0,39	-0,56	0,52	-0,86	NADH-NR	0,20	-0,03	0,70*	-0,58*
HPR1 perox.	0,22	-0,37	0,37	-0,55*	MoCo	-0,21	-0,34	-0,50*	-0,37
GLYK	0,13	0,36	0,24	-0,61	NiR	0,52	0,27	0,67	-0,49*
Síntesis y degradación de carbohidratos					GS1a	-0,58*	-0,30	-0,66*	0,40
IPP	0,35	-0,44	0,63*	-0,87	GSr1	-0,32	-0,37	-1,19*	-0,61*
AGPPasa	0,35	-0,74	1,30	-0,63	GS2a	0,40*	-0,33	0,49*	-0,33
AGPasa sub. gr.	0,31	-0,35	0,42	-0,49	GS2b	0,27	-0,90*	0,55	-1,02*
AGPasa sub. peq.	0,22	-0,35	-0,02	-0,15	NADH-GOGAT	0,13	-0,16	-0,08	0,03
SSI	0,18	-0,41	-0,09	-0,42	Fd-GOGAT	-0,02	0,12	-0,26	-0,66
SSIII	0,47*	-0,35	-0,58	-0,28	GDH	-0,96*	0,83*	-0,56*	0,73*
SSIV	0,18	0,07	-0,57	-0,73*	AAT cit.	0,25	-0,01	-0,33	0,56*
ISO1	-0,45	-0,42*	-0,41	-0,59*	AAT plast.	0,37	0,39	0,07	0,53
ISO3	0,39	-0,24	0,42	-0,46	AS	1,16	-0,56	0,15	0,88
TPT	0,25	0,16	0,56	-0,21	CLC	0,12	-0,05	-0,23*	0,11
GPT	0,09	-0,12	-0,12	0,09	Estrés				
FBPasa cit.	0,46	-0,50	0,60*	-0,71**	HSP90.1-A1	0,58	0,50	0,19	-1,37
NDK cit.	0,08	-0,30	-0,12	-0,68	HSP70	0,95*	0,48	-0,14	-0,73*
UGPasa	0,01	-0,34	0,16	-0,40	Factores de transcripción				
SPS	0,12	-0,79	-0,76	-0,99*	MYB13-1	-0,46	-0,69	-0,34	-0,50
SPP	0,18	-0,42	0,27	-0,17	Dof1	0,15	-0,67	-0,48	-0,82*
SUS	0,74	0,35	0,00	0,57	NF-YB3	-0,40	0,07	-0,19	-0,13
Alnv	0,31	-0,17	0,24	-0,46*					

Tabla 4.1.8b. Heat map del nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻) en la antesis y el inicio del llenado de grano. Los datos se muestran en log₂. Los genes inducidos o reprimidos varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente, según la escala de color. *, P<0,05; **, P<0,001 (n=3). Las abreviaturas de los transcritos se detallan en la Tabla 4.1.7.2a.



	Antesis		Inicio llenado grano		Antesis		Inicio llenado grano		
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	
Síntesis y degradación de carbohidratos					Asimilación de nitrógeno				
AGPasa sub. gr.	-1,60*	0,92	-1,12*	0,08	NRT1.2	0,06	0,97	1,09	1,04*
AGPasa sub. peq.	-0,84*	0,27	-0,57*	-0,13	NRT1.3A	-0,92*	0,89*	0,31	0,44
SSI	-0,18	0,22	-0,62	0,39	NRT1.5B	-0,16	-0,93	-0,09	-0,12
SPS	-0,44	-0,29	-1,31*	-2,30	NRT1.7B	3,38*	-0,61	0,15	-0,61
Alnv	0,18	-0,45	-0,03	0,06	NRT2.1	0,06	0,96	0,03	-2,70*
1-SST	-0,46	0,19	-0,72	-1,31*	NRT2.2	0,05	0,21	-0,17	-1,97*
6-SFT	0,17	0,69	-1,54	-1,56	NRT2.3	0,18	0,18*	0,19	-1,58*
1-FFT A	-0,02	0,43	-0,48	-0,92	NAR2.1	-0,34	-0,06	0,20*	-0,16
1-FFT B	-0,10	0,53	-0,46	-1,62	NAR2.2	-0,26	0,10	0,43	-1,11*
Glicólisis					NADH-NR				
HXK	0,28	-0,42	-1,58*	-1,59*	MoCo	-0,04	0,05	0,12	0,20
PK	0,32	-0,26*	-0,53	-0,31*	NiR	-0,25	0,26	-0,31	-1,74*
Ciclo de los ácidos tricarbónicos					GS1a				
CS mit.	-0,13*	0,08	-0,04	-0,20	NADH-GOGAT	-0,45	-0,16	1,28	-0,85*
OGDC sub. E1	-0,03	-0,26*	-0,64*	-0,45	Fd-GOGAT	0,02	-0,21	0,42	-0,30
Asimilación de nitrógeno					GDH				
AMT1;1	-0,04	0,16	0,52	-0,59	AS	0,14	-0,82*	-0,70*	-1,41*
AMT1;2	-0,09	0,77*	-0,13	-0,54		0,34	-0,80	-1,38	0,07
AMT2;1	0,06	-0,13	-0,67	-0,89	Factores de transcripción				
NRT1.1A	0,02	1,05	0,20	-0,68	Dof1	-1,28*	-0,35	-0,05	-2,37*
NRT1.1B	-0,88*	0,79**	0,52	-1,36	AGL1	0,17	0,04	0,11	-0,23
					WM30	-0,73*	0,78	-0,61	-0,39

4.1.9. Integración de los resultados de metabolitos, transcritos y proteína Rubisco

El crecimiento de las plantas, la acumulación de biomasa y la adaptación al ambiente son, en última instancia, el resultado de la interacción entre el metabolismo y los programas de desarrollo de células y órganos, que son atributos complejos controlados por múltiples genes. Los cambios en el nivel de expresión génica y de los intermediarios de las rutas de asimilación del C y N y la fotosíntesis podrían relacionarse con la respuesta global de la planta al ambiente. Por ello, la adopción de una aproximación integrada como la biología de sistemas permitiría establecer la correlación entre los parámetros y las rutas metabólicas y la interrelación entre ellas, lo que facilitaría la identificación de posibles correlaciones y la obtención de conocimientos sobre los mecanismos regulatorios implicados en la respuesta de las plantas al crecimiento prolongado en CO₂ elevado en función de la disponibilidad de N en el medio radicular.

En este estudio, se ha realizado la integración de los datos del contenido de la proteína Rubisco y de los metabolitos y transcritos del metabolismo del C y N haciendo uso del programa MapMan, que permite la visualización de los resultados por rutas biológicas diseñadas para ello (Figs. 4.1.9a-4.1.9h). A continuación, se muestra el efecto del crecimiento prolongado en CO₂ elevado para cada nivel de N en la hoja bandera y la raíz en los dos estadios de desarrollo investigados. Los datos de metabolitos se representan en círculos, la proteína Rubisco como triángulo y los transcritos como cuadrados, todos ellos expresados como log₂ (tratamiento en CO₂ elevado vs CO₂ ambiente). Los resultados se han descrito independientemente en los apartados anteriores, y su integración conjunta se empleará en el capítulo de Discusión utilizando las siguientes figuras.

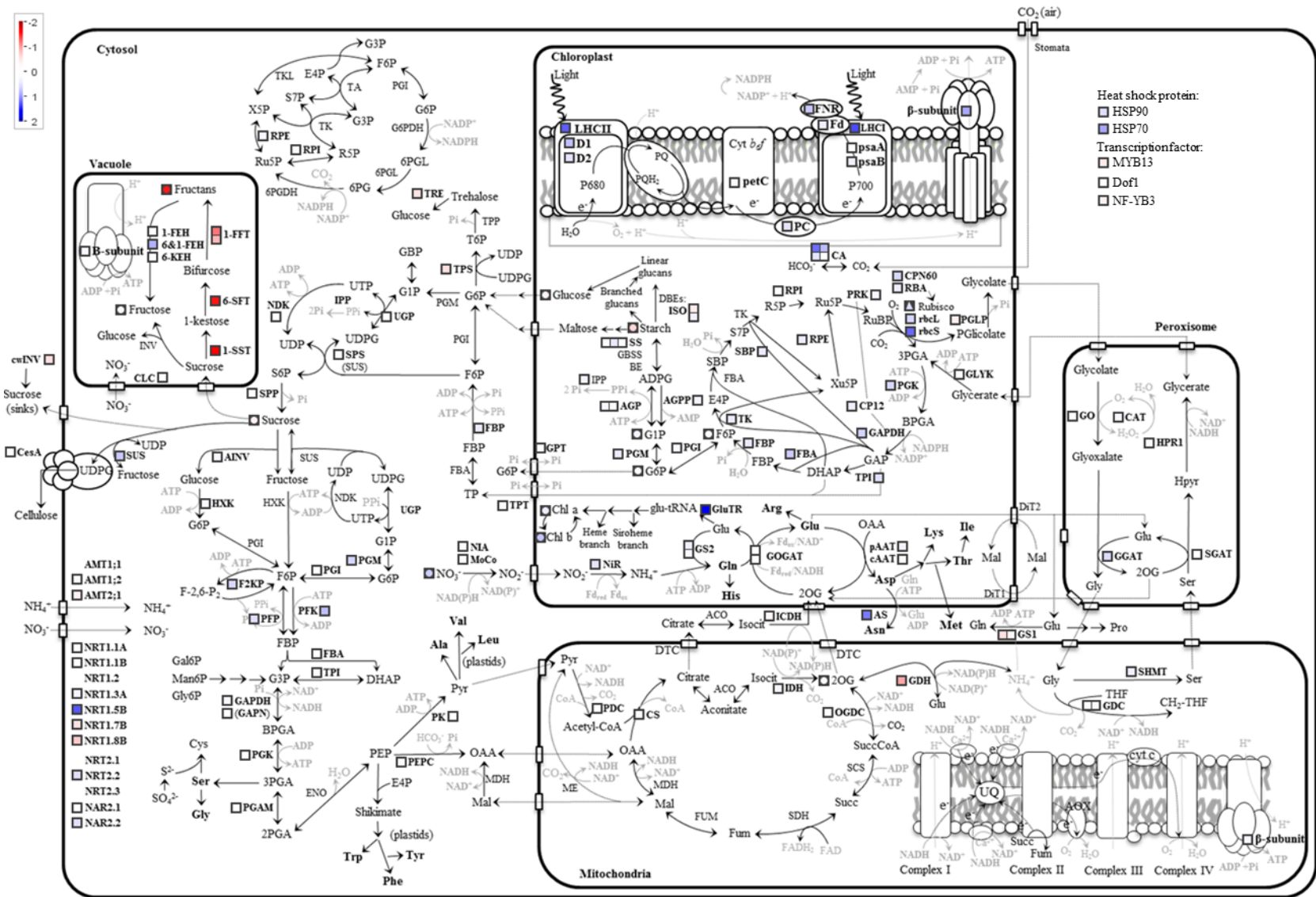


Fig. 4.1.9a. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO_2 (700 vs $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) para un aporte de N bajo ($0,5 \text{ mM NO}_3^-$) en la antesis. Los datos se muestran en \log_2 del tratamiento EL con respecto a AL.

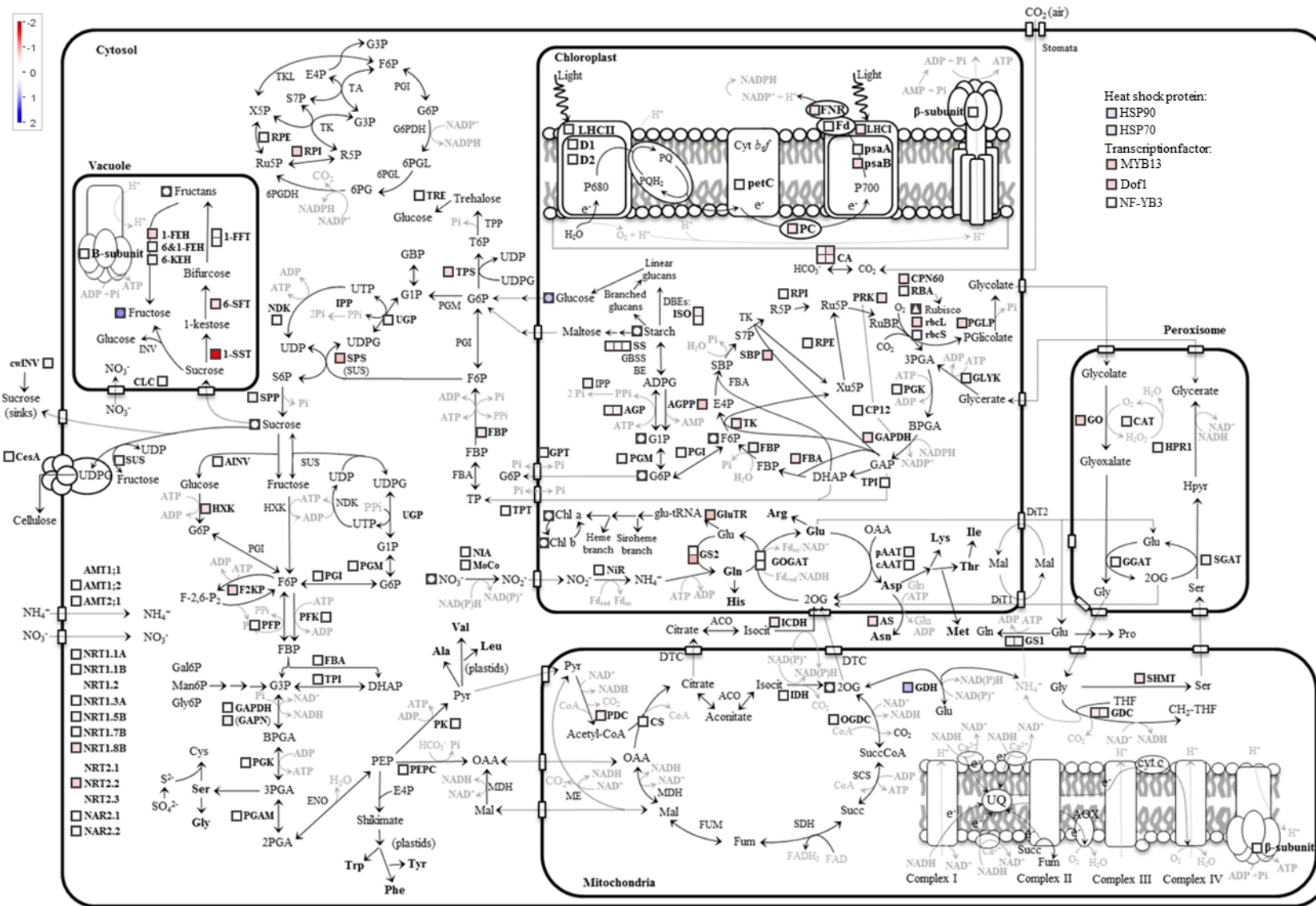


Fig. 4.1.9b. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N alto (5 mM NO₃⁻) en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

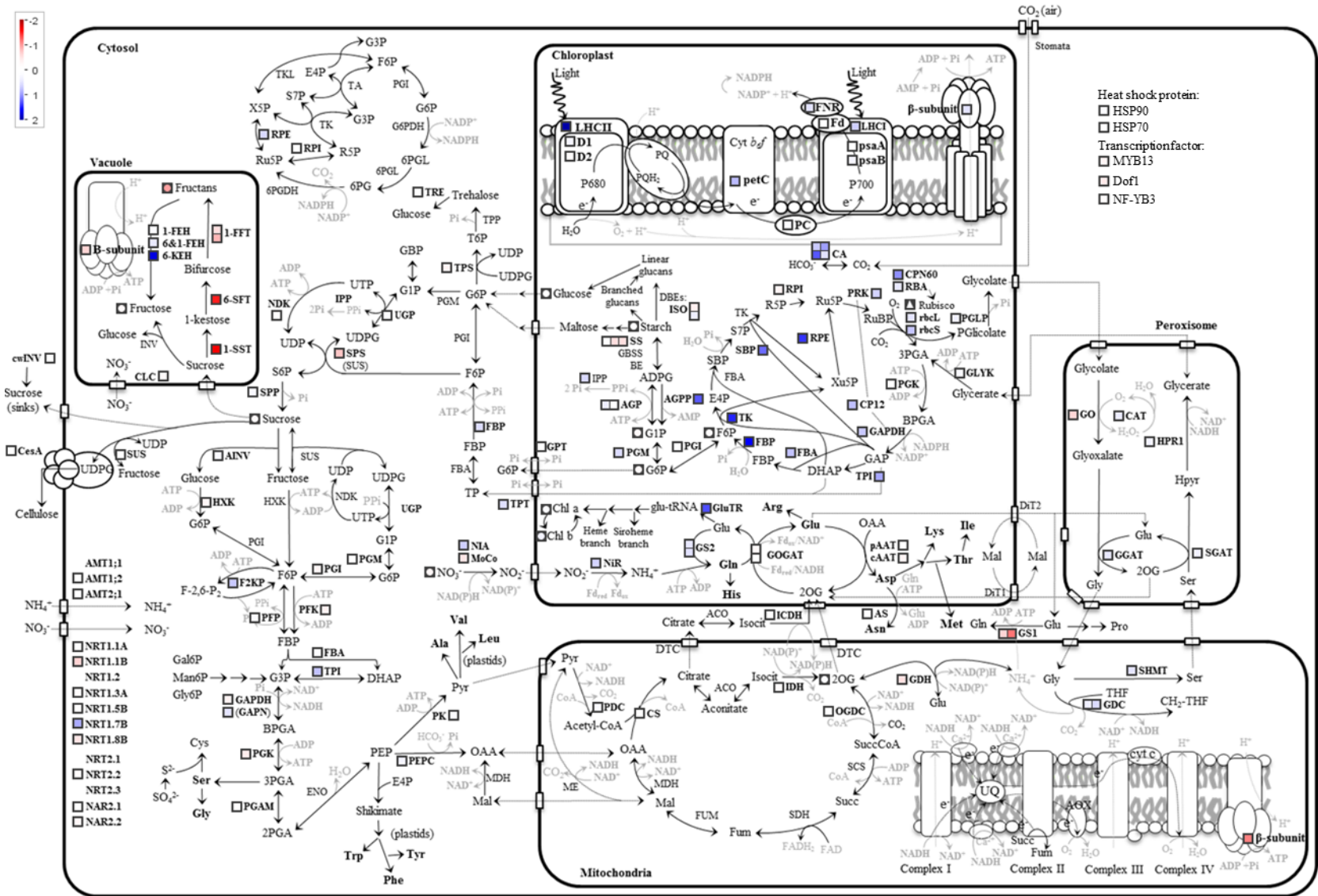


Fig. 4.1.9c. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N bajo (0,5 mM NO₃⁻) en el inicio del llenado del grano. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EL con respecto a AL.

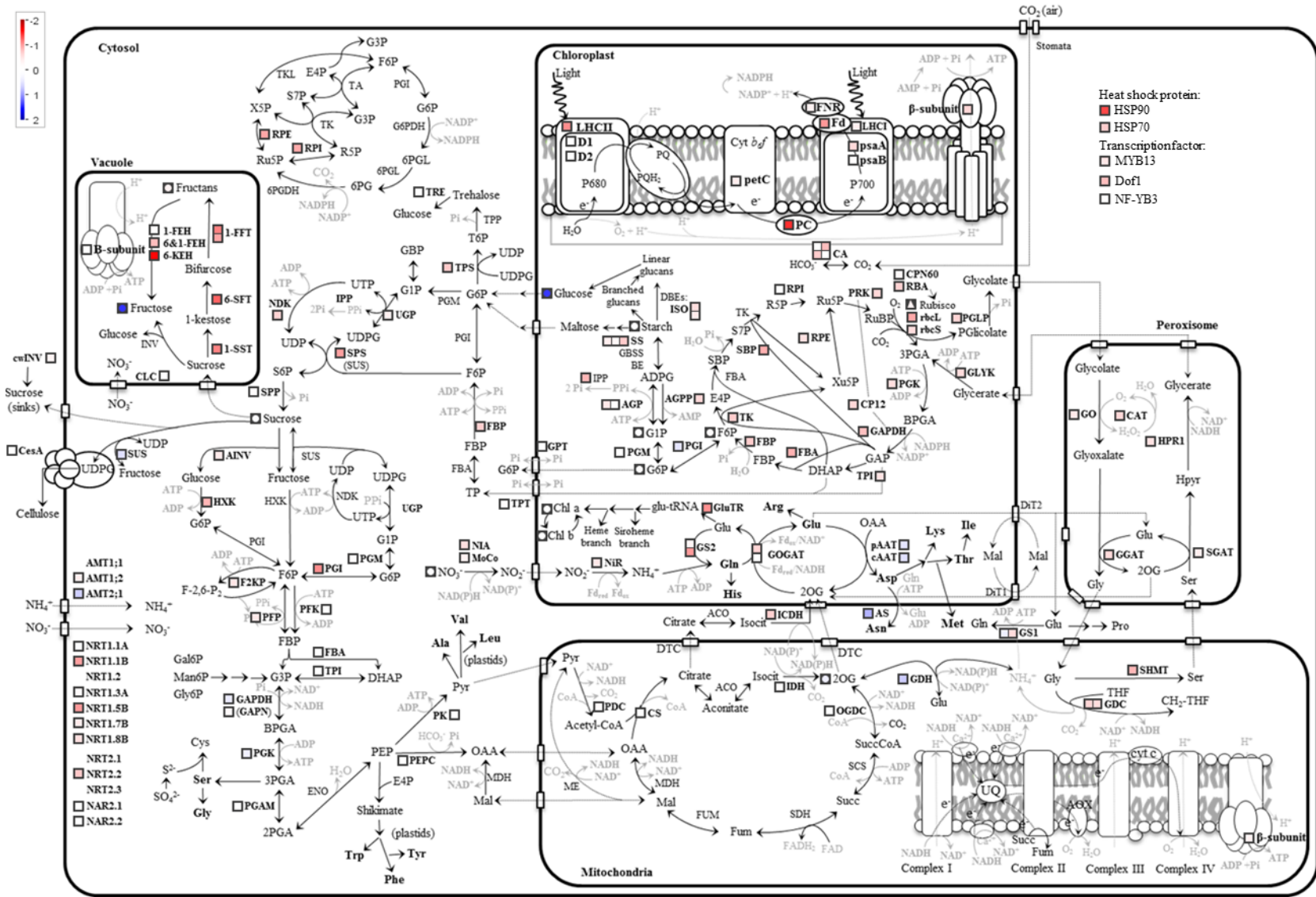


Fig. 4.1.9d. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N alto (5 mM NO₃⁻) en el inicio del llenado del grano. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

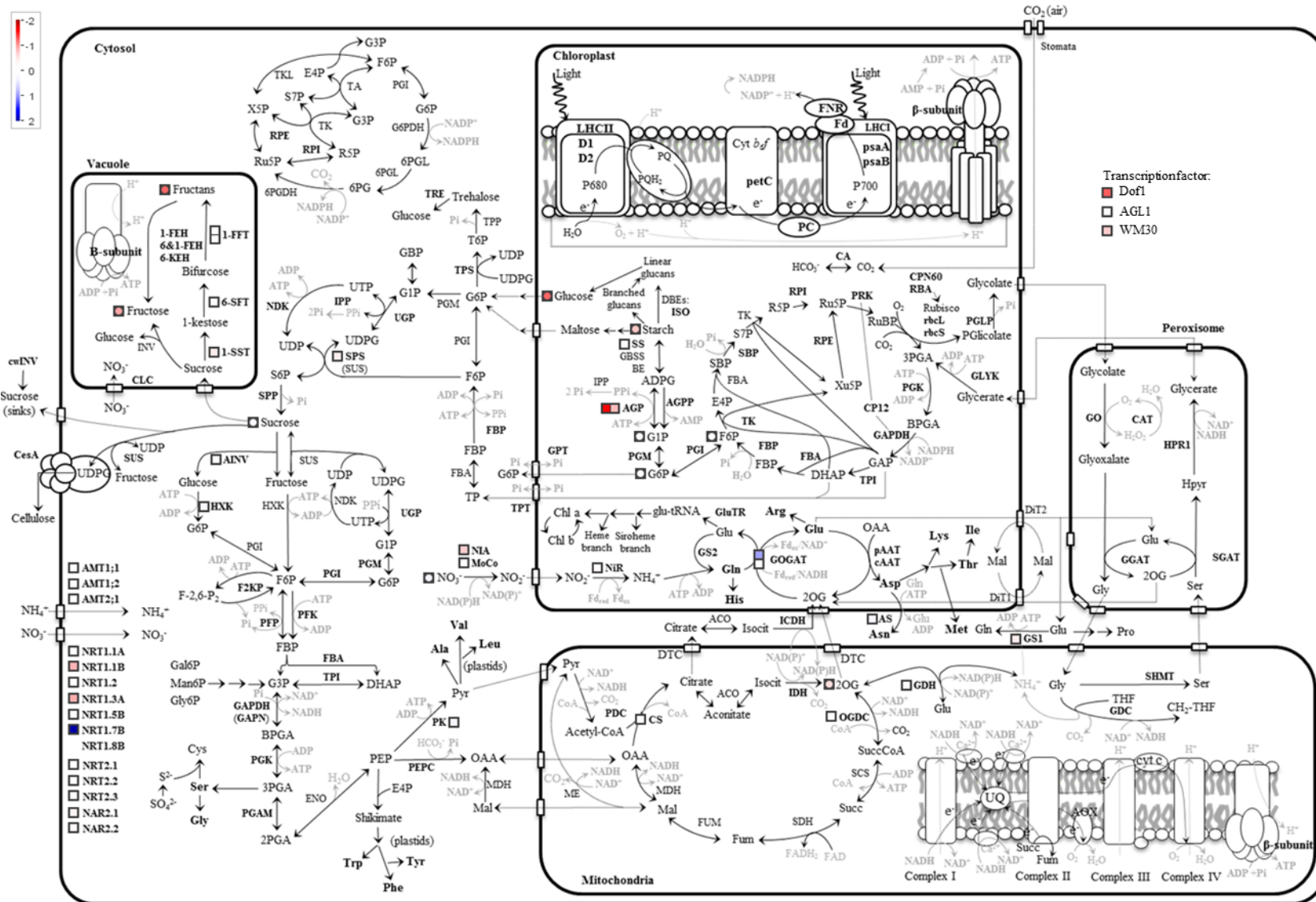


Fig. 4.1.9e. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N bajo (0,5 mM NO₃⁻) en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EL con respecto a AL.

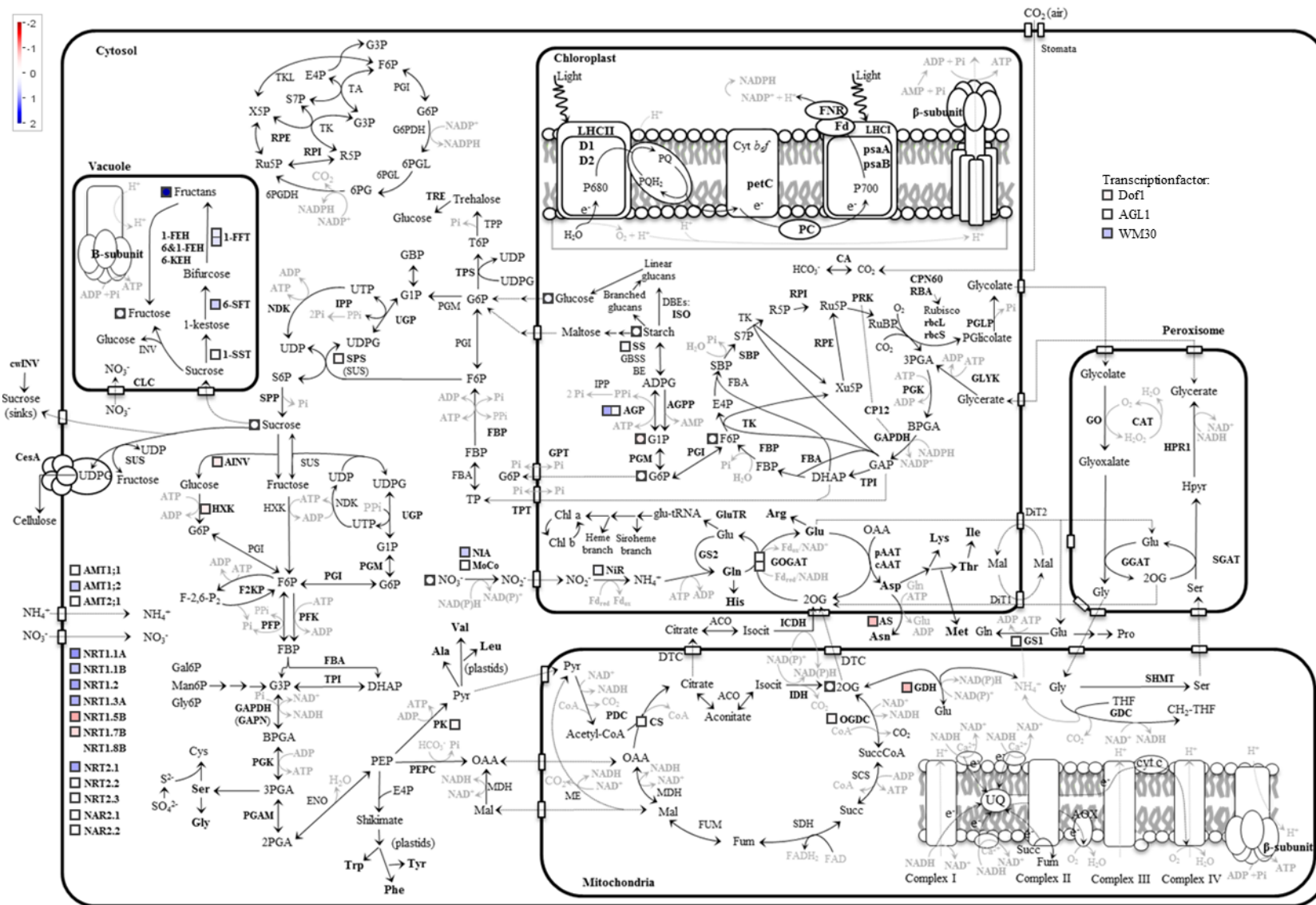


Fig. 4.1.9f. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) para un aporte de N alto (5 mM NO₃⁻) en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

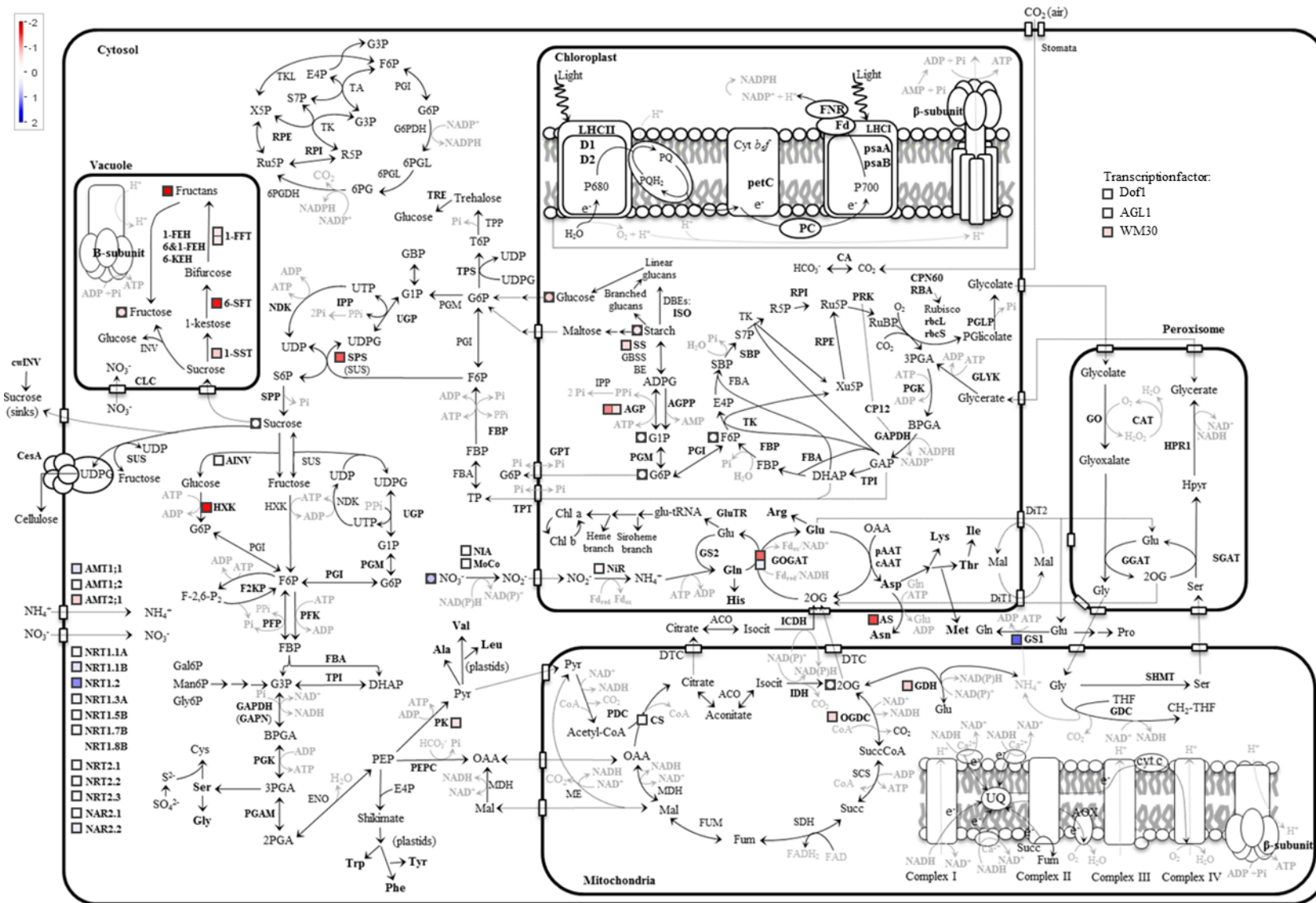


Fig. 4.1.9g. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N bajo (0,5 mM NO₃⁻) en el inicio del llenado del grano. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EL con respecto a AL.

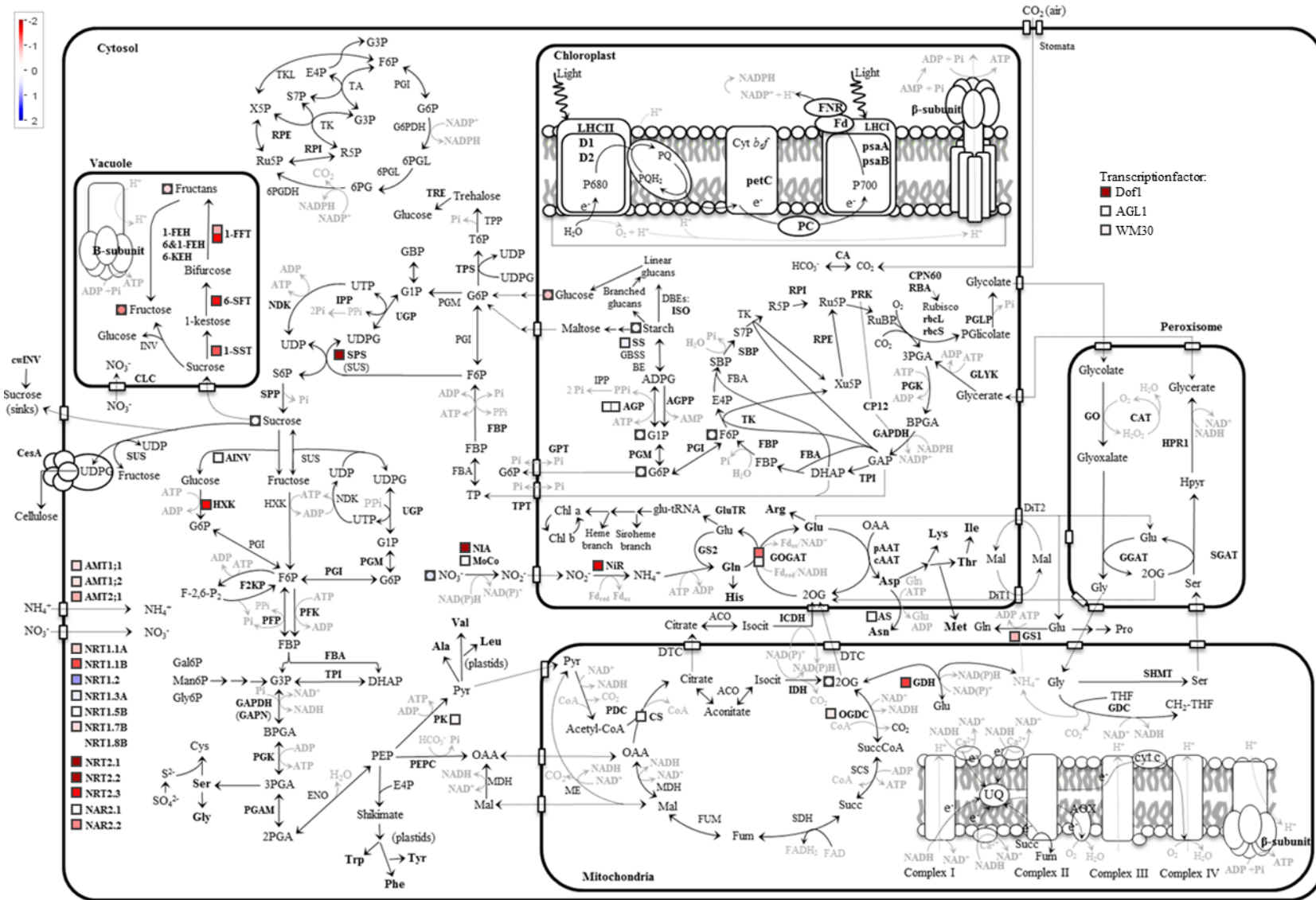


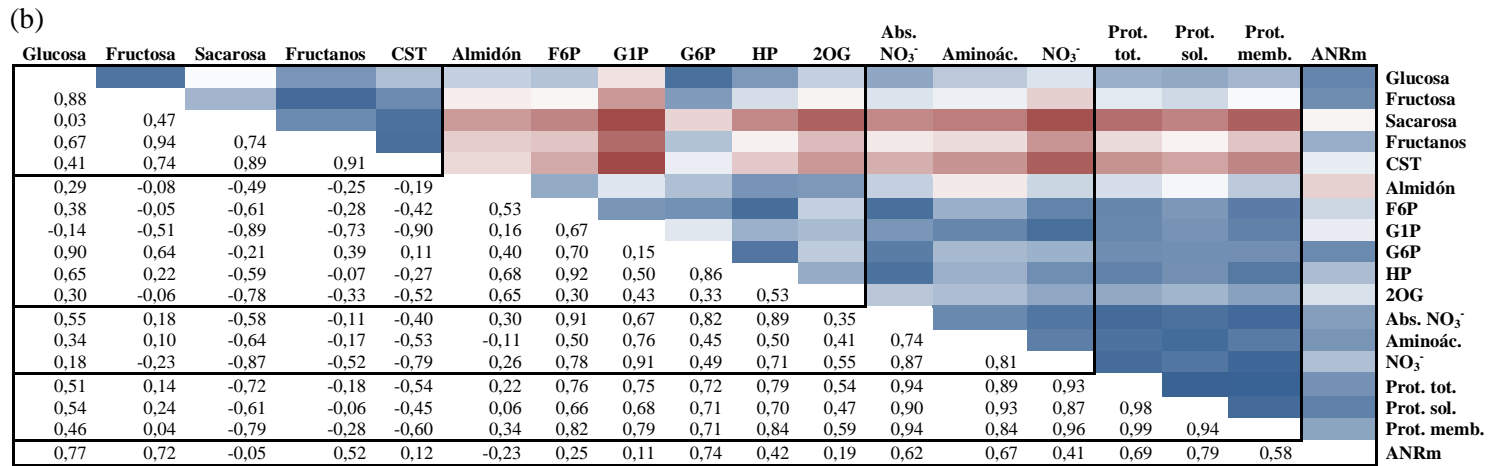
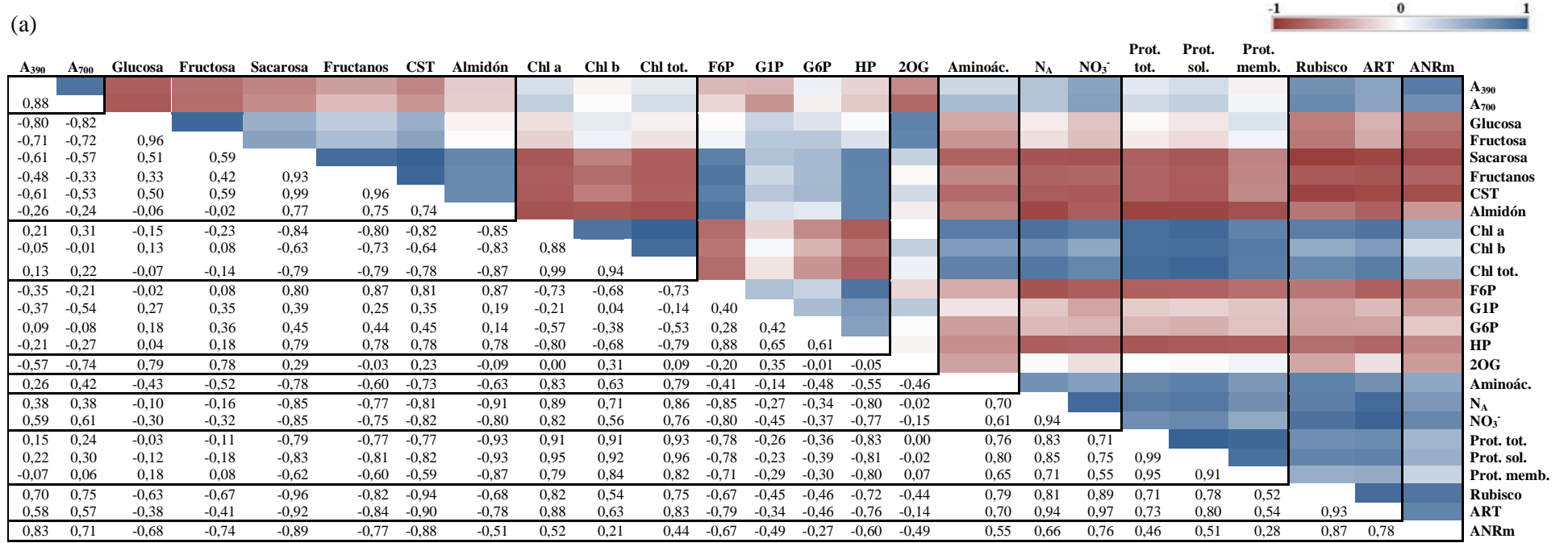
Fig. 4.1.9h. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N alto (5 mM NO₃⁻) en el inicio del llenado del grano. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

4.1.10. Relaciones lineales y redes de correlación entre parámetros

Se realizaron relaciones lineales entre los principales parámetros fisiológicos y bioquímicos analizados en este experimento (Tabla 4.1.10a), que fueron complementadas con una red de correlaciones que incluían los transcritos como se detallará más adelante. En la hoja bandera, se observó una relación lineal positiva entre la fotosíntesis y la cantidad de proteína y actividad Rubisco, y la actividad NR. Mientras que el contenido foliar de carbohidratos solubles totales, sacarosa, fructanos y almidón y, en menor medida, la glucosa y la fructosa tuvieron una relación lineal negativa con la fotosíntesis y los aminoácidos, que fue más acusada con las clorofilas, las proteínas (incluida la Rubisco), las actividades Rubisco y NR, el contenido de NO_3^- y el NO_3^- por superficie foliar (Tabla 4.1.10a). Los parámetros relacionados con el metabolismo del N, tales como las clorofilas, NO_3^- , N por superficie foliar, aminoácidos, proteínas y Rubisco mostraron entre sí buenas relaciones lineales positivas, como muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson. Dichos parámetros también se relacionaron positivamente con las actividades Rubisco y NR. Destaca también la relación lineal positiva de la F6P y el total de HPs con los carbohidratos, exceptuando la glucosa y la fructosa, y la relación negativa con los compuestos nitrogenados.

En la raíz, el contenido de glucosa y fructosa se correlacionó positivamente con el contenido de fructanos, G6P y la actividad NR. La sacarosa y el total de carbohidratos solubles se correlacionaron negativamente con el contenido de G1P, 2-oxoglutarato, aminoácidos, NO_3^- , proteínas y la absorción de NO_3^- . Un mayor contenido de F6P, G1P, G6P y del total de HPs se correlacionó con una mayor absorción de NO_3^- por la raíz, un mayor contenido de NO_3^- , aminoácidos y proteínas. La absorción de NO_3^- , el contenido de aminoácidos, NO_3^- , proteínas y la actividad NR se correlacionaron positivamente entre ellos (Tabla 4.1.10a).

Tabla 4.1.10a. Relaciones lineales entre parámetros analizados en (a) la hoja bandera y (b) la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO₃⁻). Los datos representan el valor medio en log₂ de cada parámetro para cada tratamiento con respecto al control (tratamiento AH). En la parte inferior se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson para cada relación lineal y, en la superior, el heat map correspondiente para dichos valores.



Se construyeron redes de correlación para estudiar las relaciones lineales entre todos los parámetros analizados, incluyendo los datos de expresión génica. A tal fin, se generaron inicialmente las matrices de correlación para todos los parámetros medidos en hoja y en raíz (Fig. 4.1.10a). En la hoja se consideraron 168 parámetros, a partir de los cuales se generaron 14.028 correlaciones, y en la raíz fueron 64 parámetros y 2.016 correlaciones. A continuación, se calculó el valor de P para cada coeficiente de correlación de cada par de parámetros (t de Student). Para no saturar las redes y mostrar las relaciones con mayor probabilidad de veracidad, se filtraron aquellas altamente significativas, es decir, las que presentaron un coeficiente de correlación de Pearson mayor a 0,9 para las relaciones positivas y $-0,9$ para las negativas con un valor de P menor a 0,01. De este modo, 590 relaciones positivas y 71 negativas fueron seleccionadas para los parámetros medidos en hoja, y 48 positivas y 31 negativas para la raíz. La visualización de estas relaciones significativas en redes de correlaciones se realizó con el programa Cytoscape (Fig. 4.1.10b).

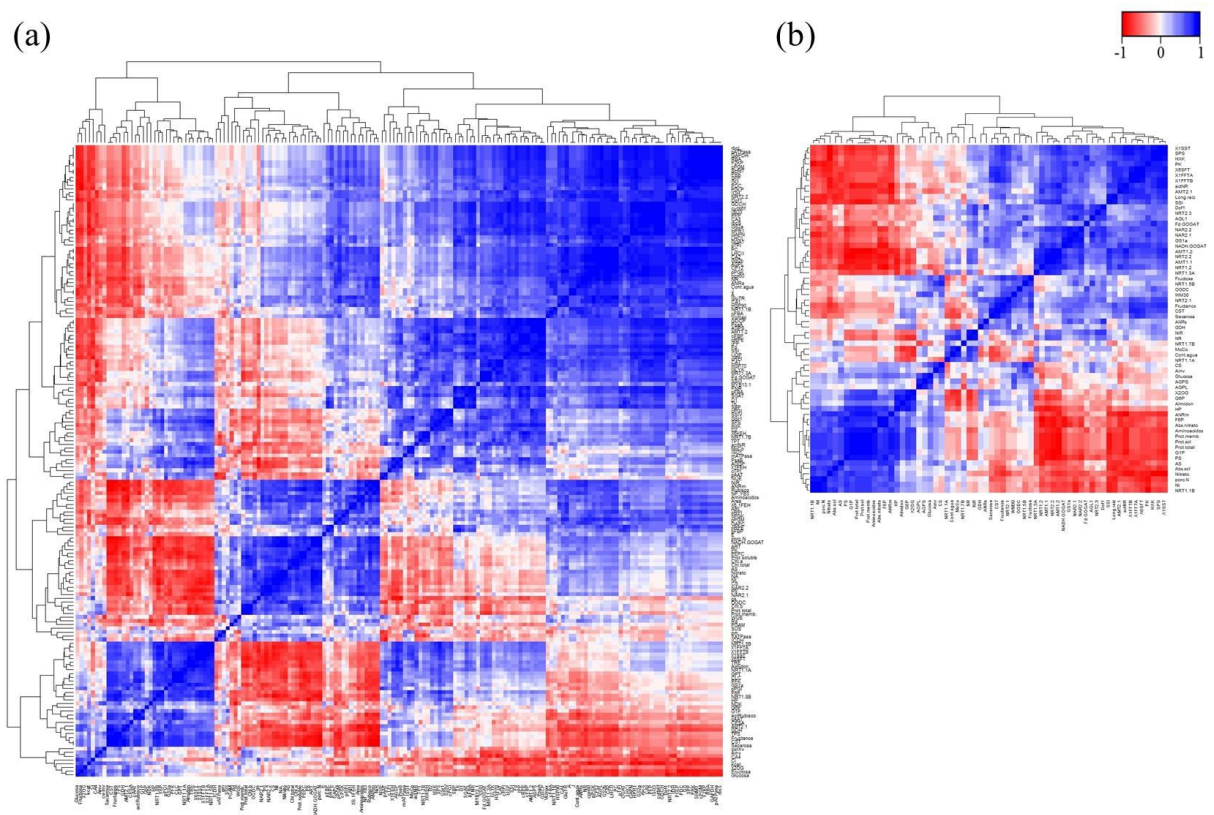


Fig. 4.1.10a. Heat map con clusters de la matriz de correlación de los parámetros analizados en (a) la hoja bandera y (b) la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). El coeficiente de Pearson se calculó para cada posible relación, utilizando los valores promedios de cada tratamiento en cada muestreo. Valores próximos a 1 o -1 denotan correlaciones positivas o negativas, respectivamente. La matriz de correlación y el heat map se generó en R, utilizando el interfaz RStudio.

La red de correlaciones permitió la visualización de dos grupos de parámetros relacionados entre sí en la hoja (Fig. 4.1.10b). En un grupo se relacionaron positivamente entre sí ciertos parámetros fisiológicos (N por superficie foliar, NO_3^- , proteínas, clorofilas, ART, Rubisco, aminoácidos, etc.) y genes del metabolismo del N (AS, NRTs, NARs), los cuales a su vez se relacionaron negativamente con los CST, el almidón, la sacarosa, los fructanos y las HPs. En el otro grupo, se relacionaron positivamente entre sí un amplio grupo de genes involucrados en la CTEF, la fotorrespiración, el ciclo de Calvin-Benson y la asimilación de N, junto a algún otro factor como A, J, y ANRs. Destacaron tres

parámetros que se relacionaron negativamente con un amplio número de parámetros de este grupo, como fueron la fructosa, la glucosa y la eficiencia catalítica de la Rubisco. En la raíz, fueron interesantes las relaciones negativas encontradas entre una serie de genes de la síntesis de carbohidratos con el contenido de NO_3^- , y las relaciones positivas entre el contenido de HPs y el 2-oxoglutarato, entre genes del metabolismo del N, entre la ANRm y el contenido de proteínas y entre éstas con el peso seco de la raíz (Fig. 4.1.10b). Asimismo, cabría destacar las relaciones negativas observadas entre algunos transportadores de NH_4^+ y NO_3^- con parámetros como el peso seco, el contenido de aminoácidos y la absorción de NO_3^- .

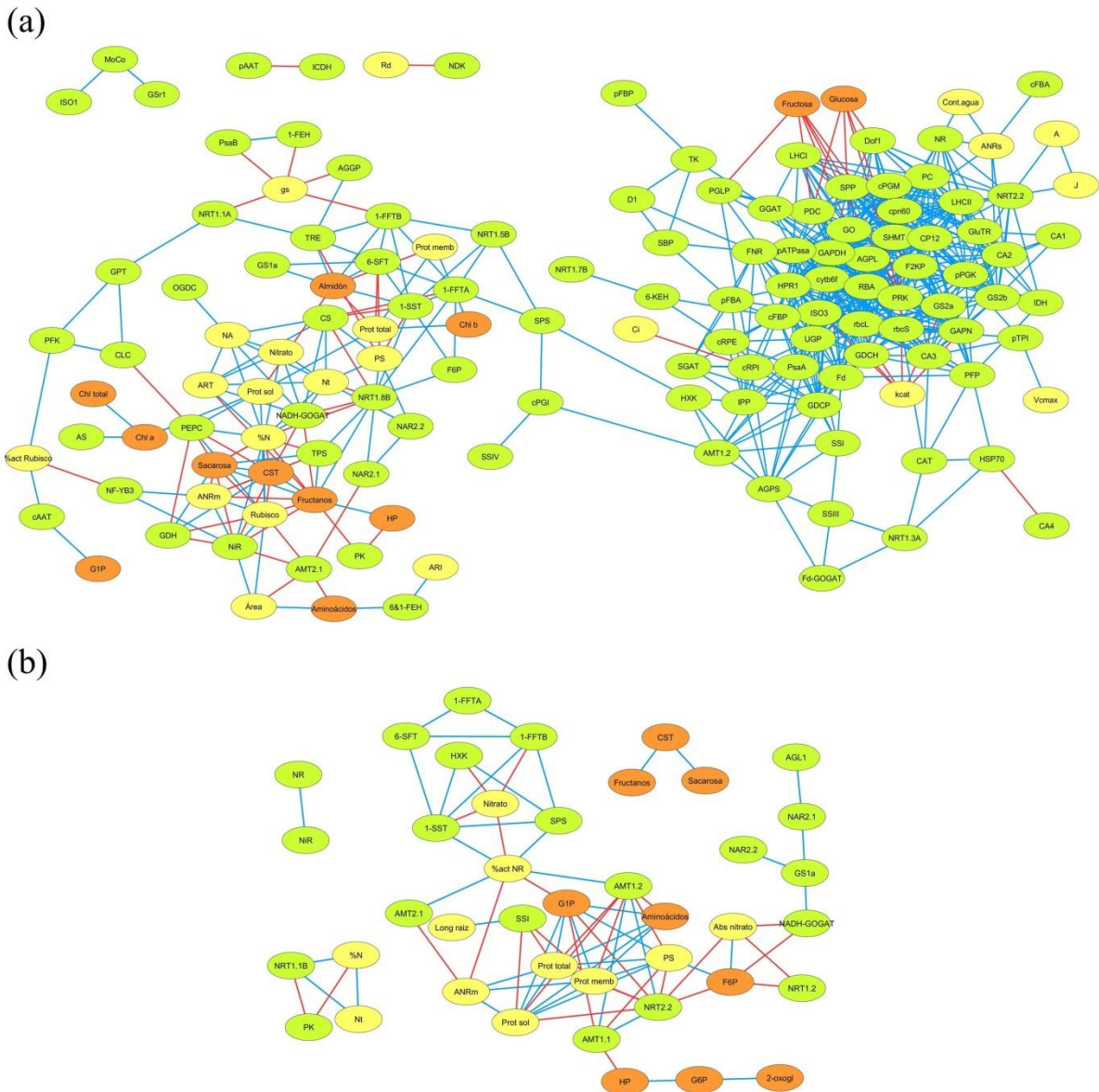


Fig. 4.1.10b. Red de correlaciones significativas entre los parámetros analizados en (a) la hoja bandera y (b) la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta a CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,5; H, 5 mM NO_3^-). Las correlaciones entre todos los parámetros se calcularon con el coeficiente de correlación de Pearson utilizando R. 661 correlaciones significativas en hoja y 79 en raíz ($0 \leq P < 0,01$ y $R > 0,9$ para las interacciones positivas; y $0 > P > 0,01$ y $R < -0,9$ para las negativas) fueron importadas a Cytoscape para la visualización de la red. Los transcritos se presentan en color verde, los metabolitos en naranja y el resto de parámetros en amarillo. Las correlaciones positivas se indican en azul y las negativas en rojo.

4.2. Discusión del experimento 1

Optimización de una plataforma de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro

El análisis de expresión génica es un factor clave en la comprensión del efecto de los factores ambientales en los procesos biológicos. A diferencia del trigo blando, no se dispone de un microarray de ADN para el estudio del transcriptoma en trigo duro debido a la escasez de secuencias en bases de datos públicas. No obstante, la técnica de la qRT-PCR es, al menos, 100 veces más sensible que los microarrays de ADN en la detección de transcritos (Czechowski *et al.*, 2004), aunque requiere de la previa identificación de las secuencias diana para diseñar los primers necesarios para la amplificación. Por ello, la optimización de una plataforma para estudios de expresión génica por qRT-PCR que incluya un importante grupo de genes del metabolismo del C y N es de utilidad en la comprensión de la alteración en el balance C-N observado en plantas que crecen en una atmósfera enriquecida en CO₂.

La selección de los genes candidatos que se incorporaron a la plataforma se realizó en base a estudios previos, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.2.8). Para los genes candidatos seleccionados se identificaron un número importante de secuencias utilizando las bases de datos disponibles para el trigo, mientras que un grupo de 32 genes fueron identificados por homología con genes anotados en otras especies vegetales en TaGI. De los 32 genes ortólogos, 14 fueron identificados utilizando genes de *Arabidopsis thaliana* y los 18 restantes a partir de otras monocotiledóneas, en concreto, *Oryza sativa* (12 genes), *Hordeum vulgare* (tres genes) y *Brachypodium distachyon* (tres genes). Para las 131 secuencias de genes del metabolismo del C y N identificadas, 125 para hojas y 38 para raíces, se diseñaron primers específicos (Tabla 4.1.7.2a, Anexo 3A), los cuales se validaron *in silico* y experimentalmente con trigo duro cv. Regallo (Vicente *et al.*, 2015b). La eficiencia y especificidad de todos los primers se confirmó por la presencia de un único amplicón del tamaño esperado por electroforesis en geles de agarosa de los productos de la qRT-PCR, y por las curvas de disociación con un único pico. La validación de los primers en trigo duro, aun cuando se utilizaron mayoritariamente secuencias de trigo blando, demostró la similitud entre ambos tipos de trigo, debido a que comparten los mismos ancestros y a que las regiones codificantes de los genomas A, B y D presentan una elevada similitud, de alrededor el 97% (Dvorak *et al.*, 2006). Se realizó un análisis más riguroso secuenciando 15 productos de la qRT-PCR, cuyos cromatogramas indicaron que existía una homología del 99% entre las secuencias del trigo blando y duro (Tabla 4.1.7.2b, Anexo 4), corroborando así la semejanza descrita anteriormente. A pesar de las diferencias en los genomas, el 62% de los pares de primers diseñados para trigo blando funcionaron en trigo duro (139/225), lo cual pone de manifiesto que el trigo blando puede usarse en la identificación y validación de primers en trigo duro. Si bien, se necesitó diseñar más primers de los previstos debido a la presencia de SNPs entre ambos genotipos que dificultaron el funcionamiento de éstos. Es importante señalar que el trigo, al ser una especie alopoliploide, sería esperable la presencia de varios genes homólogos para genes presentes en una sola copia en especies diploides (Sharma *et al.*, 2010). Por ello, en los casos en que existían genes homólogos en las bases de datos para trigo, los primers se diseñaron con el programa Primique, que permite el diseño en aquellas regiones donde aparecen SNPs entre genes homólogos (Fredslund & Lange, 2007). Cuando se desconocía la existencia de los genes homólogos, la validación de los primers fue únicamente experimental.

Validación de genes de referencia en trigo duro para la correcta normalización de los resultados de qRT-PCR en diferentes condiciones experimentales

La cuantificación de los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR requiere de la correcta normalización de los resultados usando genes de referencia con una expresión estable a lo largo del desarrollo, en diferentes tejidos y condiciones experimentales (Hruz *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012). Algunos de los genes de referencia más frecuentemente utilizados para la qRT-PCR son el ARN ribosomal 18S o 26S, la actina, la tubulina, la β -glucuronidasa y la GAPDH, entre otros (Paolacci *et al.*, 2009; Hruz *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha comprobado que su expresión no siempre es estable (Czechowski *et al.*, 2005), lo que puede comprometer los resultados de expresión obtenidos. Así, Gutierrez *et al.* (2008) mostraron que la expresión de 14 de los genes de referencia más comúnmente utilizados para la normalización de los datos de qRT-PCR en *Arabidopsis* no se mantuvo estable en los diferentes tejidos evaluados.

Estudios recientes han propuesto genes de referencia mucho más estables y efectivos para la normalización de datos en trigo blando. Paolacci *et al.* (2009) analizaron la estabilidad de la expresión de 32 genes usando ADNc de 24 muestras vegetales de diferentes tejidos, estadios de desarrollo y temperaturas de crecimiento en *T. aestivum* cv. Chinese Spring por qRT-PCR. Los genes seleccionados incluían 12 housekeeping conocidos que representaban distintas clases funcionales, junto a 20 nuevos genes identificados *in silico* en las bases de datos Unigene y TIGR. Tres de los nuevos genes de referencia fueron más estables y efectivos que los genes convencionales habitualmente utilizados en la normalización de los resultados de expresión en trigo, en concreto, *CDC* (Ta54227), *ADP-RF* (Ta2291) y *RLI* (Ta2776). Posteriormente, Long *et al.* (2010) seleccionaron 32 genes de referencia candidatos al analizar 333 arrays de 9 experimentos de trigo blando que incluían una amplia variedad de condiciones experimentales (temperatura, sequía, patógenos, salinidad y distintas concentraciones de aluminio y abonado), tejidos y estadios de desarrollo. Su estabilidad en la expresión se evaluó también en *T. aestivum* cv. Chinese Spring y permitió la identificación de 15 nuevos genes de referencia. Giménez *et al.* (2011) estudiaron la expresión de tres de los genes de referencia clásicos junto a otros tres de los propuestos por Paolacci *et al.* (2009), utilizando la hoja de 11 especies vegetales pertenecientes a la tribu Triticeae. Concluyeron que los seis genes pueden ser utilizados para la normalización de los datos de la qRT-PCR, aunque los genes *CDC* y *RLI* mostraron una mayor estabilidad en la expresión. Investigaciones posteriores han continuado con la identificación de genes de referencia apropiados y establemente expresados en trigo blando (Tenea *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012). Todos estos estudios han enfatizado en la importancia de utilizar genes de referencia con expresión estable y han identificado nuevos genes que cumplen dicho requisito para el trigo blando. Sin embargo, existe una importante carencia de genes de referencia validados para el trigo duro durante el desarrollo y bajo un amplio rango de condiciones experimentales.

En el presente trabajo de investigación se ha evaluado la estabilidad de siete de los genes de referencia candidatos propuestos por Paolacci *et al.* (2009) en muestras foliares correspondientes a la hoja bandera de tres experimentos con trigo duro cultivado en hidroponía y en el campo con diferente disponibilidad de N, temperatura, horas del día, concentraciones atmosféricas de CO₂ y fases del desarrollo, y en muestras radicales de los cultivos hidropónicos (Tabla 4.1.7.1a, Fig. 4.1.7.1a). Además, se examinó la variabilidad en la intensidad de señal observada para estos genes en 1.532 arrays de trigo blando depositados en la base de datos RefGenes de Genevestigator. Dicho estudio mostró que dos de los genes más frecuentemente usados, la actina y α -tubulina, tuvieron la expresión menos estable, lo cual puede comprometer los análisis de expresión génica. El gen *ADP-RF* mostró

una fuerte estabilidad en la expresión y se seleccionó como el más apropiado para la correcta normalización de los datos de expresión por qRT-PCR en nuestros estudios con trigo duro cultivado en hidroponía y en el campo en cámaras de gradiente de temperatura (Vicente *et al.*, 2015b), en conformidad con Paolacci *et al.* (2009). Sin embargo, otros genes establemente expresados, como los que codifican el RLI y la ubiquitina, podrían también ser utilizados y asegurarían una correcta normalización de los datos de la qRT-PCR. Por tanto, estos resultados resaltan la importancia de la validación previa de los genes de referencia en diferentes tejidos, etapas del desarrollo de las plantas y un amplio abanico de condiciones experimentales. A su vez, podrían orientar y guiar la selección de genes de referencia para estudios de expresión génica con trigo duro.

La disponibilidad de nitrógeno influyó notablemente en el crecimiento y en la absorción y distribución del nitrógeno en las plantas de trigo

La disponibilidad de N afecta a todas las funciones de la planta, desde el metabolismo a la distribución de los recursos, el crecimiento y el desarrollo (Stitt *et al.*, 2002; Scheible *et al.*, 2004). El N constituye una parte importante de la materia seca total de la planta (Hawkesford *et al.*, 2012) y se considera el nutriente más limitante para la adquisición del C (Schulze *et al.*, 1994). En nuestro experimento, la abundancia de N en la solución nutritiva aumentó el número de tallos hijos y de espigas por planta, además del área verde y la materia seca de las plantas de trigo (Tablas 4.1.1.1a, 4.1.1.3a y 4.1.1.5a), lo cual es consistente con estudios previos que muestran un gran impacto de este nutriente en el crecimiento de las gramíneas (Hawkesford *et al.*, 2012) y, en particular, del trigo (Pearman *et al.*, 1978; Oscarson, 2000; Pal *et al.*, 2005; Del Pozo *et al.*, 2007). El gran descenso de biomasa que se produjo en plantas con un aporte de N bajo, con respecto a aquellas con N abundante, demuestra que el N fue un factor limitante para el crecimiento. El aumento de biomasa al incrementar la disponibilidad de N en nuestro experimento fue similar al de otros estudios previos, en los que se observaron incrementos de entre 1,8-3,0 veces con un mayor suministro de N (Thorne, 1974; Oscarson, 2000). La abundancia de N indujo un mayor crecimiento de la parte aérea de la planta que de la raíz, como indica el aumento de la razón parte aérea:raíz en función del peso seco (Tabla 4.1.1.1a). Resultado que confirma que la abundancia de N inhibe el desarrollo de la raíz con relación a la parte aérea, respuesta que parece ser desencadenada por la acumulación de NO_3^- en la parte aérea de la planta (Scheible *et al.*, 1997c). Un incremento de esta razón se ha observado en otras especies vegetales como *Dactylis glomerata* (Harmens *et al.*, 2000) y *Arabidopsis* (Scheible *et al.*, 2004; Takatani *et al.*, 2014). Sin embargo, la longitud de la raíz aumentó a la vez que disminuyó su peso seco en plantas con un aporte subóptimo de N (Tabla 4.1.1.5a). De acuerdo con el papel determinante del N en la morfología y arquitectura de la raíz (Zhang & Forde, 1998), una mayor elongación de la raíz primaria y de las raíces laterales en plantas deficientes en N permite aumentar la eficiencia del sistema radicular en la absorción de nutrientes (Zhang *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2008).

La absorción de NO_3^- por unidad de masa de raíz y el contenido de N en la planta y sus fracciones aumentó notablemente en respuesta a la disponibilidad de N (Tablas 4.1.2a y 4.1.3.2a). Asimismo, el aporte de N alteró la distribución de N en la planta, con una menor adscripción de N a la raíz en favor de la parte aérea (Tabla 4.1.3.3a), de acuerdo con Pérez *et al.* (1983). A pesar del cambio en la distribución del N, la concentración de N en cada una de las fracciones de la planta y en el total de la misma aumentó en plantas con N abundante con respecto a aquellas deficientes en dicho nutriente (Tabla 4.1.3.1a), lo que implica que hubo un mayor aumento de N que de materia seca. Esta capacidad de las plantas con abundancia de N de aumentar la concentración de N cuando aumentó el peso seco,

pudo aliviar la limitación de N debida a la aceleración del crecimiento y desarrollo en CO₂ elevado (Coleman *et al.*, 1993), como discutiremos a continuación.

El incremento de la fotosíntesis en plantas crecidas en CO₂ elevado no condujo a una mayor acumulación de biomasa

El crecimiento de las plantas, la acumulación de biomasa y la adaptación al ambiente son el resultado de la interacción entre el metabolismo y los programas de desarrollo de las células y órganos (Stitt & Zeeman, 2012). Además, la toma de NO₃⁻ puede ser sensible no sólo al ambiente externo, sino también a señales internas derivadas de la demanda impuesta por el desarrollo de la parte aérea (Crawford & Glass, 1998). Así, resulta sorprendente que, a pesar del aumento de la provisión de C en plantas crecidas a [CO₂] elevadas, en la antesis la acumulación de materia seca (Tabla 4.1.1.1a) y el área verde (Tabla 4.1.1.3a) de la parte aérea de las plantas con N abundante fue menor que en aquellas crecidas a [CO₂] ambientales. Algo similar ocurrió con el área verde del total de los tallos seleccionados de las plantas con un aporte de N bajo, aunque el peso seco no varió significativamente. Cuando las medidas de la asimilación fotosintética del CO₂ se realizaron a sus respectivas [CO₂] de crecimiento, la fotosíntesis fue mayor en plantas crecidas en CO₂ elevado que en ambiente con ambos niveles de N (Tabla 4.1.4a), indicativo de que la inhibición de la fotosíntesis no fue la causa de la pérdida de materia seca. El descenso de biomasa en CO₂ elevado contrasta con el aumento observado en estudios previos con trigo cultivado en el campo o en hidroponía (Rogers *et al.*, 1996; Smart *et al.*, 1998; Bloom *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Aranjuelo *et al.*, 2013; Benlloch-Gonzalez *et al.*, 2014), y en otras plantas C₃ como el tabaco (Matt *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2002), que evidencian una dependencia con la disponibilidad de N (Pal *et al.*, 2005; de Graaff *et al.*, 2006). La mayoría de los estudios realizados en una atmósfera enriquecida en CO₂ muestran que una mayor fotosíntesis por unidad de superficie foliar raramente se acompaña de un aumento en paralelo de la biomasa (Kirschbaum, 2011), y no siempre conduce a un mayor crecimiento (Poorter *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2014). Así, se ha mostrado que la biomasa de distintas plantas herbáceas crecidas durante cuatro años en CO₂ elevado no varió (Allard *et al.*, 2005), al igual que en *Pseudoroegneria spicata* y *Gutierrezia microcephala* (Polley *et al.*, 1999), en trigo duro crecido en el campo hasta la post-antesis (Aranjuelo *et al.*, 2011a) o en variedades de trigo duro con un bajo índice de cosecha (Aranjuelo *et al.*, 2013; Erice *et al.*, 2014). Carlisle *et al.* (2012) también observaron un descenso de biomasa en trigo blando crecido hidropónicamente hasta la senescencia, al igual que Rubio-Asensio *et al.* (2015) en plantas de *Arabidopsis* y trigo blando crecidas en CO₂ elevado durante la noche con NO₃⁻ como única fuente de N. Por lo tanto, que el CO₂ elevado no alterara la biomasa e, incluso, redujera el peso seco de algunas fracciones de la planta, podría ser un hecho generalizado en plantas de trigo cuando crecen hasta estadios avanzados del desarrollo.

En la antesis, el CO₂ elevado condujo a un aumento del peso seco por área foliar únicamente en plantas deficientes en N (Tabla 4.1.1.4a), al igual que en plantas de *Dactylis glomerata* cultivadas con 0,15 y 0,6 mM NO₃⁻, e incluso con mayores concentraciones (Harmens *et al.*, 2000). El CO₂ elevado no tuvo un efecto significativo en el número de tallos hijos y de espigas por planta, ni en la longitud de la raíz (Tabla 4.1.1.5a). Estos resultados contrastan con el aumento del número de tallos observado en plantas de trigo (McMaster *et al.*, 1999) y arroz (Fukayama *et al.*, 2009), y del número de espigas por planta y espiguillas por espiga de trigo (Weigel *et al.*, 1994) en estudios anteriores. La razón parte aérea:raíz tampoco fue modificada por el CO₂ elevado (Tabla 4.1.1.1a), indicativo de que no hubo una mayor adscripción de biomasa a la raíz que pudiera explicar el descenso de materia seca observado en

la parte aérea. La ausencia de cambios en dicha razón con el CO₂ elevado se ha encontrado en trigo (Carlisle *et al.*, 2012) y otros cultivos (Matt *et al.*, 2001; Shimono & Bunce, 2009). Aunque en trigo cultivado en hidroponía con 0,1 y 1 mM NO₃⁻ se ha observado un aumento de dicha razón en estadios tempranos del desarrollo (Smart *et al.*, 1998) y en fases tardías cuando la fuente de N fue el NH₄NO₃ (McMaster *et al.*, 1999), así como en tabaco (Kruse *et al.*, 2002). Desconocemos las razones por las que el CO₂ elevado redujo la acumulación de materia seca en nuestro experimento. Lamentablemente, no medimos los exudados de las raíces, pero existen evidencias de que el crecimiento en CO₂ elevado aumentó la exudación de aminoácidos en plantas de maíz (Phillips *et al.*, 2006), de azúcares y malato en *Phaseolus vulgaris* (Haase *et al.*, 2007), y de aminoácidos, azúcares y otros compuestos orgánicos en plántulas de *Pinus sylvestris* (Johansson *et al.*, 2009), e incrementó el flujo de materia orgánica al suelo en especies herbáceas (Allard *et al.*, 2005). Se ha indicado que en ciertas condiciones de estrés, el eflujo de NO₃⁻ e incluso de NH₄⁺, aminoácidos y otros compuestos orgánicos, puede ser superior a la absorción (Segonzac *et al.*, 2007; Dechorgnat *et al.*, 2011). Por ello, un incremento de los exudados de la raíz puede ser una explicación plausible para el descenso de materia seca en CO₂ elevado en este experimento, que requiere una futura comprobación.

La disponibilidad de nitrógeno y el estadio de desarrollo influyeron en la absorción de nitrógeno y su distribución en la planta en CO₂ elevado

El contenido total de N es una medida directa de la absorción neta de N durante el crecimiento de las plantas (Stitt & Krapp, 1999). En trigo, la mayor parte del N de la planta se absorbe antes de la antesis, y se estima que entre el 60-95% del N del grano proviene de la removilización de reservas almacenadas en tejidos vegetativos con anterioridad a la antesis (Hirel *et al.*, 2007). Por lo que muy posiblemente los cambios que se produzcan en el crecimiento de las plantas por el CO₂ elevado podrían modificar la absorción de NO₃⁻ y su asimilación (Stitt & Krapp, 1999; Kamiji *et al.*, 2014). En nuestro estudio, el contenido de N de las plantas en la antesis podría sugerir que el CO₂ elevado redujo la absorción de N antes de esta fase del desarrollo en plantas con N alto (Tabla 4.1.3.2a). Aunque las pérdidas de N por exudación de la raíz o volatilización (Smart *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2006; Taub & Wang, 2008; Johansson *et al.*, 2009) podrían enturbiar dicha hipótesis. Las medidas de la absorción de NO₃⁻ de la solución nutritiva mostraron que sólo en plantas con un aporte de N bajo y al inicio del llenado del grano, el descenso de materia seca de los tallos seleccionados en CO₂ elevado se asoció con una menor absorción de NO₃⁻ por unidad de peso seco de raíz y por planta (Tabla 4.1.2a) e, incluso, con un descenso próximo a la significación de la fotosíntesis ($P=0,062$; Tabla 4.1.4a). Este resultado indica que la abundancia de N pudo superar las restricciones en la absorción de N causadas por el crecimiento en CO₂ elevado como se había observado previamente (Rogers *et al.*, 1996), en particular, con una nutrición nitrogenada abundante en cultivos hidropónicos (Poorter *et al.*, 1997).

A pesar de que el CO₂ elevado disminuyó la absorción de NO₃⁻ por unidad de masa de raíz en plantas deficientes en N al inicio del llenado del grano, no tuvo efecto en la antesis, aun cuando la biomasa de la planta tendió a disminuir con un enriquecimiento en CO₂ en dicha fase del desarrollo (Tabla 4.1.1.1a). Consecuentemente, el efecto del CO₂ elevado en la absorción de NO₃⁻ no se relacionó con la acumulación de materia seca *per se*, sino que pareció depender del estadio de desarrollo de las plantas, de acuerdo con estudios previos (Makino *et al.*, 1997a; Shimono & Bunce, 2009) que mostraron que la fase de desarrollo y la duración de la exposición al CO₂ elevado afectaron a la capacidad de absorción de N. Así, Shimono & Bunce (2009) observaron que el crecimiento prolongado en una atmósfera enriquecida en CO₂ no tuvo efecto en la absorción de N en fases tempranas del desarrollo del arroz, y

la redujo en la emergencia de la espiga y el llenado del grano; mientras que, a corto plazo, el CO₂ alto aumentó la absorción de N en fases vegetativas y la redujo en las reproductivas. Estos últimos resultados fueron similares a los de otros estudios con arroz (Makino *et al.*, 1997a; Kim *et al.*, 2003).

Las investigaciones sobre los efectos del CO₂ elevado en la capacidad de absorción de NO₃⁻ de las plantas son poco consistentes. Mientras el CO₂ elevado disminuyó la absorción de NO₃⁻ en diferentes especies vegetales en el campo (Jackson & Reynolds, 1996), en arroz (Shimono & Bunce, 2009) y en plántulas de trigo incubadas con altas concentraciones de NO₃⁻ (Lekshmy *et al.*, 2013), también la aumentó en plántulas de trigo incubadas con bajas concentraciones de NO₃⁻ (Lekshmy *et al.*, 2013) y en otras especies vegetales (BassiriRad *et al.*, 2001), o bien no varió en plantas de trigo cultivadas con 0,1 y 1 mM NO₃⁻ (Smart *et al.*, 1998) y en *Sorghum bicolor* (BassiriRad *et al.*, 1999). A pesar de la variabilidad de resultados, nuestro estudio se realizó en condiciones hidropónicas que excluyen el efecto que el descenso de transpiración por el aumento del CO₂ pudiera tener en la limitación de la movilidad de los nutrientes en el entorno de la raíz y su absorción por la planta (McDonald *et al.*, 2002; Del Pozo *et al.*, 2005). Una posible explicación sobre la limitación de la absorción de NO₃⁻ en condiciones de CO₂ elevado contempla que la fracción de raíces finas, más activas y eficientes en la toma de nutrientes y agua, podría haber disminuido en CO₂ elevado en el inicio del llenado del grano y no en la antesis. Si bien, nuestras observaciones no muestran evidencias de que hubiera tenido lugar una aceleración de la senescencia con el CO₂ alto que pudiera avalar dicha apreciación. Se ha propuesto que la reducción de la absorción de NO₃⁻ en CO₂ elevado podría deberse a un descenso de la actividad NR (Pal *et al.*, 2005; Lekshmy *et al.*, 2013) y posterior asimilación del N en compuestos orgánicos nitrogenados en plantas de trigo (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2014), aunque otros estudios con tabaco y *Plantago major* han mostrado un incremento de dicha actividad (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999). En nuestro estudio, la actividad NR no varió significativamente a nivel foliar, pero tendió a aumentar en la raíz ($P=0,057$; Tabla 4.1.6.2a). Se sabe también que un aumento del contenido de NO₃⁻ o de aminoácidos en la raíz podría causar una retroinhibición de la absorción de NO₃⁻ (Krapp *et al.*, 1998; Lejay *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999). Sin embargo, el CO₂ elevado no modificó significativamente los niveles de aminoácidos en la raíz en el inicio del llenado del grano en plantas deficientes en N (Tabla 4.1.5b), aunque tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, el contenido de NO₃⁻ ($P=0,067$, Tabla 4.1.3.5a). Asimismo, el contenido de carbohidratos solubles en la raíz de plantas crecidas en CO₂ elevado disminuyó en comparación con aquellas en CO₂ ambiente con un aporte de N bajo en dicha fase del desarrollo (Tabla 4.1.5b), lo cual podría disminuir la absorción y asimilación de NO₃⁻ (Stitt & Krapp, 1999). No obstante, el contenido de CST no fue menor en esta combinación de tratamientos y fase del desarrollo, que en plantas con N bajo en la antesis, o con N alto en ambas etapas del desarrollo (Tabla 4.1.5b), ni tampoco el contenido de NO₃⁻ mayor que en plantas con N bajo en la antesis (Tabla 4.1.3.5a). Por consiguiente, otros mecanismos diferentes a la reducción de la transpiración, aún sin esclarecer, subyacen en la reducción de la absorción de NO₃⁻ en CO₂ elevado.

La reducción del contenido total de N por planta observada en plantas crecidas en CO₂ elevado en la antesis, en especial en aquellas con N abundante (Tabla 4.1.3.2a), se asoció con un descenso de materia seca más que con la absorción de N (Tablas 4.1.1.1a y 4.1.3.5a). En el inicio del llenado del grano, el descenso de la absorción de NO₃⁻ inducido por el CO₂ elevado en plantas con N bajo no se acompañó de una disminución del contenido total de N de la planta (Tabla 4.1.3.2a). Estos resultados sugieren que cuando el crecimiento de la planta no es estimulado por el enriquecimiento en CO₂ y el movimiento de los nutrientes en el entorno de la raíz no se encuentra limitado, los efectos del CO₂

elevado en la absorción de N, en caso de existir, tienen poca influencia en el contenido de N por planta.

El CO₂ elevado aumentó la adscripción de nitrógeno a la hoja bandera en plantas deficientes en nitrógeno en la antesis, conduciendo a una mejora del estado nitrogenado foliar

Por otro lado, el CO₂ elevado modificó la distribución de N en la planta cuando la disponibilidad de N fue baja (Tabla 4.1.3.3a, Fig. 4.1.3.3a), con una mayor adscripción a las partes jóvenes (hoja bandera en la antesis y último entrenudo del tallo en el inicio del llenado del grano) de los tallos seleccionados de la planta, en detrimento de la raíz. El aumento de la adscripción de N a la hoja bandera por el CO₂ elevado también tuvo lugar en plantas con N alto, pero su aumento fue mucho menor que en aquellas con N bajo (20% frente a un 60%). En cambio, el CO₂ elevado redujo la adscripción de N a la hoja bandera en trigo cultivado en cámaras en el campo en la antesis (Del Pozo *et al.*, 2007; Aranjuelo *et al.*, 2011a; Gutiérrez *et al.*, 2013), independientemente de que el N total de la parte aérea de la planta hubiera disminuido (Del Pozo *et al.*, 2007; Aranjuelo *et al.*, 2011a) o permaneciera invariable (Gutiérrez *et al.*, 2013) con el CO₂ alto. La disparidad de resultados en estos estudios previos pudo deberse al aumento en la acumulación de biomasa con el CO₂ elevado y, presumiblemente, a una mayor fuerza de sumidero de N de las partes de la planta en crecimiento como el último entrenudo del tallo o la espiga.

El CO₂ elevado aumentó el volumen de solución nutritiva absorbido por unidad de masa de raíz en plantas con N bajo, y no varió en aquellas con N abundante en los dos estadios de desarrollo investigados (Tabla 4.1.2a). Esto podría deberse a que la conductancia estomática y la transpiración no limitaron la absorción en CO₂ elevado (Del Pozo *et al.*, 2007). Una mayor toma de solución nutritiva en CO₂ elevado se ha observado también en trigo (Wu *et al.*, 2004) y en arroz (Makino *et al.*, 1997a). Con independencia del aporte de N y del estadio de desarrollo, el CO₂ elevado incrementó la eficiencia en el uso del agua en la fotosíntesis (Tabla 4.1.4d), como se ha mostrado anteriormente en maíz (Kim *et al.*, 2006), sorgo (Conley *et al.*, 2001), eucalipto (Novriyanti *et al.*, 2012), tomate (Li *et al.*, 2007a) y trigo (Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Por otro lado, el CO₂ elevado no alteró el contenido de agua de las distintas fracciones de la planta en la antesis y aumentó ligeramente en la mayoría de tejidos en el inicio del llenado del grano (Tabla 4.1.1.2a). Cierta variabilidad en el contenido de agua de la hoja de plantas crecidas en CO₂ elevado se ha observado previamente, con un aumento en trigo blando crecido en el campo en la antesis (Gutiérrez *et al.*, 2013) o sin cambios en trigo duro crecido en macetas dos semanas después de la antesis (Erice *et al.*, 2014).

Una reducción de la concentración de N en la hoja y otras partes de la planta en CO₂ elevado ha sido frecuentemente observada en diferentes estudios realizados en cámaras de ambiente controlado, invernaderos, TGCs, OTCs y FACEs (Cotrufo *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999; Kimball *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2013; Bloom *et al.*, 2014), aunque Bloom *et al.* (2002) no encontraron diferencias en la concentración de N de la parte aérea o de la raíz en cultivos hidropónicos de trigo con 0,2 mM NO₃⁻. En nuestro experimento, la concentración de N por unidad de masa de la planta aumentó en plantas crecidas en CO₂ elevado con un aporte de N bajo en el inicio del llenado del grano (Tabla 4.1.3.1a), y tendió a aumentar en la antesis, a diferencia del descenso del contenido de N orgánico de la parte aérea observado en trigo y *Arabidopsis* (Bloom

et al., 2010). En la antesis, el aumento del porcentaje de N en materia seca inducido por el enriquecimiento en CO₂ en plantas con N bajo, junto a la mayor adscripción de N a la hoja bandera, contribuyeron a que aumentase notablemente el contenido de N por superficie foliar (Tabla 4.1.3.4a). Esta mejora del estado nitrogenado de la hoja bandera, como evidencian otros parámetros bioquímicos y moleculares que se discutirán más adelante, pudo aliviar la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en plantas deficientes en N. Algo similar se observó con trigo cultivado en hidroponía con un aporte bajo de fertilizante nitrogenado suministrado en proporción directa al crecimiento (Farage *et al.*, 1998), a diferencia de aquellos estudios que han mostrado que la aclimatación de la fotosíntesis fue más acusada en plantas deficientes en dicho nutriente (Stitt & Krapp, 1999; Del Pozo *et al.*, 2007). Todos estos resultados mostrados hasta ahora han sido recientemente publicados (Vicente *et al.*, 2015a).

En la antesis, el aumento de proteína y actividad Rubisco inducido por el CO₂ elevado en plantas deficientes en nitrógeno pudo evitar la aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en una atmósfera enriquecida en CO₂

En este estudio, como se ha anticipado anteriormente, se realizaron medidas de intercambio gaseoso con objeto de investigar si tuvo lugar el fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en CO₂ elevado. En la antesis, para una concentración común de CO₂ en la medida, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, la fotosíntesis no disminuyó en las plantas crecidas a [CO₂] elevadas comparadas con aquellas mantenidas a concentraciones ambientales ni con un aporte de N alto ni bajo (Tabla 4.1.4a). Estos resultados contrastan con la pérdida de capacidad fotosintética frecuentemente observada en distintas especies vegetales (Ainsworth & Long, 2005) y en trigo cultivado en un atmósfera enriquecida en CO₂ en el campo (Luo *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Taub & Wang, 2008; Aranjuelo *et al.*, 2011a), y con aquellos estudios que han mostrado que la aclimatación de la fotosíntesis fue más acusada en plantas deficientes en N (Stitt & Krapp, 1999; Del Pozo *et al.*, 2005; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2013). Si bien confirman que, aun con un aporte de N bajo, la aclimatación de la fotosíntesis puede no tener lugar cuando dicho nutriente se suministra en proporción directa al crecimiento del trigo en cultivo hidropónico (Farage *et al.*, 1998), o cuando el aporte de N es abundante como se ha mostrado en plantas de tabaco (Geiger *et al.*, 1999).

En la antesis, aunque no hubo aclimatación de la fotosíntesis por el CO₂ elevado, en las plantas con N abundante el enriquecimiento en CO₂ disminuyó la concentración de N de la parte aérea y de la planta entera a la vez que incrementó la adscripción de N a la hoja bandera (Tabla 4.1.3.2a, Fig. 4.1.3.3a), mientras que en aquellas con N bajo aumentó el contenido de N por superficie foliar y la fracción de N total asignada a la parte aérea, principalmente a la hoja bandera (Fig. 4.1.3.3a, Tabla 4.1.3.4a). Por consiguiente, el CO₂ elevado incrementó la fracción de N total asignada a la hoja bandera tanto en plantas con N abundante como deficiente, y la mejora del estado nitrogenado foliar pudo aliviar la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado. La mejora del estado nitrogenado foliar inducida por el CO₂ elevado en plantas con un aporte de N bajo se acompañó de un aumento del contenido de clorofilas (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c), en asociación con el incremento en los niveles de transcritos del gen que codifica una de las proteínas reguladoras de esta ruta biosintética, la GluTR (Tabla 4.1.8a). Estos resultados difieren de estudios previos que han mostrado que el CO₂ elevado indujo una pérdida de N foliar que se acompañó, por la estrecha interrelación existente entre ambos, de una disminución del contenido de clorofilas (Nakano *et al.*, 1997; Ainsworth & Long, 2005; Leakey *et al.*, 2009a). Un

descenso de los niveles de clorofilas se ha encontrado en la hoja bandera y penúltima de plantas de trigo de primavera cultivadas en el campo en TGCs en fases del desarrollo próximas a la antesis (Pérez *et al.*, 2007), y en etapas algo más avanzadas del desarrollo del trigo cultivado en sistemas FACE (Nie *et al.*, 1995a), en cuyo caso podría reflejar una aceleración de la senescencia. Sin embargo, el CO₂ elevado redujo el contenido de clorofila a en plantas con N alto (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c), y tendió a disminuir el total de las mismas, aunque no significativamente, a pesar de la mayor adscripción de N a las hojas y de que el contenido de N foliar no variase con respecto a las plantas mantenidas a [CO₂] ambientales. Esta disminución del contenido de clorofilas pudo relacionarse con el descenso de transcritos del gen que codifica la GluTR, lo cual contrasta con la notable inducción de la expresión de dicho gen en plantas deficientes en N (Tabla 4.1.8a). El CO₂ elevado no sólo condujo a un aumento del contenido de clorofilas en plantas deficientes en N, sino que aumentó el contenido total de proteínas foliares y de proteínas solubles (Tabla 4.1.5.6a), en consonancia con la mejora del estado nitrogenado foliar. Sin embargo, el CO₂ elevado redujo el contenido de proteínas solubles en plantas de arroz cultivadas con tres niveles de N diferentes, con una mayor intensidad en aquellas con la menor disponibilidad de N (Fukayama *et al.*, 2009), y en plantas de trigo (Sicher & Bunce, 1997; Bloom *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011a). El enriquecimiento en CO₂ aumentó también la proteína Rubisco en plantas con un aporte de N bajo en comparación con aquellas mantenidas a [CO₂] ambientales, al igual que la fracción de Rubisco en el N foliar (Tabla 4.1.5.7a). El mayor contenido de proteína Rubisco en plantas crecidas en CO₂ alto y N bajo se acompañó de un aumento de la actividad Rubisco inicial, aunque la total no llegó a alcanzar significación estadística (Tabla 4.1.6.1a). Estos resultados difieren de otros estudios que han mostrado un descenso de proteína y actividad Rubisco en hojas de diferentes especies vegetales crecidas en una atmósfera enriquecida en CO₂ (Nakano *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a), y de aquellos que indican que la aclimatación fotosintética y el descenso de Rubisco a [CO₂] elevadas predominan en plantas deficientes en N en comparación con aquellas con un amplio suministro de dicho nutriente (Rogers *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999; Ainsworth *et al.*, 2003; Reich *et al.*, 2006; Bloom *et al.*, 2010). Farage *et al.* (1998) mostraron que, cuando el suministro de N se realizó en proporción directa al desarrollo de las plantas de trigo cultivadas hidropónicamente, no hubo aclimatación de la fotosíntesis aun cuando el crecimiento fue disminuido en plantas deficientes en N. Sin embargo, la proteína y la actividad Rubisco no variaron con el CO₂ de crecimiento, razón por la que muy posiblemente la fotosíntesis neta se mantuvo. Por el contrario, observaron una pérdida de capacidad fotosintética con el CO₂ alto en trigo cultivado en arena con una disponibilidad de N baja que se acompañó de un descenso de proteína y actividad Rubisco y del contenido de N foliar.

Se ha demostrado el papel crucial que desempeña la fertilización nitrogenada en la fortaleza de los sumideros de asimilados y su implicación en la prevención de la aclimatación de la fotosíntesis en plantas con baja disponibilidad de N (Rogers *et al.*, 1996). En nuestro estudio, el área foliar y el número de tallos hijos disminuyeron notablemente en las plantas deficientes en N con ambas [CO₂] atmosféricas en comparación con las plantas con N abundante (Tablas 4.1.1.3a y 4.1.1.5a) y la aclimatación no tuvo lugar. Esto demuestra que una mayor capacidad de sumidero no necesariamente evita la aclimatación, sino que más bien el balance entre fuentes y sumideros a nivel de planta entera podría ser el factor clave, como propusieron Pettersson & McDonald (1994). El mantenimiento de la fotosíntesis con independencia de la disponibilidad de N fue corroborado por las medidas *in vivo* de la actividad Rubisco, puesto que mostraron que en la hoja bandera del trigo no hubo diferencias significativas en la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco entre los tratamientos de CO₂ y de N (Tabla 4.1.4b). Sin embargo, las medidas *in vitro* de la actividad Rubisco confirmaron dichos

resultados en plantas con N abundante, puesto que la actividad inicial y total del enzima no variaron con el CO₂ de crecimiento, aunque la actividad Rubisco total tendió a disminuir (Tabla 4.1.6.1a). Mientras que el enriquecimiento en CO₂ aumentó la actividad Rubisco inicial y total en plantas con N bajo, sin llegar a alcanzar significación estadística. Posiblemente por ello la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco mostró un 16% de aumento con el CO₂ en plantas deficientes en N frente al 12% de aquellas con N abundante (Tabla 4.1.4b), aun cuando el efecto no alcanzó significación estadística. Descensos en la actividad Rubisco se han mostrado en plantas C₃ expuestas a [CO₂] elevadas (Leakey *et al.*, 2009a), aunque en otros estudios no se han encontrado diferencias (Nakano *et al.*, 1997; Seneweera *et al.*, 2011).

En definitiva, estos efectos del CO₂ elevado en plantas con un menor aporte de fertilizante nitrogenado sugieren que el ajuste de la velocidad de desarrollo de la planta para adaptar su crecimiento al suministro de dicho nutriente condujo a una mejor redistribución del N a nivel de planta entera, en especial a la hoja bandera, y muy posiblemente el aumento de actividad y proteína Rubisco evitó la pérdida de capacidad fotosintética, en contraposición a las observaciones previas (Bowes, 1991; Drake *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Pérez *et al.*, 2005), particularmente con baja disponibilidad de N (Geiger *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; Del Pozo *et al.*, 2005; Bloom *et al.*, 2010).

El mantenimiento de la capacidad fotosintética en plantas deficientes en nitrógeno con el CO₂ elevado en la antesis se asoció con una reprogramación del metabolismo primario mediada más bien por el estado nitrogenado que por el descenso de carbohidratos a nivel foliar

La Rubisco es el enzima limitante de la fotosíntesis a los niveles atmosféricos de CO₂ actuales y representa entre el 15-35% del total del N foliar en plantas C₃ (Evans, 1989; Makino & Osmond, 1991). La concentración foliar de Rubisco está determinada por el balance entre la síntesis y degradación de la proteína, que suele variar durante el desarrollo foliar (Seneweera *et al.*, 2011) con un aumento durante la expansión foliar hasta que se alcanza un máximo cuando tiene lugar la expansión completa de la hoja, y continúa con un descenso posterior a medida que progresa la senescencia foliar (Imai *et al.*, 2008). Los cambios en el contenido de Rubisco durante el desarrollo parecen estar sincronizados con la abundancia de transcritos para cada una de las subunidades del enzima (Suzuki *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2009). En la antesis, el aumento de proteína Rubisco inducido por el CO₂ alto en plantas con un aporte de N bajo fue paralelo al aumento de proteínas solubles y totales, y se acompañó de un notable incremento de la abundancia de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña del enzima, y en menor medida del de la subunidad grande (Tabla 4.1.8a, Fig. 4.1.9a), lo cual podría explicar el aumento de la relación entre ambas subunidades rbcL:rbcS observada en estas condiciones (Tabla 4.1.5.7a). Por tanto, el incremento de Rubisco pudo asociarse con un aumento de su síntesis (Cheng *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1999). Estos resultados contrastan con la represión inducida por el CO₂ alto de los genes que codifican ambas subunidades de la Rubisco en plantas de trigo (Nie *et al.*, 1995a) y Arabidopsis (Cheng *et al.*, 1998), o con la ausencia de efecto en los niveles de transcritos del gen *rbcS* en plantas de trigo cultivado en el campo (Pérez *et al.*, 2005). El descenso de actividad y proteína Rubisco, frecuentemente observado en plantas crecidas en CO₂ elevado (Maroco *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999; Pérez *et al.*, 2005), se ha relacionado con una represión de los genes *rbcS* y *rbcL* mediada por la acumulación de carbohidratos foliares (Jang & Sheen, 1994; Gesch *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1999) o con una reducción de la concentración de N

foliar (Nakano *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a). En nuestro estudio, el contenido foliar de sacarosa, fructanos, así como el total de carbohidratos solubles y almidón fue notablemente superior en plantas deficientes en N que en aquellas con N abundante con independencia de la $[\text{CO}_2]$ de crecimiento (Tabla 4.1.5a), en conformidad con estudios previos que han mostrado que la deficiencia de dicho nutriente conduce a una mayor acumulación de carbohidratos (Stitt *et al.*, 2002; Scheible *et al.*, 2004). Existen evidencias de que variaciones en los niveles de azúcares endógenos ejercen un impacto importante en la expresión génica (Bläsing *et al.*, 2005; Osuna *et al.*, 2007). Así, el CO_2 elevado condujo a una mayor acumulación de fructosa (52%) y tendió a aumentar el contenido de glucosa (40%) sin alcanzar significación estadística en plantas con N abundante, mientras que en aquellas deficientes en N redujo el contenido de sacarosa (22%), fructanos (65%) y el total de carbohidratos solubles (32%) (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Puesto que proporcionalmente el contenido de carbohidratos fue mayor en plantas deficientes en N, el descenso inducido por el CO_2 elevado pudo aliviar la represión potencial de los genes que codifican ambas subunidades de la Rubisco e incrementar su expresión, en mayor medida la de aquella codificada en el núcleo (Tabla 4.1.8a). Por el contrario, en plantas con N abundante, el aumento de los niveles de hexosas como la fructosa y, en menor medida, la glucosa (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c), sugiere que pudo tener lugar una represión de la Rubisco mediada por la acumulación de carbohidratos (Moore *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2004; Ainsworth & Rogers, 2007). Estudios con plántulas de *Arabidopsis* han mostrado una represión de genes fotosintéticos a las 3 h después de la readición de sacarosa a plantas deficientes en C en las que la expresión de dichos genes estaba aumentada (Osuna *et al.*, 2007). En nuestro estudio, la mayor acumulación de hexosas inducida por el CO_2 elevado en plantas con amplia fertilización nitrogenada se acompañó de una ligera represión de los genes *rbcS*, *rbcL*, *rba* y de otros genes fotosintéticos (Tabla 4.1.8a), junto con un ligero descenso, no significativo, de la proteína y actividad Rubisco total (23% y 18%, respectivamente), en comparación con las plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO_2 , sin que se produjera la aclimatación de la fotosíntesis. El descenso de la relación entre las subunidades *rbcL*:*rbcS* de la Rubisco pudo relacionarse con una mayor represión del gen que codifica la subunidad grande del enzima con respecto al de la subunidad pequeña (Tablas 4.1.5.7a y 4.1.8a). Por el contrario, el CO_2 elevado indujo un patrón de cambios completamente opuesto para las plantas con escasa fertilización nitrogenada y tampoco tuvo lugar el fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis, por ello sería interesante investigar su relación con el estado nitrogenado foliar.

Se ha indicado anteriormente que el descenso de proteína Rubisco observado en plantas crecidas en CO_2 elevado a menudo se ha relacionado con una pérdida de N foliar (Nakano *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a). En nuestro estudio, el enriquecimiento en CO_2 incrementó, en comparación con las plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, el contenido de N por superficie foliar un 24% en plantas con un aporte de N bajo en la anthesis (Tabla 4.1.3.4a) y el contenido de NO_3^- y N foliar un 38% y 21%, respectivamente, aunque este último no alcanzó significación estadística (Tablas 4.1.3.2a y 4.1.3.5a). Sin embargo, en plantas con N abundante no variaron con el CO_2 elevado, exceptuando una reducción del 21% del contenido de NO_3^- foliar, aunque la adscripción de N a la hoja bandera aumentó en plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ elevadas con ambas disponibilidades de N, si bien el aumento fue mucho mayor con deficiencia de N, como ya hemos mencionado. En consecuencia, la mejora del estado nitrogenado foliar fue mayor en plantas con bajo que con alto suministro de N, aun cuando en estas últimas proporcionalmente fuesen mayores dichos contenidos con independencia de la $[\text{CO}_2]$ de crecimiento, como muestra el contenido de proteína Rubisco y de proteínas solubles y totales (Tablas 4.1.5.6a y 4.1.5.7a). Lo cual evidencia que existe una inversión adicional de N en Rubisco cuando las plantas tienen acceso a un amplio suministro de N (Quick *et al.*, 1992). Por tanto, sería esperable que cuando la disponibilidad de N para la planta es apropiada, la acumulación de Rubisco

excede a la cantidad requerida para soportar la fotosíntesis, mientras que cuando la provisión de N es limitante, la inversión de N en Rubisco puede ser estrechamente regulada para mantener la fotosíntesis (Webber *et al.*, 1994). La inducción de la expresión génica de la Rubisco por el CO₂ elevado en plantas deficientes en N se acompañó de un aumento de transcritos de otros muchos genes fotosintéticos, entre los que destacan aquellos que codifican las proteínas cosechadoras de la luz de ambos fotosistemas LHCI y LHCII, las proteínas D1 y D2 del PSII, la FNR, la subunidad β de la ATPasa del cloroplasto, y el ya descrito de la GluTR, junto a algunos otros que no llegaron a alcanzar significación estadística, como los relacionados con el ciclo de Calvin-Benson (Tabla 4.1.8a, Fig. 4.1.9a). Teniendo en consideración dichas apreciaciones, sería plausible hipotetizar que se produciría un aumento de proteínas involucradas en la captación de luz, la fijación de CO₂, la biosíntesis de clorofilas y la generación de energía, en conformidad con el incremento de proteína Rubisco y clorofilas previamente descrito, para mantener la capacidad fotosintética y de regeneración de la RuBP (Theobald *et al.*, 1998). Estos resultados difieren de la reducción de la abundancia de transcritos de genes relacionados con la captura de luz y la fijación del CO₂ mostrada en plantas de *Arabidopsis* en el campo en respuesta al crecimiento en una atmósfera enriquecida en CO₂ (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008) y de genes del PSII (Kaplan *et al.*, 2012), y corroboran el aumento del contenido proteico de subunidad β de la ATPasa observado en estudios previos con trigo cultivado en el campo (Aranjuelo *et al.*, 2011a). Además, el CO₂ elevado indujo también la expresión del gen que codifica la RBA en plantas deficientes en N, lo cual pudo facilitar la separación de inhibidores del sitio catalítico del enzima (Parry *et al.*, 2007), en consonancia con el mantenimiento de la eficiencia catalítica de la Rubisco (Tabla 4.1.6.1a). Estos resultados difieren del descenso de proteína RBA previamente observado en cultivos de trigo duro en el campo (Aranjuelo *et al.*, 2011a), de acuerdo con el descenso de la eficiencia catalítica de la Rubisco (Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a). Asimismo, el incremento de la abundancia de transcritos para la mayoría de los genes que codifican las CAs por el enriquecimiento en CO₂ en plantas con un aporte de N bajo, confirma el aumento de proteína previamente observado en trigo duro en el campo (Aranjuelo *et al.*, 2011a), lo cual podría aumentar la conductancia del mesófilo y compensar el cierre de estomas en dichas condiciones y, por tanto, asegurar el suministro de CO₂ al cloroplasto (Evans *et al.*, 2009). Estos resultados contrastan con el descenso de transcritos para las CAs descrito en otras especies vegetales a [CO₂] elevadas (Li *et al.*, 2006; Fukayama *et al.*, 2011).

Estudios de expresión génica global con plántulas de *Arabidopsis* han mostrado que la deficiencia de N condujo a una represión de la mayoría de genes asignados a la fotosíntesis y la síntesis de clorofilas y proteínas plastidiales, a la vez que indujo un importante grupo de genes implicados en el metabolismo secundario y la reprogramación del transporte electrónico mitocondrial (Scheible *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2005). La readición de NO₃⁻ a plantas deficientes en N condujo a un rápido aumento de los niveles de transcritos de genes involucrados en la absorción y reducción de NO₃⁻, la generación de equivalentes de reducción y la síntesis de ácidos orgánicos, en asociación con una posterior inducción de genes que participan en la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, ácidos nucleicos y proteínas, y represión de aquellos relacionados con la degradación de dichos compuestos (Wang *et al.*, 2000; Scheible *et al.*, 2004). El patrón de respuesta transcripcional promovido con la readición de NO₃⁻ fue bastante semejante al inducido por el CO₂ elevado en plantas deficientes en N en el presente trabajo de investigación (Fig. 4.1.9a). Resultados que contrastan con la represión inducida por el CO₂ elevado o la carencia de efecto en la expresión de la mayoría de genes en las plantas con N abundante (Tabla 4.1.8a, Fig. 4.1.9b). El perfil transcripcional descrito muestra evidencias de que muy posiblemente el estatus nitrogenado estuviera implicado en la reprogramación del metabolismo desencadenada por el CO₂ elevado en plantas con un aporte de N bajo. Así, el CO₂ elevado condujo a un drástico descenso

del contenido foliar de fructanos en plantas deficientes en N, en consonancia con el descenso de transcritos de los genes que codifican los enzimas de sus síntesis, las FTs, en particular la 1-SST y la 6-SFT. Mientras que los transcritos para las FEHs, involucradas en la degradación de fructanos, o bien no variaron (1-FEH y 6-KEH), o bien tendieron a aumentar (6&1-FEH). Del mismo modo, el descenso del contenido foliar de sacarosa pudo derivarse de una activación de su degradación con respecto a su síntesis como muestran el ligero aumento de transcritos de los genes que codifican la INV y SUS frente al mantenimiento de la abundancia de transcritos de la UGPasa, SPS y SPP (Tablas 4.1.5c y 4.1.8a). En plantas deficientes en N, el CO₂ elevado también redujo, sin llegar a alcanzar significación estadística, los niveles de almidón en un 35% en comparación con aquellas mantenidas a [CO₂] ambientales, aun cuando la expresión génica de una de las isoformas de la SS fue inducida y, en mucha menor medida, la de las otras isoformas y la de las subunidades de la AGPasa. Estos resultados sugieren que el CO₂ elevado promovió la degradación de sacarosa y fructanos para facilitar la provisión de esqueletos carbonados necesarios para la asimilación del N en compuestos orgánicos nitrogenados. La represión de las FTs pudo asociarse con el incremento de NO₃⁻ inducido por el CO₂ elevado en plantas con N bajo, que es una señal negativa para la expresión génica de dichas proteínas (Morcuende *et al.*, 2004). Por el contrario, en plantas con N abundante, la reducción del contenido foliar de NO₃⁻ causada por el CO₂ elevado pudo atenuar la represión de dichos genes, en conformidad con el nivel de expresión y el mantenimiento del contenido foliar de fructanos con respecto a las plantas crecidas a [CO₂] ambientales (Tablas 4.1.5a, 4.1.5c y 4.1.8a). Se ha mostrado que el NO₃⁻ puede también inhibir la síntesis de almidón (Scheible *et al.*, 1997a), pero los transcritos de la AGPasa no disminuyeron con el CO₂ elevado posiblemente porque no pudieron superar la inducción mediada por los carbohidratos (Hendriks *et al.*, 2003; Geigenberger, 2011), notablemente altos en las plantas deficientes en N. Estos resultados difieren de la acumulación de carbohidratos foliares inducida por el CO₂ elevado en otros estudios (Stitt & Krapp, 1999; Pérez *et al.*, 2005) en los que se ha mostrado que se acumulan predominantemente fructanos en plantas de trigo (Nie *et al.*, 1995a; Pérez *et al.*, 2005) y, en mayor medida, en plantas con un aporte de N bajo que con alto (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2005) en correlación con la fuerte inducción de la expresión de las FTs (Fukayama *et al.*, 2011).

El CO₂ alto indujo fuertemente la expresión del gen que codifica el transportador de NO₃⁻ de baja afinidad NRT1.5B en plantas deficientes en N y, en menor medida, la del transportador de alta afinidad NRT2.2 y la del componente NAR2.2 que se requiere para el transporte de alta afinidad de NO₃⁻ (Tabla 4.1.8a), lo cual pudo contribuir a la mejora del estado nitrogenado foliar. Un aumento de transcritos de los homólogos de los genes NRT2.2 y NAR2.2 se ha observado en plántulas de *Arabidopsis* deficientes en N después de la adición de NO₃⁻ (Scheible *et al.*, 2004). No obstante, el crecimiento en CO₂ elevado redujo la expresión de otros transportadores de NO₃⁻ en las plantas deficientes en N, como el NRT1.7B y NRT1.8B (Tabla 4.1.8a), de acuerdo con estudios previos (Fukayama *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2013). Esta modulación de la expresión génica de los transportadores, en la que la inducción de unos pudo ser compensada por la represión de otros, podría haber contribuido a que la absorción de NO₃⁻ no variase con respecto a las plantas crecidas a [CO₂] ambientales ya descrita con anterioridad. Sin embargo, el patrón de cambios en la expresión de los genes que codifican los transportadores en plantas con N bajo contrasta con la escasa variabilidad inducida por el CO₂ alto en los de las plantas con un aporte de N alto, de acuerdo con la ausencia de efecto del CO₂ de crecimiento en la absorción de NO₃⁻ en la antesis. Por otra parte, el CO₂ elevado aumentó los niveles de transcritos para la GS2a y, en menor medida, para la GS2b, la AS, la NiR, la AAT plastídica y citosólica y sólo ligeramente para la NR en plantas deficientes en N (Tabla 4.1.8a), lo cual pudo haber contribuido al incremento del contenido foliar de aminoácidos observado en dichas condiciones (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Asimismo, el gen que codifica la GDH y aquellos para las

isoformas citosólicas de la GS (GS1a y GSr1) fueron reprimidos por el CO₂ elevado, en mayor medida la GS1a que la GSr1. Resultados que podrían ser indicativos de un predominio de la biosíntesis sobre el catabolismo de los aminoácidos y las proteínas puesto que dichos enzimas están implicados en la asimilación del NH₄⁺ derivado de procesos catabólicos de aminoácidos (Forde & Lea, 2007) y proteínas (Bernard *et al.*, 2008; Galili *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010), respectivamente, como muestran los aumentos del contenido de aminoácidos, proteína Rubisco y de las proteínas solubles y totales descritos con anterioridad. En plántulas de *Arabidopsis* deficientes en N se ha observado una represión de al menos una de las isoformas de la GDH tras la readición de NO₃⁻ (Scheible *et al.*, 2004). La apreciación indicada anteriormente pudo también confirmarse por la inducción de las isoformas cloroplásticas de la GS que participan en la asimilación primaria del NH₄⁺ derivado de la reducción del NO₃⁻ y en la reasimilación del NH₄⁺ procedente de la fotorrespiración (Douce & Neuburger, 1999; Igarashi *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Por el contrario, en plantas con N alto, el CO₂ elevado condujo a una notable represión de la GS2b e inducción de la GDH, lo cual sugiere que muy posiblemente predominaron los procesos catabólicos de aminoácidos y proteínas sobre la síntesis, en base a lo explicado anteriormente para las plantas deficientes en N. Resultados en correlación con el notable descenso de aminoácidos (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c) y los menores contenidos de proteína Rubisco y proteínas solubles y totales (Tablas 4.1.5.6a y 4.1.5.7a).

La expresión génica de la NR fue sólo levemente inducida por el CO₂ elevado en plantas deficientes en N aun a pesar del notable aumento del contenido foliar de NO₃⁻, que es un potente inductor de la expresión del enzima (Vincentz *et al.*, 1993), pero los carbohidratos, que también inducen la expresión de la NR (Cheng *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993; Krapp & Stitt, 1995), disminuyeron (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c), y muy posiblemente la Gln, que reprime la expresión de la NR (Vincentz *et al.*, 1993), podría haber aumentado su contenido como cabría esperar por el incremento de aminoácidos encontrado en dichas condiciones. Por ello, el efecto positivo de los azúcares y el NO₃⁻ en el nivel de transcritos de la NR pudo ser atenuado porque la Gln se acumula cuando la proteína NR está presente y activa, lo cual pudo contribuir a que la abundancia de transcritos para la NR fuese sólo ligeramente aumentada con el CO₂ elevado en plantas con un aporte de N bajo, aunque los niveles fueron algo mayores que en las plantas con N abundante (Tabla 4.1.8a). Al igual que con los cambios descritos en los transcritos, el CO₂ elevado tendió a aumentar, sin alcanzar significación estadística, la actividad NR un 18% en plantas con deficiencia de N y un 9% en aquellas con N alto (Tabla 4.1.6.2a). El efecto en la actividad NR selectiva fue similar al observado para la actividad máxima, mientras que el estado de activación del enzima no varió significativamente con el CO₂ ni en plantas con un aporte de N bajo ni alto. No obstante, cabe señalar que el estado de activación de la NR fue un 27% superior en plantas deficientes en N que en aquellas con abundancia de dicho nutriente, atribuible al mayor contenido de carbohidratos en las primeras, principalmente sacarosa, puesto que los azúcares regulan la traducción y/o estabilidad de la proteína (Morcuende *et al.*, 1998). Estos resultados contrastan con el descenso de actividad NR inducido por el CO₂ elevado en trigo cultivado en el campo, que fue más acusado en plantas deficientes en N que en aquellas con N abundante (Morcuende *et al.*, 2011) y en otras especies vegetales como la cebada (Sicher, 2001) y tabaco cultivado hidropónicamente (Ferrario-Méry *et al.*, 1997). Aunque en plantas de tabaco crecidas en CO₂ elevado en cámaras climáticas se ha observado un ligero aumento de la actividad NR (Geiger *et al.*, 1998). La represión inducida por el CO₂ alto de alguno de los genes involucrados en la fotorrespiración en plantas con N abundante, como el de la proteína PGLP, pudo disminuir la disponibilidad de equivalentes de reducción necesarios para mantener la reducción de NO₃⁻, en conformidad con estudios previos (Bloom *et al.*, 2010; Bloom *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2014). Del mismo modo, la represión del gen que codifica la FNR pudo limitar

la generación de NADPH necesario para reducir la Fd que se consume en la reducción de NO_2^- en el cloroplasto catalizada por la NiR, lo cual pudo haber contribuido a acentuar la pérdida de N en las plantas con abundancia de N (Tabla 4.1.3.2a). Por el contrario, el enriquecimiento en CO_2 condujo a un aumento de los niveles de transcritos para la FNR, junto a una ligera inducción de algunos de los genes que participan en la fotorrespiración, en plantas deficientes en N, lo cual pudo facilitar la asimilación del NO_3^- y contribuir a una mejora del estado nitrogenado foliar. Se ha observado una inducción de la expresión de algunos genes de la FNR brevemente después de la adición de NO_3^- a plántulas deficientes en dicho nutriente (Scheible *et al.*, 2004).

En definitiva, el CO_2 elevado condujo a una eficaz y coordinada activación de la asimilación de NO_3^- y la biosíntesis de aminoácidos y proteínas en plantas deficientes en N, además estimuló el flujo del C desde la glicólisis a la síntesis de ácidos orgánicos en asociación con el aumento de los niveles foliares de 2-oxoglutarato (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c) y la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas que participan en la glicólisis y el ciclo TCA, particularmente la PEPC y la IDH (Tabla 4.1.8a). Una inducción de la expresión de genes involucrados en la glicólisis y el ciclo TCA se ha mostrado en otros estudios con diferentes especies vegetales en CO_2 elevado (Li *et al.*, 2008; Fukayama *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). La PEPC fue fuertemente inducida brevemente después de la adición de NO_3^- a plantas de tabaco deficientes en N (Scheible *et al.*, 1997a) y a plántulas de *Arabidopsis* deficientes en dicho nutriente (Scheible *et al.*, 2004). En este último estudio, los transcritos para las isocitrato deshidrogenasas también aumentaron, y el conjunto de datos de transcritos y metabolitos mostraron evidencias de que tuvo lugar una estimulación estrechamente coordinada de todos los procesos implicados en la absorción de NO_3^- y el uso del N para la síntesis de proteínas. Cambios similares a los inducidos por el CO_2 elevado en plantas con un aporte de N bajo.

La aclimatación de la fotosíntesis al CO_2 elevado en plantas con abundancia de nitrógeno en el inicio del llenado del grano se asoció a una pérdida de Rubisco y posiblemente de otras proteínas fotosintéticas

En el inicio del llenado del grano, las medidas de fotosíntesis a una $[\text{CO}_2]$ de $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ mostraron que el crecimiento en una atmósfera enriquecida en CO_2 redujo, en comparación con las plantas mantenidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, la asimilación fotosintética del C un 23% en las plantas con un aporte de N alto y tendió a disminuir entorno a un 10% en aquellas con N bajo ($P=0,062$; Tabla 4.1.4a). El descenso de fotosíntesis con el CO_2 elevado en plantas con N alto no se asoció con una limitación estomática, ya que la C_i aumentó (Tabla 4.1.4a), sino más bien con una limitación no estomática. Así, pudimos comprobar que el CO_2 elevado redujo la velocidad de transporte electrónico fotosintético en plantas con N abundante (Zhang *et al.*, 2008), y no tuvo efecto en la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (Tabla 4.1.4b). Estos resultados sugieren que el descenso de la fotosíntesis se debió, al menos en parte, a una restricción del transporte electrónico fotosintético, de acuerdo con estudios previos con plantas de alfalfa (Aranjuelo *et al.*, 2008a). La respuesta de aclimatación de la fotosíntesis al CO_2 elevado corroboró los resultados anteriores, puesto que la aclimatación fue mayor al inicio del llenado del grano que en la antesis, y en las plantas con un aporte de N alto que en aquellas con N bajo (Tabla 4.1.4c). Además, el CO_2 elevado no alteró el uso eficiente del N en la fotosíntesis en plantas con N abundante al inicio del llenado del grano, a diferencia del aumento observado en la antesis, al igual que en plantas con N bajo en ambas fases del desarrollo (Tabla 4.1.4d). En trigo se ha observado una mejora del uso eficiente del N en la fotosíntesis en

respuesta al CO₂ elevado (Zhang *et al.*, 2013), algo similar ocurrió en plantas de eucalipto, *E. urophylla* y *E. deglupta* × *E. camaldulensis* (Novriyanti *et al.*, 2012), en plantas C₄ (Ghannoum *et al.*, 2011) y en plantas transgénicas de arroz con una menor cantidad de Rubisco en CO₂ elevado (Makino *et al.*, 1997b). Puede concluirse que en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo no tuvo lugar el fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en CO₂ elevado en plantas cultivadas en hidroponía con independencia de la disponibilidad de N. Sin embargo, en estadios más avanzados del desarrollo, el CO₂ elevado condujo a una pérdida de capacidad fotosintética, que fue más notable en plantas con un aporte supraóptimo de N, a diferencia de nuestros estudios previos con trigo cultivado en TGCs en el campo en los que la aclimatación de la fotosíntesis fue mayor cuando la disponibilidad de N fue menor (Del Pozo *et al.*, 2005; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2013).

En las plantas con N abundante, la aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en CO₂ elevado no se asoció con una limitación en la absorción de NO₃⁻, pero el CO₂ elevado redujo notablemente la expresión de la mayoría de genes involucrados en la CTEF, la síntesis de ATP en el cloroplasto y la mitocondria, el ciclo de Calvin, la fotorrespiración, el OPPP y la glicólisis (Tabla 4.1.8a, Fig. 4.1.9d), en conformidad con el descenso de la velocidad de transporte electrónico indicado (Tabla 4.1.4b). Estos resultados sugieren que el CO₂ elevado limitó fuertemente la generación de energía y poder reductor necesarios para el mantenimiento de la fotosíntesis y el metabolismo de las plantas con abundancia de N. El enriquecimiento en CO₂ tendió también a disminuir la expresión de los genes que codifican las subunidades grande y pequeña de la Rubisco en las plantas con un aporte de N alto, más acentuadamente que en la antesis, lo cual condujo a un ligero descenso de la proteína Rubisco, junto a una reducción de la fracción de Rubisco en la proteína soluble y en el N foliar (Tabla 4.1.5.7a). Cambios que se acompañaron de una ligera disminución, no significativa, de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco y de la actividad Rubisco inicial (Tablas 4.1.4b y 4.1.6.1a), que disminuyeron con respecto a las plantas mantenidas a [CO₂] ambientales un 10% y 12%, respectivamente, aunque la actividad Rubisco total no varió en las condiciones descritas. El CO₂ elevado redujo también la expresión del gen que codifica la RBA, lo cual podría explicar el descenso de proteína encontrado en plantas de trigo duro cultivadas en el campo (Aranjuelo *et al.*, 2011a), aunque la eficiencia catalítica del enzima no varió con respecto a las plantas mantenidas a [CO₂] ambientales con N abundante (Tabla 4.1.6.1a). Por tanto, el descenso de Rubisco y, muy posiblemente, de otras proteínas fotosintéticas inducido por el CO₂ elevado, pudo contribuir a la pérdida de capacidad fotosintética en las plantas con N abundante en esta fase del desarrollo.

La disminución de la proteína y actividad Rubisco pudo derivarse de la mayor acumulación de carbohidratos foliares, principalmente glucosa y fructosa, y, en menor medida, sacarosa (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c), en conformidad con estudios previos (Nie *et al.*, 1995a; Cheng *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004). En esta fase del desarrollo, los fructanos, a diferencia de lo ocurrido en la antesis, tendieron a disminuir con el CO₂ alto, lo cual pudo asociarse con una mayor represión de las FTs (Tablas 4.1.5a y 4.1.8a). Se observó también un descenso de la expresión génica de proteínas que participan en la síntesis de almidón, como la isoforma IV de la SS y la ISO1 y, en menor medida, algunas otras, junto a varias que intervienen en la síntesis de sacarosa, en especial la SPS, aunque los niveles de dichos carbohidratos o bien no variaron, en comparación con las plantas mantenidas a [CO₂] ambientales, o bien tendieron a aumentar levemente (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c). Si bien habría que considerar que frecuentemente los cambios de expresión génica preceden a aquellos en los niveles de proteínas (Gibon *et al.*, 2004). Estos resultados contrastan con el incremento de la abundancia de transcritos de genes de la síntesis de sacarosa y almidón inducido por el CO₂ elevado en otras especies

vegetales (Fukayama *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2012). No obstante, se ha propuesto que la inhibición preferencial de la síntesis de almidón y el mantenimiento de unos niveles de azúcares elevados durante la asimilación de NO_3^- es de suma importancia para facilitar la exportación y el uso de los aminoácidos, puesto que a su vez dependen de la producción y exportación de sacarosa (Scheible *et al.*, 1997a). Por ello, la evaluación de los cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del N mostró que la abundancia de transcritos para la NR fue disminuida con el CO_2 elevado en plantas con N abundante (Tabla 4.1.8a). Cambios en la expresión que se acompañaron de un descenso prácticamente significativo de la actividad NR máxima ($P=0,052$; Tabla 4.1.6.2a), aunque la disminución de la actividad NR selectiva fue menor ($P=0,071$), indicativo de que muy posiblemente tuvo lugar un descenso de proteína NR. Además, la fuerte inhibición de la fotorrespiración inducida por el CO_2 pudo conducir a un notable descenso de los equivalentes de reducción necesarios para la reducción del NO_3^- por la NR, en conformidad con estudios previos con trigo y otras especies vegetales (Bloom *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2014). La limitación de la asimilación del NO_3^- en compuestos orgánicos nitrogenados inducida por el CO_2 elevado en plantas con N abundante tuvo lugar no sólo a nivel de la reacción catalizada por la NR, sino también en el paso siguiente de reducción del NO_2^- y en la posterior síntesis de aminoácidos, como sugieren la represión de la NiR, además de la GSr1 y GS2b y, en menor extensión, la Fd-GOGAT (Tabla 4.1.8a, Fig. 4.1.9d). Cambios que condujeron a un descenso del contenido foliar de aminoácidos (Tablas 4.1.5a y 4.1.5c) y tendieron a disminuir el total de proteínas foliares (Tablas 4.1.5.6a). Asimismo, como ya se anticipó en la anterior fase del desarrollo, la represión del gen que codifica la GS2b y la inducción de la GDH pudo ser indicativo de un predominio de procesos catabólicos de aminoácidos y proteínas (Forde & Lea, 2007; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010), probablemente derivados de un incremento de la exportación de asimilados a la espiga. Paralelamente a la inhibición de la asimilación del N inducida por el CO_2 elevado en plantas con abundancia de N, la expresión del gen Dof1 también fue disminuida, lo cual sugiere que dicho factor de transcripción pudo mediar en la regulación de la asimilación del N (Kumar *et al.*, 2009). En consecuencia, la pérdida de capacidad fotosintética inducida por el CO_2 elevado en plantas con abundancia de N se relacionó con el estado nitrogenado foliar, al igual que en estudios previos con trigo cultivado en TGCs en el campo (Pérez *et al.*, 2005).

Por otra parte, la ligera pérdida de capacidad fotosintética inducida por el CO_2 elevado en las plantas deficientes en N en el inicio del llenado del grano se acompañó de una disminución de la absorción de NO_3^- por unidad de masa de raíz y por planta (Tabla 4.1.2a), a diferencia de lo ocurrido en las plantas con abundancia de N. Sin embargo, la limitación de la absorción de NO_3^- no condujo a una pérdida del contenido de N de la planta ni de la hoja bandera (Tabla 4.1.3.2a). Aunque la adscripción de N a la hoja y el contenido de N por superficie foliar no variaron con el CO_2 de crecimiento en las plantas con N bajo, a diferencia del aumento observado en etapas más tempranas del desarrollo (Tablas 4.1.3.3a y 4.1.3.4a). Aun con los cambios descritos, la pauta de cambio a nivel transcripcional y metabólico inducida en respuesta al CO_2 elevado a nivel foliar fue bastante similar a la desencadenada en la antesis, aunque algunos efectos se acentuaron y otro se atenuaron (Tablas 4.1.5a, 4.1.5c y 4.1.8a). Estudios previos han mostrado que la fase de desarrollo de la plantas parece influir en el perfil de transcritos (Li *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2012). Así, el CO_2 alto mantuvo la inducción de la expresión genes de las proteínas cosechadoras de la luz, la subunidad β de la ATPasa, las CAs, la RBA y, a diferencia de la antesis, aumentó la abundancia de transcritos del gen que codifica la subunidad grande de la Rubisco y atenuó la inducción de la expresión de la subunidad pequeña (Tabla 4.1.8a). A pesar de la alteración del patrón de expresión de las subunidades de la Rubisco inducida por el CO_2 elevado en las plantas con un aporte de N bajo, la cantidad de proteína Rubisco no varió en comparación con las plantas mantenidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, lo cual contrasta con el aumento observado en la antesis

(Tabla 4.1.5.7a), aunque la pauta de cambio de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco fue similar en ambas fases del desarrollo (Tabla 4.1.4b). A su vez, la fracción de Rubisco en la proteína soluble en las plantas deficientes en N no varió con el CO₂ de crecimiento, mientras que la fracción de la Rubisco en el N foliar tendió a aumentar, lo cual difiere de los descensos inducidos por el CO₂ alto en las plantas con abundancia de N descritos previamente (Tabla 4.1.5.7a). No obstante, la actividad Rubisco inicial disminuyó, en comparación con aquellas crecidas a [CO₂] ambientales, un 14% en las plantas crecidas en CO₂ elevado con un aporte de N bajo (Tabla 4.1.6.1a), lo cual pudo contribuir a la leve pérdida de capacidad fotosintética observada en esta fase del desarrollo de las plantas. Sin embargo, aun cuando la absorción de NO₃⁻ fue disminuida por el CO₂ elevado en las plantas con deficiencia de N, no se apreciaron síntomas de la pérdida de N foliar, puesto que no sólo el contenido de N foliar y proteína Rubisco fue mantenido con el enriquecimiento en CO₂ (Tablas 4.1.3.2a y 4.1.5.7a), sino que también lo hicieron el contenido de clorofilas y proteínas solubles, así como las proteínas totales y de membrana (Tablas 4.1.5a y 4.1.5.6a), que tendieron incluso a aumentar con el CO₂ alto. Además, el CO₂ elevado tendió a disminuir, con respecto a las plantas mantenidas a [CO₂] ambientales, el contenido de NO₃⁻ foliar un 18% en las plantas deficientes en N (Tabla 4.1.3.5a), pero proporcionalmente los niveles de NO₃⁻ fueron similares a los encontrados en la antesis en dichas condiciones. Lo cual pudo contribuir al mantenimiento de la pauta de cambio en la expresión de genes del metabolismo del C y N, y en el contenido de carbohidratos y compuestos nitrogenados foliares (Tablas 4.1.5a, 4.1.5c y 4.1.8a). Así, la expresión del gen que codifica la NR aumentó con el CO₂ alto y la actividad NR máxima tendió a aumentar un 24% en comparación con las plantas mantenidas a [CO₂] ambientales, al igual que la NR reductasa selectiva (Tabla 4.1.6.2a), aunque el contenido de aminoácidos apenas aumentó (Tabla 4.1.5a). A ello pudo contribuir posiblemente un aumento de su exportación al grano en desarrollo y/o una inducción de la biosíntesis de proteínas, puesto que tendieron a aumentar como se ha indicado anteriormente. En definitiva, los cambios inducidos por el CO₂ elevado en la expresión de genes del metabolismo primario en plantas deficientes en N pueden reflejar una respuesta de aclimatación para utilizar el N más eficientemente bajo CO₂ elevado cuando la disponibilidad de N es disminuida, lo cual pudo contribuir a aliviar la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado a diferencia de lo ocurrido en las plantas con abundancia de N.

Los cambios transcripcionales inducidos por el CO₂ elevado en la raíz fueron diferentes a los inducidos a nivel foliar en plantas con abundancia de nitrógeno y similares en las plantas deficientes en dicho nutriente en la antesis

Aun cuando la absorción de NO₃⁻ por unidad de masa de raíz no varió con el CO₂ elevado ni en plantas con un aporte de N alto ni bajo en la antesis, la expresión génica de los transportadores sí que fue modificada. Así, el CO₂ elevado redujo la expresión de los genes que codifican los transportadores de NO₃⁻ NRT1.1B y NRT1.3A, y, en menor medida, NAR2.1 y NAR2.2, a la vez que indujo notablemente la expresión del NRT1.7B en la raíz de plantas con deficiencia de N (Tabla 4.1.8b, Fig. 4.1.9e). Mientras que en plantas con abundancia de N, el CO₂ elevado aumentó la expresión génica de NRT1.1B, NRT1.3A, NRT2.3 y AMT1;2 y, en menor extensión, la de NRT1.1A, NRT1.2 y NRT2.1 (Fig. 4.1.9f). Son varias las isoformas descritas de transportadores de alta y baja afinidad de NO₃⁻ que participan en la absorción de dicho nutriente (Tsay *et al.*, 2007), y desconocemos la contribución potencial de todos ellos a la capacidad de absorción total de N en las plantas. Además, tanto el NO₃⁻ (Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004) como los azúcares (Feng *et al.*, 2011; de Jong *et al.*, 2014)

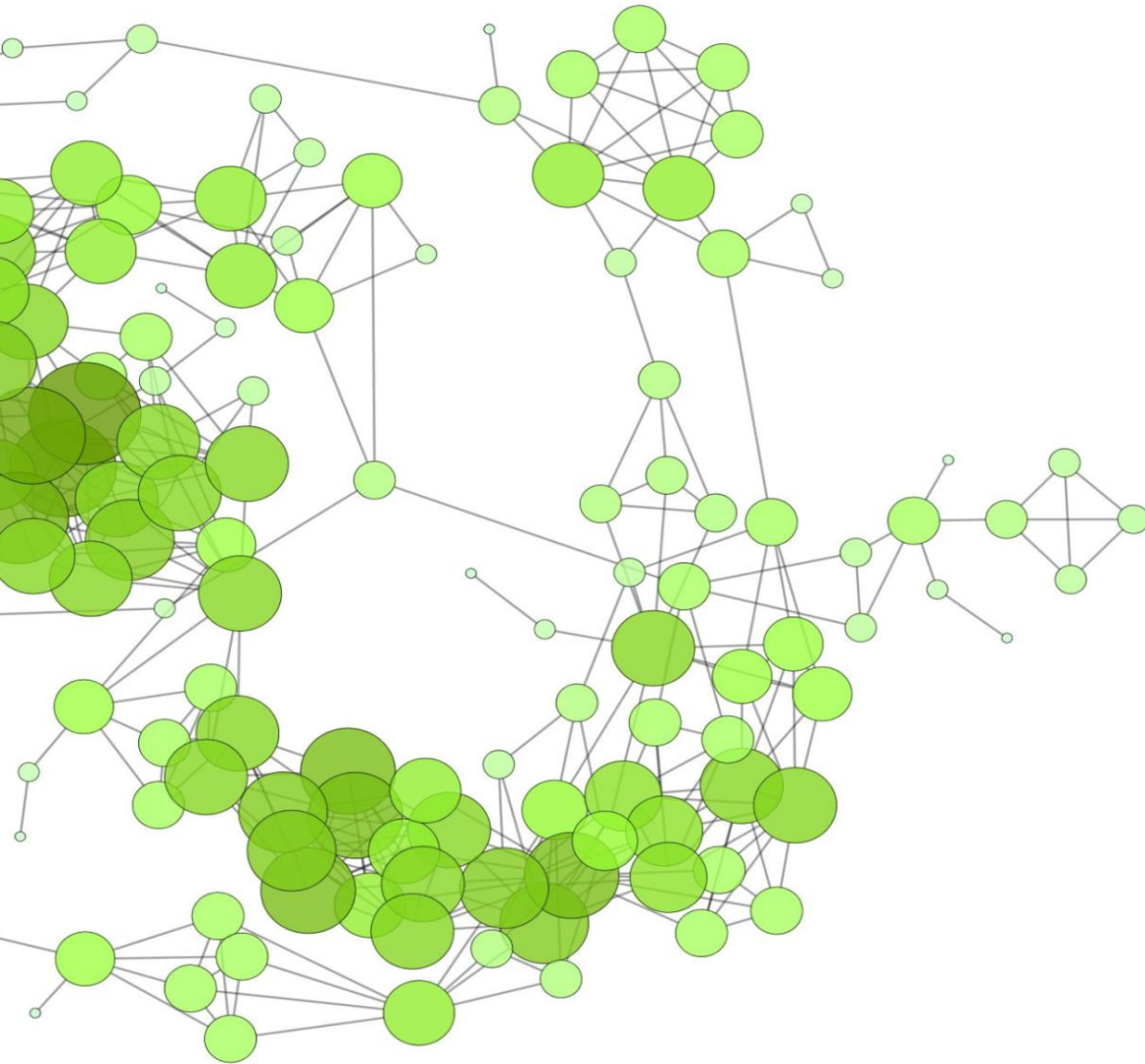
inducen la expresión de los transportadores, mientras que los metabolitos de la asimilación posterior del NO_3^- disminuyen su expresión, lo cual dificulta la evaluación de la posible contribución de dichas señales no sólo en la regulación transcripcional, sino también su repercusión en el nivel de proteína y actividad de los transportadores. El enriquecimiento en CO_2 reprimió los genes que codifican las subunidades grande y pequeña de la AGPasa en plantas deficientes en N, en conformidad con el descenso del contenido de almidón encontrado en dicho órgano (Tablas 4.1.5b, 4.1.5c y 4.1.8b). A su vez, aumentó levemente la expresión del gen que codifica la subunidad grande de dicho enzima en plantas con un aporte de N alto, aun a pesar de que el contenido radicular de almidón no varió. Los efectos descritos en la expresión de la AGPasa se asociaron con el aumento del contenido de NO_3^- inducido por el CO_2 elevado en plantas con deficiencia de N (Scheible *et al.*, 1997a), que se estimó, en comparación con las plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, en un 25%, aunque no llegó a alcanzar significación estadística (Tabla 4.1.3.5a). Mientras que en plantas con abundancia de N, los niveles de NO_3^- no variaron y algunos de los azúcares tendieron a aumentar (Tablas 4.1.5b y 4.1.5c), lo cual pudo influir en ese ligero aumento de transcritos de la AGPasa mayor aún si se compara con los observados en plantas deficientes en N. En la raíz de plantas con N abundante, la mayor acumulación de fructanos inducida por el CO_2 elevado se asoció con una inducción de la expresión de las FTs, muy posiblemente mediada por la acumulación de carbohidratos (Müller *et al.*, 2000). A diferencia de las plantas con deficiencia de N, en las que el descenso de fructanos inducido por el CO_2 elevado se relacionó con una disminución de la abundancia de transcritos para la 1-SST y, en menor medida, para las demás FTs, atribuible al aumento del contenido de NO_3^- en comparación con las plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, de acuerdo con Morcuende *et al.* (2004). Por otro lado, en el inicio del llenado del grano, el CO_2 elevado redujo la actividad NR máxima y selectiva en la raíz de plantas con un aporte de N alto, en parte debido a un descenso no significativo del estado de activación del enzima (Tabla 4.1.6.2a). Descenso que se asoció con una disminución del contenido de carbohidratos (Tablas 4.1.5b y 4.1.5c) y una acumulación del NO_3^- en la raíz (43%, Tabla 4.1.3.5a).

Uso de redes de correlación para identificar cambios coordinados entre parámetros del metabolismo del carbono y nitrógeno en respuesta a la $[\text{CO}_2]$, la disponibilidad de N y el estadio de desarrollo

Los principales resultados obtenidos a partir de las relaciones lineales entre parámetros fisiológicos y bioquímicos mostraron que a nivel foliar la fotosíntesis se relacionó positivamente tanto con la actividad y proteína Rubisco como con la actividad NR (Tabla 4.1.10a). Estos resultados reflejan la estrecha relación existente entre el metabolismo del C y N en las plantas, pues la Rubisco es el enzima que cataliza la fijación del CO_2 en la fotosíntesis, y la NR cataliza la reducción del NO_3^- que requiere energía generada en la fotosíntesis y esqueletos carbonados para la asimilación del N en compuestos orgánicos nitrogenados (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Además, la acumulación de carbohidratos foliares se relacionó con una disminución de la fotosíntesis (Araya *et al.*, 2010), probablemente debido a la alteración del balance C-N de la planta, como se indica más adelante. Un análisis más exhaustivo de las relaciones entre parámetros se consiguió con la construcción de redes de correlación, que permitieron vislumbrar posibles corregulaciones entre genes, metabolitos, proteínas y parámetros fisiológicos. La visualización de la red mostró que la acumulación de carbohidratos, a su vez, pudo relacionarse con una limitación en el uso de fotoasimilados como consecuencia de la pérdida de N de la planta, dado que se relacionó negativamente con el contenido de N foliar y los compuestos orgánicos nitrogenados, como los aminoácidos, proteínas y Rubisco (Araya *et al.*, 2010) (Tabla

4.1.10a, Fig. 4.1.10b). No obstante, un aumento de carbohidratos también se correlacionó con una represión de genes fotosintéticos (Drake *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1999). La mayoría de genes involucrados en el metabolismo del N se corregularon entre sí, dada la coordinación existente entre la absorción de N del suelo y su asimilación posterior en compuestos orgánicos nitrogenados (Scheible *et al.*, 2004). El patrón de corregulaciones en la raíz fue bastante similar al de las hojas. Es de destacar que un aumento de la concentración de NO_3^- se relacionó negativamente con la expresión de algunos genes del metabolismo de carbohidratos (Fig. 4.1.10b).

CAPÍTULO 5: Experimento 2



5.1. Resultados del experimento 2

5.1.1. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el crecimiento de las plantas

5.1.1.1. Peso seco de las diferentes partes de la planta

En la antesis, el crecimiento en CO₂ elevado aumentó, con respecto a las plantas crecidas en CO₂ ambiente, la biomasa de la parte aérea, de la raíz y de la planta entera cuando el aporte de N fue bajo (Tabla 5.1.1.1a). Mientras que en plantas con N abundante, el CO₂ elevado disminuyó la biomasa de la hoja bandera y no tuvo efecto significativo en el peso seco del resto de las partes de la planta analizadas ni en el total de la misma. No se observaron cambios significativos en la relación parte aérea:raíz con el CO₂ de crecimiento. La mayor disponibilidad de N aumentó el peso seco de todas las partes de la planta y la relación parte aérea:raíz (Tabla 5.1.1.1a).

Tabla 5.1.1.1a. Peso seco (g) de las diferentes partes y relación parte aérea:raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=8).

	AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Hoja bandera	0,093	0,099	0,236	0,197	<0,001	0,012	0,193	0,010	0,003	0,023
Parte aérea	5,48	6,84	22,27	23,15	<0,001	1,38	0,005	0,89	0,505	2,75
Raíz	1,60	1,94	3,81	3,92	<0,001	0,27	0,007	0,24	0,676	0,52
Planta	7,08	8,78	26,09	27,07	<0,001	1,61	0,004	1,07	0,522	3,20
Parte aérea:raíz	3,44	3,54	5,87	5,93	<0,001	0,28	0,573	0,38	0,768	0,44

5.1.1.2. Contenido de agua de las diferentes partes de la planta

El aumento de la [CO₂] de crecimiento no tuvo ningún efecto significativo en el contenido de agua de las diferentes partes de la planta (Tabla 5.1.1.2a). El contenido de agua de la parte aérea, la raíz y la planta entera aumentó con una disponibilidad de N alta (Tabla 5.1.1.2a).

Tabla 5.1.1.2a. Contenido de agua (%) de las diferentes partes de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=8).

	AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Hoja bandera	69,58	70,00	70,27	70,24	0,389	1,09	0,515	1,34	0,979	1,85
Parte aérea	75,89	74,82	79,93	79,51	<0,001	0,88	0,157	1,54	0,391	1,03
Raíz	87,83	88,08	90,15	90,25	<0,001	0,54	0,542	0,87	0,769	0,71
Planta	80,27	79,79	82,59	82,35	<0,001	0,74	0,443	1,28	0,571	0,88

5.1.1.3. Peso seco por área foliar

El CO₂ elevado condujo a un incremento del peso seco por área foliar en plantas con un suministro deficiente en N y no tuvo efecto en aquellas con N abundante (Tabla 5.1.1.3a). El mayor aporte de N aumentó el peso seco por área foliar, lo que indicaría que las hojas tenían un mayor grosor.

Tabla 5.1.1.3a. Peso seco por área foliar ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=8$).

	AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
PS/A _{foliar}	57,0	65,2	70,1	73,5	<0,001	5,9	0,045	8,0	0,439	9,4

5.1.1.4. Número de tallos por planta y longitud de la raíz

El CO_2 elevado aumentó el número de tallos (mayor ahijamiento) y disminuyó la longitud de la raíz tanto en plantas con un aporte de N bajo como alto (Tabla 5.1.1.4a). La abundancia de N indujo los mismos cambios que el CO_2 elevado.

Tabla 5.1.1.4a. Número de tallos por planta y longitud de la raíz (cm) de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=8$).

	AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
Tallos totales	5,8	7,1	15,9	18,2	<0,001	1,1	0,010	1,0	0,032	2,1
Longitud raíz	70,7	61,7	39,8	34,4	<0,001	3,4	0,039	8,3	0,019	4,3

5.1.2. Efecto del CO_2 de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la absorción de solución nutritiva y nitrato

En plantas con un aporte alto de N, el CO_2 elevado redujo la absorción de solución nutritiva por unidad de masa de raíz y por planta a las 4 h de incubación (Tabla 5.1.2a). El mayor aporte de N incrementó la absorción de solución por unidad de masa de raíz a las 24 h y por planta a las 4 y 24 h. El CO_2 elevado no afectó significativamente a la absorción de NO_3^- , aunque la redujo un 15% por unidad de masa de raíz en las plantas deficientes en N a las 24 h ($P=0,142$; Tabla 5.1.2a). Además, la absorción de NO_3^- acumulativa durante todo el experimento no varió con el CO_2 de crecimiento para cada nivel de N (Fig. 5.1.2a). La absorción de NO_3^- aumentó notablemente cuando el suministro de N a las plantas fue mayor, expresado tanto por peso seco de raíz como por planta a las 4 y 24 h de incubación (Tabla 5.1.2a), al igual que durante todo el experimento (Fig. 5.1.2a). Es importante indicar que, después del periodo de incubación de 24 h, la solución nutritiva presentaba un 19% y 17% del NO_3^- inicial suministrado a las plantas con un aporte bajo y alto de N, respectivamente.

Tabla 5.1.2a. Solución absorbida por unidad de peso seco de raíz ($\text{mL}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) y por planta ($\text{mL}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), y nitrato absorbido por unidad de peso seco de raíz ($\text{mmol}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) y por planta ($\text{mmoles}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) en trigo cultivado en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ ($n=4$).

	AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}	
Solución absorbida											
Por raíz	4 h	9,27	5,92	16,09	10,43	0,067	6,13	0,554	13,07	0,018	4,30
	24 h	43,53	34,39	69,61	59,71	<0,001	8,14	0,136	12,99	0,108	12,85
Por planta	4 h	16,33	12,17	66,83	41,67	<0,001	11,65	0,679	23,46	0,002	11,59
	24 h	65,83	64,83	236,67	223,92	<0,001	15,75	0,936	29,37	0,165	19,73
NO_3^- absorbido											
Por raíz	4 h	0,118	0,106	0,168	0,169	<0,001	0,023	0,199	0,020	0,974	0,046
	24 h	0,261	0,221	1,183	1,212	<0,001	0,183	0,142	0,058	0,870	0,408
Por planta	4 h	0,194	0,215	0,703	0,671	<0,001	0,057	0,168	0,031	0,557	0,125
	24 h	0,396	0,402	3,959	4,564	<0,001	0,303	0,237	0,012	0,072	0,680

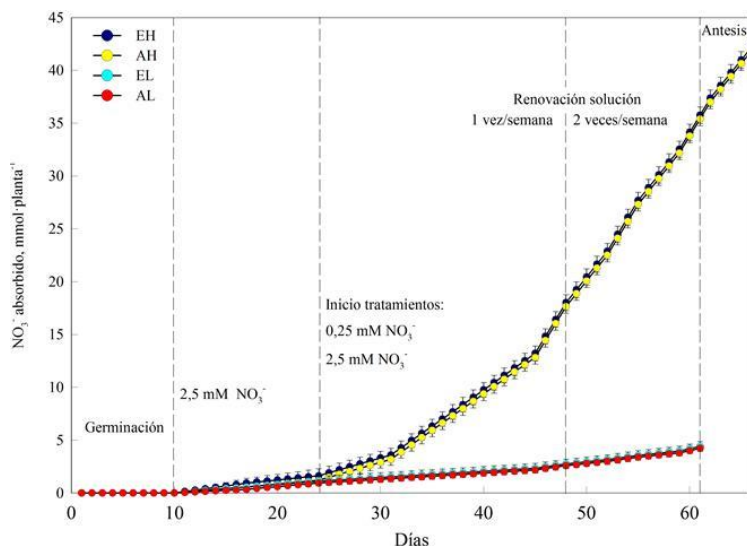


Fig. 5.1.2a. Nitrato acumulativo absorbido por planta hasta la antesis en plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻). Las líneas verticales representan la desviación estándar (n=6).

5.1.3. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de nitrato de la planta y en el contenido de nitrógeno orgánico por superficie foliar

Se midió el contenido de NO₃⁻ en la planta a las 24 h de incubación y, a su vez, el porcentaje del N correspondiente al NO₃⁻ sobre el contenido de N total como medida del N inorgánico sin asimilar en la planta (Fig. 5.1.3a). El CO₂ elevado aumentó, con respecto a las plantas en CO₂ ambiente, un 28% el contenido de NO₃⁻ y un 23% la razón NO₃⁻-N/N total en las plantas con un aporte de N deficiente. Por el contrario, el CO₂ elevado redujo el contenido de NO₃⁻ en un 29% y tendió a disminuir la razón NO₃⁻-N/N en plantas con un aporte de N abundante. La mayor disponibilidad de N incrementó ambos parámetros en la planta entera. El enriquecimiento en CO₂ redujo el contenido de N orgánico (contenido total de N menos el contenido del N correspondiente al NO₃⁻) por superficie foliar en la hoja bandera de plantas con un aporte de N bajo a las 24 h (Tabla 5.1.3a). Un mayor aporte de N condujo a una mayor concentración de N orgánico por superficie foliar a las 4 y 24 h.

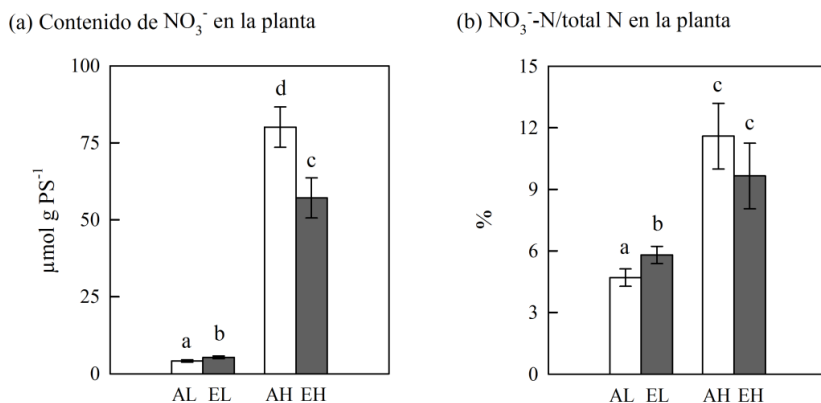


Fig. 5.1.3a. (a) Contenido de NO₃⁻ y (b) porcentaje del N en el nitrato sobre el contenido de N total (NO₃⁻-N/N total, %) en el total de la planta en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 24 h de incubación en la antesis. Las líneas verticales representan la l.s.d. del efecto del CO₂ × N (n=4). Las barras con distinta letra muestran diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 5.1.3a. Contenido de N orgánico por superficie foliar (N_A , $g \cdot m^{-2}$) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu mol \cdot mol^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	P_{CO_2L}	lsd _{CO₂L}	P_{CO_2H}	lsd _{CO₂H}
N orgánico por superficie foliar	4h	2,02	2,06	2,85	2,57	<0,001	0,28	0,895	0,57	0,080	0,32
	24h	2,35	1,85	3,60	3,30	<0,001	0,33	0,018	0,37	0,299	0,67

5.1.4. Efecto del CO_2 de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el intercambio gaseoso

Los parámetros de intercambio gaseoso se midieron en la hoja bandera a una $[CO_2]$ de 390 y 700 $\mu mol \cdot mol^{-1}$ y a dos intensidades luminosas, una próxima a la de crecimiento de las plantas durante el experimento (300 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) y otra saturante (1.000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). El CO_2 elevado influyó de forma significativa en todos los parámetros de intercambio gaseoso analizados en las plantas con un aporte de N bajo pero no en aquellas con un aporte alto de dicho nutriente (Tabla 5.1.4a). Así, en plantas deficientes en N, el CO_2 elevado condujo a un descenso de A_n , g_s , E y C_i con independencia de la concentración de CO_2 o de la intensidad luminosa de medida. En plantas con N alto, el CO_2 elevado tendió a disminuir A_n cuando se midió a 700 $\mu mol CO_2 \cdot mol^{-1}$ y 1.000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ de intensidad luminosa ($P=0,053$). En plantas con abundancia de N aumentaron todos los parámetros de intercambio gaseoso con respecto a aquellas deficientes en N (Tabla 5.1.4a).

Tabla 5.1.4a. Parámetros de intercambio gaseoso medidos a 390 y 700 $\mu mol \cdot mol^{-1}$ de CO_2 y a 300 y 1.000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ de intensidad luminosa en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu mol \cdot mol^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-). A_n , asimilación fotosintética del carbono ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$); g_s , conductancia estomática ($mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$); E, transpiración ($mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$); C_i , concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu mol \cdot mol^{-1}$). Los parámetros se midieron a 20 °C y 0,89 ± 0,13 kPa de déficit de presión de vapor. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=6).

	PAR	$[CO_2]$	AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	P_{CO_2L}	lsd _{CO₂L}	P_{CO_2H}	lsd _{CO₂H}
A_n	300	390	8,30	6,36	8,16	8,35	0,006	0,62	0,002	1,05	0,624	0,82
		700	11,36	9,80	11,41	11,43	0,017	0,67	0,008	1,06	0,958	0,97
	1000	390	13,08	9,00	14,92	14,05	<0,001	1,47	0,002	2,26	0,396	2,19
		700	22,10	16,94	25,23	22,87	<0,001	1,90	0,006	3,28	0,053	2,40
g_s	300	390	213,4	111,2	231,7	189,9	0,003	30,1	<0,001	42,5	0,083	48,3
		700	197,8	120,1	230,0	200,7	0,001	30,7	0,002	42,7	0,219	49,7
	1000	390	187,1	99,7	204,6	171,1	0,003	27,2	<0,001	37,9	0,121	44,1
		700	181,7	106,8	205,6	186,8	<0,001	27,6	0,002	40,0	0,356	43,2
E	300	390	1,61	0,99	1,77	1,52	0,002	0,20	<0,001	0,27	0,119	0,33
		700	1,67	1,07	1,86	1,70	0,004	0,26	0,005	0,37	0,413	0,42
	1000	390	1,91	1,18	2,11	1,83	0,002	0,25	<0,001	0,34	0,154	0,40
		700	1,92	1,27	2,08	2,12	0,001	0,29	0,007	0,43	0,827	0,43
C_i	300	390	316,5	287,4	329,8	311,5	0,003	11,4	0,001	14,5	0,063	19,5
		700	598,4	556,0	622,6	603,9	<0,001	19,0	0,006	27,4	0,195	29,9
	1000	390	259,4	230,8	259,9	242,3	0,464	16,7	0,011	20,4	0,210	29,3
		700	478,8	423,1	485,7	480,6	0,042	30,9	0,007	36,8	0,841	54,7

La respuesta de aclimatación de la A_n al CO_2 elevado fue más acusada en plantas con un aporte de N bajo que en aquellas con un aporte alto (Tabla 5.1.4b). La respuesta directa fue similar con ambas disponibilidades de N y mostró una estimulación de la fotosíntesis con un aumento del CO_2 . De este

modo, la respuesta neta de la A_n al CO_2 elevado fue menor en plantas con un aporte de N bajo que con alto, condicionado por las diferencias en la respuesta de aclimatación.

Tabla 5.1.4b. Respuestas de aclimatación, directa y neta de la velocidad de asimilación fotosintética del carbono al CO_2 elevado en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía con suministro bajo o alto de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) en la antesis. Se indica el valor medio \pm la desviación estándar (n=6).

	PAR	L	H
Respuesta aclimatación [A(e,E)/A(a,E)]	300	0,86 \pm 0,09	1,00 \pm 0,08
	1000	0,74 \pm 0,13	0,91 \pm 0,04
Respuesta directa [A(a,E)/A(a,A)]	300	1,37 \pm 0,07	1,40 \pm 0,05
	1000	1,69 \pm 0,06	1,69 \pm 0,07
Respuesta neta [A(e,E)/A(a,A)]	300	1,18 \pm 0,12	1,41 \pm 0,15
	1000	1,29 \pm 0,22	1,54 \pm 0,04

Las plantas que crecieron a $[\text{CO}_2]$ elevadas, independientemente de la disponibilidad de N, mostraron una mejora de la eficiencia en el uso de agua y del N en la fotosíntesis (Tabla 5.1.4c). Un aumento de la disponibilidad de N condujo a un descenso de ambas eficiencias.

Tabla 5.1.4c. Eficiencia en el uso del agua (WUE, $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$) y del nitrógeno en la fotosíntesis (PNUE, $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g N}^{-1}$) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-). P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=4 para PNUE, n=6 para WUE). Para los cálculos de PNUE se consideró el nitrógeno foliar por área a las 24 h de muestreo.

	PAR	AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
WUE	300	5,19	9,58	4,64	7,15	0,029	1,32	<0,001	1,93	0,022	2,07
	1000	6,90	13,70	7,14	11,05	0,045	1,17	<0,001	1,60	0,001	1,93
PNUE	300	3,80	5,23	2,41	3,39	<0,001	0,43	0,001	0,60	0,004	0,53
	1000	5,93	9,04	4,39	6,96	<0,001	0,71	<0,001	1,05	<0,001	0,77

5.1.5. Efecto del CO_2 de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la fluorescencia de la clorofila

Los valores absolutos de la medida de la fluorescencia de la clorofila, como F_o y F_o' , se omitieron al aportar poca información y poder cambiar acusadamente con el contenido de clorofila, lo que afectaría a la comparación entre tratamientos (Barbagallo *et al.*, 2003). El CO_2 elevado redujo la eficiencia operativa del PSII, principalmente por un descenso no significativo de la fracción de centros abiertos del PSII más que por la eficiencia fotoquímica máxima, e incrementó la extinción no fotoquímica en plantas con un aporte de N bajo, con un CO_2 de referencia en la medida de 390 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$. Un menor aporte de N condujo a un descenso de la eficiencia cuántica máxima y la eficiencia fotoquímica máxima del PSII, y a un aumento de la extinción no fotoquímica con ambas $[\text{CO}_2]$ de referencia en la medida.

Tabla 5.1.5a. Parámetros de la fluorescencia de la clorofila (eficiencia cuántica máxima, $F_v:F_m$; fracción de centros abiertos del PSII, q_L ; eficiencia fotoquímica máxima del PSII, Φ_{qL} ; eficiencia operativa del PSII, $F_q':F_m'$; extinción no fotoquímica, Φ_{NPQ}) de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) a las 4 y 24 h del cambio de solución nutritiva en la antesis. Los parámetros se midieron a 390 y 700 $\mu\text{mol } CO_2\cdot\text{mol}^{-1}$, 1.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y 20 °C. P , probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P<0,05$ (n=6).

	[CO ₂]	AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	P_{CO_2L}	lsd _{CO₂L}	P_{CO_2H}	lsd _{CO₂H}
$F_v:F_m$	390	0,812	0,814	0,823	0,824	0,001	0,006	0,603	0,010	0,925	0,008
	700	0,815	0,810	0,825	0,823	0,008	0,008	0,300	0,011	0,728	0,012
q_L	390	0,591	0,551	0,536	0,429	0,080	0,100	0,424	0,108	0,226	0,185
	700	0,616	0,639	0,578	0,544	0,070	0,073	0,720	0,137	0,323	0,073
Φ_{qL}	390	0,970	0,952	1,038	1,130	0,021	0,103	0,821	0,176	0,145	0,130
	700	0,926	0,843	0,997	1,079	0,009	0,110	0,350	0,189	0,225	0,140
$F_q':F_m'$	390	0,568	0,513	0,556	0,573	0,060	0,025	0,016	0,042	0,266	0,033
	700	0,566	0,523	0,574	0,580	0,065	0,034	0,196	0,069	0,565	0,023
Φ_{NPQ}	390	0,293	0,354	0,299	0,252	0,013	0,037	0,019	0,049	0,121	0,061
	700	0,302	0,353	0,288	0,268	0,027	0,044	0,231	0,088	0,172	0,030

5.1.6. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de compuestos del metabolismo del carbono y del nitrógeno

5.1.6.1. Contenido de nucleótidos de adenina y piridina en la hoja bandera y la raíz

El enriquecimiento en CO₂ redujo el contenido foliar de ATP, ADP, AMP y NADP en plantas con deficiencia de N a las 24 h de incubación (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). En plantas con N abundante, el CO₂ elevado disminuyó el contenido de ATP y la razón ATP:ADP a las 4 h y aumentó el contenido de ADP a las 24 h. La abundancia de N indujo el aumento de ATP, AMP, NAD y la razón ATP:ADP, y el descenso de ADP y NADP a las 4 y 24 h, excepto el NAD a las 24 h (Tabla 5.1.6a).

En la raíz, el CO₂ elevado disminuyó el contenido de ATP y la razón ATP:ADP en plantas con deficiencia de N a las 24 h (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). En plantas con N alto, el CO₂ elevado aumentó el contenido de ADP, AMP y NADP y disminuyó la razón ATP:ADP a las 4 h, mientras que aumentó el contenido de ATP, ADP y NAD a las 24 h. Un mayor aporte de N aumentó el contenido de todos los nucleótidos y la razón ATP:ADP en ambos periodos de incubación, excepto esta última a las 24 h (Tabla 5.1.6b).

5.1.6.2. Contenido foliar de clorofilas

El CO₂ elevado no tuvo un efecto significativo en el contenido de clorofilas en las plantas deficientes en N, aunque tendió a disminuirlas levemente a las 24 h (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Mientras que en plantas con N abundante, el CO₂ alto aumentó la razón chl a:b a las 24 h. Por otro lado, la abundancia de N aumentó el contenido de clorofilas a las 4 y 24 h de incubación (Tabla 5.1.6a).

5.1.6.3. Contenido de metabolitos del ciclo de Calvin-Benson y de la síntesis de carbohidratos en la hoja bandera y la raíz

El CO₂ elevado favoreció la acumulación de S6P y fructosa a las 24 h y de almidón, sacarosa, fructanos, CST y T6P a las 4 y 24 h, mientras que disminuyó el contenido de FBP, RuBP y SBP

($P=0,052$) a las 24 h en la hoja bandera de plantas con N bajo (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Con un mayor suministro de N, el CO₂ elevado indujo un aumento del contenido de F6P, G6P, glucosa, fructosa, fructanos y CST a las 4 h, de FBP, SBP, RuBP, almidón y T6P a las 24 h, y de DHAP, ADP-glucosa y S6P tanto a las 4 h como a las 24 h. La abundancia de N redujo los niveles de DHAP, F6P y ADP-glucosa a las 4 h, de fructosa a las 24 h, y de FBP, SBP, S7P, RuBP, G6P, G1P, HPs, almidón, S6P, sacarosa, fructanos, CST, T6P y la razón T6P:sacarosa a las 4 y 24 h, mientras que aumentó el contenido de Ru5P + Xu5P a las 4 h y 3PGA a las 24 h (Tablas 5.1.6a). La GBP no se detectó en hojas pero sí en la raíz en cantidades ínfimas.

En la raíz, el crecimiento en CO₂ elevado condujo, con respecto a las plantas en CO₂ ambiente, a un aumento del contenido de almidón, fructanos y CST a las 4 h y de 3PGA, FBP, S7P, R5P, F6P, fructosa, fructanos y CST a las 24 h, junto a un descenso de RuBP, glucosa y fructosa a las 4 h y de ADP-glucosa a las 24 h en plantas deficientes en N (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). Mientras que en plantas con abundancia de N, el CO₂ elevado indujo la acumulación de GBP a las 4 h, de FBP, SBP, R5P, Ru5P + Xu5P, S6P y T6P a las 24 h, y de ADP-glucosa, glucosa, fructosa, sacarosa, fructanos y CST a las 4 y 24 h. El mayor aporte de N aumentó el contenido de 3PGA, FBP, SBP, ADP-glucosa y S6P a las 24 h y de DHAP, S7P, R5P, Ru5P + Xu5P, F6P, G6P, G1P, HPs, GBP, UDP-glucosa, glucosa y fructosa tanto a las 4 h como a las 24 h (Tablas 5.1.6b). A la vez que redujo el contenido de RuBP y sacarosa a las 4 h, de almidón y la razón T6P:sacarosa a las 24 h, y de fructanos, CST y T6P a las 4 y 24 h.

5.1.6.4. Contenido de metabolitos de la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ácidos orgánicos en la hoja bandera y la raíz

A nivel foliar, el enriquecimiento en CO₂ facilitó la acumulación de Gal6P a las 4 h y disminuyó el contenido de piruvato, 2-oxoglutarato y Man6P a las 4 h y de PEP, ácido siquímico, citrato, aconitato y malato a las 24 h en plantas con un aporte de N bajo (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). En plantas con N alto, el CO₂ elevado redujo los niveles de aconitato a las 4 h y aumentó los de PEP y succinato a las 24 h y de ácido siquímico a las 4 y 24 h. La abundancia de N indujo un aumento de citrato, aconitato, isocitrato, fumarato, malato y glicerato a las 4 h, y de 2PGA, citrato, aconitato, isocitrato y malato a las 24 h, además de un descenso de PEP, ácido siquímico, succinato y Gal6P a las 4 h, y de PEP, ácido siquímico, 2-oxoglutarato, succinato y Man6P a las 24 h (Tabla 5.1.6a).

En la raíz, el CO₂ elevado disminuyó el contenido de piruvato y aumentó el de Gly3P a las 4 h, a la vez que aumentó los niveles de ácido siquímico, citrato, aconitato y malato a las 24 h en plantas con deficiencia de N (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). En plantas con N abundante, el CO₂ elevado aumentó el contenido de ácido siquímico y malato a las 4 h y el de PEP, piruvato, citrato, aconitato, isocitrato, fumarato, malato y glicerato a las 24 h. Además, la abundancia de N aumentó, en comparación con las plantas deficientes en N, los niveles de citrato, aconitato, succinato y malato a las 4 h, de 2PGA a las 24 h, y de PEP, piruvato, isocitrato, 2-oxoglutarato, fumarato, Gal6P, Gly3P, Man6P y glicerato a las 4 y 24 h, y redujo el contenido de aconitato a las 24 h (Tabla 5.1.6b).

5.1.6.5. Contenido de aminoácidos en la hoja bandera y la raíz

En este experimento se midieron tanto los niveles de cada aminoácido individualmente por HPLC, con excepción de la Pro y Cys, como el contenido total de aminoácidos por un método colorimétrico. No obstante, la Asn no se detectó convenientemente en las hojas por la proximidad en la separación a la Ser y, dada su menor cuantía, el pico en el cromatograma era mucho más pequeño, lo cual dificultaba la delimitación exacta de su área. Por ello, su estimación resultaba arbitraria y errática, y se optó por excluirla en este tejido. Cabe indicar que por las limitaciones de cada una de las metodologías utilizadas para la estimación de los aminoácidos, en algunos casos pudo no existir una estrecha relación entre ambos resultados.

El enriquecimiento en CO₂ disminuyó el contenido de aminoácidos totales en la hoja bandera de plantas deficientes en N tanto a las 4 h como a las 24 h (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Asimismo, el CO₂ alto aumentó los niveles de aminoácidos minoritarios como Gly, Val e His y redujo los de alguno de los mayoritarios como Gln a las 4 h, mientras que a las 24 h condujo a un descenso generalizado de los aminoácidos, particularmente de Ser, Gly, Phe, Glu, Arg, Gln, Met y Thr. En las plantas con un suministro alto de N, la disminución de aminoácidos totales inducida por el CO₂ elevado a las 4 h se acompañó de un descenso de Ser, Tyr, Phe, Leu, Glu, Arg, His, Thr e Ile (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Mientras que a las 24 h, el aumento del contenido de Ala y el descenso del contenido de Ser, Gly, Arg, His, Lys y Thr, no modificaron el contenido total de aminoácidos foliares. La abundancia de N condujo a un aumento de Ser, Tyr, Phe, Leu, Val, Glu, Arg, His, Lys, Thr e Ile, junto a un descenso de Gln y aminoácidos totales a las 4 h (Tabla 5.1.6a). A las 24 h, el N alto produjo un descenso del contenido total e individual, excepto de Trp y Tyr, de aminoácidos.

Por último, el CO₂ elevado disminuyó el contenido de aminoácidos totales y Asn a las 4 h en la raíz de las plantas con N deficiente (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). En plantas con N abundante, el CO₂ alto condujo a un descenso de aminoácidos totales y Ser, Leu, Val, Arg, Asn, Lys, Thr e Ile a las 4 h, y de aminoácidos totales y Ser, Trp, Ala, Glu, His, Asp y Thr, excepto un aumento de Ala, a las 24 h (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). El mayor aporte de N aumentó significativamente el contenido de aminoácidos totales y de los distintos aminoácidos a las 4 y 24 h, a excepción del descenso de Asn a las 24 h y de que el contenido de Gly y Gln no varió a las 4 h (Tabla 5.1.6b).

Tabla 5.1.6a. Contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, P<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Energía y poder reductor											
ATP	4 h	194,9	175,5	234,8	199,2	0,006	20,6	0,161	29,7	0,050	35,5
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	190,1	141,9	197,6	197,7	0,021	25,9	0,038	44,0	0,991	41,1
ADP	4 h	26,15	23,31	16,89	21,44	0,003	3,19	0,233	5,37	0,068	5,04
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	28,12	22,58	18,48	27,83	0,050	2,19	0,014	3,98	<0,001	2,59
AMP	4 h	15,80	14,09	32,11	22,99	0,001	6,04	0,124	2,45	0,128	12,85
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	26,73	17,75	42,81	51,65	<0,001	9,68	0,022	7,13	0,354	22,24
NAD	4 h	45,45	43,43	51,00	54,05	0,002	4,55	0,532	7,47	0,327	6,99
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	60,70	59,94	52,18	60,58	0,197	6,32	0,726	5,24	0,155	12,65
NADP	4 h	16,17	16,33	11,49	11,51	0,008	3,23	0,951	6,08	0,989	3,70
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	18,04	14,21	11,10	13,97	0,004	2,11	0,035	3,42	0,093	3,63
ATP:ADP	4 h	8,04	7,68	15,77	9,41	0,002	2,61	0,694	2,18	0,029	5,43
	24 h	5,69	5,73	11,59	8,00	0,003	2,35	0,974	3,22	0,082	4,20
Clorofilas											
Chl a	4 h	0,296	0,286	0,525	0,487	<0,001	0,028	0,579	0,042	0,121	0,054
(g·m ⁻²)	24 h	0,384	0,315	0,496	0,469	0,002	0,069	0,148	0,103	0,586	0,121
Chl b	4 h	0,082	0,072	0,187	0,177	<0,001	0,013	0,324	0,022	0,224	0,020
(g·m ⁻²)	24 h	0,121	0,092	0,175	0,133	0,004	0,029	0,127	0,041	0,093	0,052
Chl total	4 h	0,378	0,358	0,712	0,663	<0,001	0,032	0,309	0,044	0,102	0,064
(g·m ⁻²)	24 h	0,504	0,407	0,671	0,602	0,002	0,095	0,138	0,142	0,334	0,167
Chl a:b	4 h	3,28	3,57	2,77	2,76	<0,001	0,28	0,255	0,62	0,963	0,31
	24 h	3,24	3,27	2,83	3,27	0,033	0,18	0,812	0,29	0,018	0,31
Ciclo de Calvin-Benson y síntesis de carbohidratos											
3PGA	4 h	782,5	664,5	643,0	809,5	0,963	128,3	0,173	186,9	0,112	219,2
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	665,8	720,4	777,8	913,1	0,039	143,2	0,641	272,5	0,101	170,8
DHAP	4 h	73,23	75,67	43,26	72,49	0,005	10,15	0,744	18,12	0,004	14,83
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	70,28	82,49	53,29	73,18	0,060	13,82	0,327	28,86	0,019	15,37
FBP	4 h	6,52	5,16	1,56	2,58	<0,001	1,29	0,208	2,53	0,222	1,84
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	4,24	2,47	1,12	1,95	<0,001	0,66	0,015	1,29	0,036	0,75
SBP	4 h	15,32	15,95	4,50	7,26	<0,001	2,79	0,726	4,20	0,196	4,64
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	15,35	11,36	3,50	7,32	<0,001	2,30	0,052	4,03	0,028	3,24
S7P	4 h	85,24	68,72	58,45	69,29	0,038	12,19	0,152	25,18	0,077	12,54
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	101,48	92,40	68,94	83,65	0,002	11,08	0,133	13,04	0,132	20,68
R5P	4 h	6,86	6,09	5,86	6,13	0,098	0,59	0,098	0,96	0,465	0,95
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	8,12	7,53	6,22	7,87	0,216	1,31	0,527	2,17	0,091	2,03
Ru5P + Xu5P	4 h	308,8	319,3	476,9	479,7	<0,001	58,1	0,803	98,3	0,933	86,9
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	442,6	448,6	412,0	446,9	0,550	57,3	0,875	88,2	0,398	93,8
RuBP	4 h	14,96	16,03	1,81	1,66	<0,001	2,28	0,603	5,23	0,811	1,65
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	24,27	8,17	0,94	4,09	<0,001	2,22	<0,001	4,90	0,003	1,49
F6P	4 h	128,38	121,33	92,35	120,34	0,047	18,23	0,635	35,82	0,025	23,18
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	136,68	142,57	111,30	121,13	0,052	23,66	0,739	41,37	0,498	33,34
G6P	4 h	246,8	221,5	183,0	222,2	0,010	22,2	0,136	36,8	0,034	34,9
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	216,9	245,6	190,3	202,2	0,040	33,1	0,311	63,6	0,479	38,4
G1P	4 h	141,54	134,91	110,76	112,32	0,033	24,02	0,718	44,61	0,913	33,36
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	143,44	142,48	95,80	90,15	<0,001	18,31	0,948	34,34	0,564	22,65
HPs	4 h	516,8	477,7	386,2	454,8	0,019	61,6	0,416	113,2	0,101	86,7
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	497,0	530,7	397,4	413,4	0,003	63,6	0,498	114,3	0,664	85,7
ADP-glucosa	4 h	2,36	1,50	1,09	1,53	0,040	0,58	0,127	1,19	0,049	0,43
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,90	1,54	1,18	1,72	0,115	0,35	0,275	0,76	0,002	0,25
Almidón	4 h	11,15	15,40	5,96	6,64	<0,001	1,46	0,009	2,63	0,446	2,12
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	3,87	12,47	1,87	2,53	<0,001	1,89	0,002	3,99	0,025	0,54
UDP-glucosa	4 h	78,17	67,74	84,93	81,91	0,146	14,66	0,329	24,02	0,754	22,53
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	94,90	89,59	90,58	97,51	0,758	12,52	0,602	23,57	0,269	14,34
S6P	4 h	7,18	9,80	3,83	5,54	0,006	2,47	0,261	5,18	0,007	1,01
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	7,97	11,35	3,25	6,01	<0,001	1,30	0,019	2,59	0,001	1,11
Glucosa	4 h	1,57	1,58	1,41	1,83	0,718	0,28	0,983	0,48	0,042	0,40
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,45	1,37	1,24	1,28	0,311	0,30	0,659	0,43	0,880	0,53
Fructosa	4 h	1,18	1,43	0,92	1,72	0,906	0,26	0,104	0,33	0,006	0,48
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,96	1,75	0,97	1,15	0,025	0,25	0,003	0,42	0,302	0,39
Sacarosa	4 h	22,34	30,23	20,52	22,76	0,002	2,42	0,010	4,98	0,071	2,52
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	25,95	33,68	24,25	29,10	0,040	2,98	0,003	4,02	0,078	5,64
Fructanos	4 h	21,26	58,58	3,58	8,74	<0,001	7,96	0,002	16,76	0,006	2,92
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	20,17	59,12	9,20	10,73	<0,001	10,96	0,007	23,49	0,630	7,38
CST	4 h	68,68	122,05	46,96	57,82	<0,001	7,74	<0,001	16,43	0,003	5,68
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	74,48	129,61	59,91	71,36	<0,001	10,95	<0,001	19,33	0,115	15,22
T6P	4 h	1,33	1,81	0,60	0,92	<0,001	0,22	0,026	0,39	0,068	0,35
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,55	1,95	0,74	1,00	<0,001	0,15	0,011	0,25	0,035	0,24
T6P:sacarosa	4 h	0,047	0,057	0,029	0,038	0,008	0,012	0,335	0,023	0,206	0,015
(nmol·μmol ⁻¹)	24 h	0,065	0,063	0,030	0,032	<0,001	0,010	0,837	0,022	0,712	0,008
Glicólisis, ciclo TCA y ácidos orgánicos											
2PGA	4 h	30,91	16,03	27,17	28,32	0,240	7,56	0,051	15,00	0,775	9,46
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	17,56	20,17	27,16	34,47	<0,001	5,68	0,183	4,24	0,187	12,03
PEP	4 h	26,27	18,02	3,20	7,21	<0,001	5,51	0,090	10,13	0,211	7,49
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	25,50	8,05	2,51	5,99	<0,001	4,07	0,008	9,80	0,043	3,31
Ác. siquímico	4 h	418,1	349,3	99,2	189,3	<0,001	80,8	0,327	157,8	0,008	50,6
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	356,9	233,4	123,2	242,9	<0,001	40,4	0,001	42,3	0,008	75,0
Piruvato	4 h	184,9	143,4	131,5	156,3	0,168	30,20	0,021	32,7	0,363	63,7
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	169,1	166,9	177,0	185,6	0,411	34,34	0,913	49,5	0,733	59,1

Tabla 5.1.6a. Continuación.

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	P_{CO_2L}	lsd _{CO2L}	P_{CO_2H}	lsd _{CO2H}
Glicólisis, ciclo TCA y ácidos orgánicos											
Citrato	4 h	7,25	5,77	12,87	10,76	<0,001	1,47	0,179	2,37	0,066	2,30
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	9,83	6,80	14,68	10,93	<0,001	1,92	0,004	1,67	0,061	3,98
Aconitato	4 h	64,72	49,87	121,29	99,24	<0,001	14,31	0,172	23,47	0,049	21,96
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	92,73	60,70	142,96	99,78	<0,001	20,49	0,002	14,28	0,052	43,74
Isocitrato	4 h	396,4	330,1	670,0	637,6	<0,001	105,4	0,335	159,8	0,669	176,1
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	466,2	427,1	596,1	589,1	0,046	143,3	0,673	215,6	0,949	238,9
2-oxoglutarato	4 h	65,90	58,82	63,07	63,89	0,684	5,97	0,024	5,71	0,873	12,53
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	104,86	104,37	80,13	78,82	0,002	13,33	0,957	22,23	0,882	20,80
Succinato	4 h	77,99	85,79	65,42	59,10	0,001	9,89	0,390	21,30	0,105	8,22
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	92,39	109,81	39,92	63,73	<0,001	12,04	0,135	24,67	<0,001	8,00
Fumarato	4 h	102,5	91,7	329,6	313,6	<0,001	34,3	0,586	47,7	0,549	68,1
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	321,7	206,0	138,8	245,8	0,158	105,3	0,194	206,0	0,126	149,7
Malato	4 h	11,53	8,77	20,31	17,34	<0,001	2,41	0,121	3,73	0,113	3,92
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	17,71	10,66	18,33	18,25	0,004	2,49	0,003	3,59	0,965	4,29
Gal6P	4 h	4,78	9,94	3,25	3,72	<0,001	1,25	0,005	2,73	0,374	1,21
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	4,89	6,30	2,81	3,39	0,013	1,88	0,369	3,55	0,551	2,27
Gly3P	4 h	44,85	48,14	47,04	50,35	0,553	7,84	0,638	16,23	0,279	6,81
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	49,30	54,45	42,25	46,10	0,085	8,94	0,452	15,66	0,464	12,46
Man6P	4 h	42,01	35,64	36,10	38,39	0,434	4,29	0,031	5,48	0,499	7,79
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	31,84	32,88	28,51	28,80	0,035	3,41	0,693	6,16	0,884	4,56
Glicerato	4 h	7,99	6,95	9,68	8,34	0,010	1,09	0,198	1,79	0,104	1,72
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	8,03	7,32	8,48	8,34	0,234	1,27	0,281	1,47	0,895	2,44
Aminoácidos											
Ser	4 h	3,55	3,39	7,72	4,80	<0,001	0,93	0,832	1,62	0,002	1,32
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	3,17	2,14	8,87	4,66	<0,001	0,80	0,021	0,80	<0,001	1,55
Gly	4 h	0,282	0,363	0,372	0,319	0,306	0,046	0,050	0,081	0,092	0,065
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,406	0,293	0,492	0,354	0,010	0,052	0,012	0,077	0,011	0,090
Trp	4 h	0,018	0,032	0,021	0,017	0,172	0,010	0,134	0,020	0,251	0,008
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,022	0,026	0,020	0,019	0,057	0,004	0,186	0,007	0,672	0,007
Tyr	4 h	0,037	0,050	0,084	0,057	<0,001	0,007	0,053	0,014	<0,001	0,005
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,060	0,055	0,063	0,064	0,139	0,009	0,186	0,008	0,987	0,018
Phe	4 h	0,062	0,074	0,139	0,101	<0,001	0,016	0,382	0,032	<0,001	0,013
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,099	0,080	0,112	0,096	0,009	0,010	0,005	0,010	0,094	0,021
Ala	4 h	0,867	0,883	0,864	0,888	0,987	0,114	0,842	0,213	0,734	0,172
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,460	0,413	1,115	1,461	<0,001	0,143	0,527	0,176	0,018	0,264
Leu	4 h	0,060	0,080	0,173	0,110	<0,001	0,029	0,192	0,034	0,033	0,056
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,079	0,067	0,105	0,088	0,004	0,014	0,061	0,013	0,222	0,032
Val	4 h	0,066	0,095	0,225	0,166	<0,001	0,033	0,013	0,021	0,090	0,072
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,088	0,084	0,164	0,119	<0,001	0,022	0,360	0,010	0,067	0,049
Glu	4 h	4,09	3,88	6,15	4,93	<0,001	0,56	0,615	1,05	0,008	0,74
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	6,15	4,57	7,13	6,57	<0,001	0,59	0,005	0,91	0,200	0,96
Arg	4 h	0,038	0,034	0,073	0,051	<0,001	0,011	0,302	0,009	0,048	0,022
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,044	0,034	0,099	0,085	<0,001	0,005	0,023	0,008	0,003	0,007
Gln	4 h	1,63	1,26	1,13	0,89	<0,001	0,18	0,015	0,26	0,099	0,30
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	1,00	0,38	4,76	4,08	<0,001	0,65	0,020	0,47	0,281	1,43
His	4 h	0,031	0,052	0,102	0,064	<0,001	0,009	0,002	0,010	0,003	0,018
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,039	0,034	0,078	0,043	<0,001	0,011	0,224	0,008	0,011	0,024
Asp	4 h	3,49	3,17	3,97	3,37	0,112	0,44	0,356	0,79	0,060	0,63
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	2,56	1,95	5,27	5,48	<0,001	0,47	0,088	0,74	0,534	0,76
Lys	4 h	0,059	0,075	0,142	0,118	<0,001	0,024	0,100	0,020	0,296	0,051
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,071	0,063	0,131	0,090	<0,001	0,014	0,371	0,021	0,007	0,025
Met	4 h	6,63	7,22	8,63	7,04	0,135	1,24	0,358	0,60	0,151	2,37
($\text{nmol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	7,03	5,91	13,78	12,50	<0,001	1,68	<0,001	0,45	0,434	3,74
Thr	4 h	0,306	0,309	0,690	0,469	<0,001	0,065	0,957	0,114	0,002	0,091
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,439	0,324	0,707	0,519	<0,001	0,049	0,020	0,087	<0,001	0,070
Ile	4 h	0,059	0,064	0,116	0,082	<0,001	0,016	0,454	0,015	0,049	0,034
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	0,067	0,061	0,088	0,069	0,037	0,013	0,261	0,013	0,137	0,027
Aminoácidos	4 h	31,04	20,49	22,86	17,42	0,010	4,01	0,019	8,10	0,015	3,94
($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$)	24 h	36,95	21,27	38,75	40,32	<0,001	2,59	<0,001	4,95	0,258	3,07

Tabla 5.1.6b. Contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, P<0,05 (n=4, excepto n=12 para glucosa, fructosa, sacarosa, fructanos, CST, almidón y aminoácidos totales).

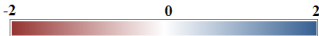
		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Energía y poder reductor											
ATP	4 h	15,74	15,41	25,77	23,48	<0,001	2,19	0,760	2,52	0,232	4,22
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	24,04	18,63	32,78	36,95	<0,001	2,64	0,028	4,59	0,035	3,75
ADP	4 h	7,74	9,99	10,69	15,80	<0,001	1,62	0,131	3,20	0,001	1,92
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	7,77	8,76	10,89	13,61	<0,001	1,30	0,273	2,08	0,019	2,10
AMP	4 h	5,76	5,32	6,23	9,95	0,015	1,94	0,778	3,69	0,006	2,13
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	4,54	5,26	7,30	8,64	<0,001	1,02	0,116	1,00	0,137	1,91
NAD	4 h	7,77	8,17	11,06	11,22	0,009	2,22	0,817	4,05	0,901	2,90
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	7,81	7,74	10,92	13,14	<0,001	1,13	0,926	1,80	0,027	1,84
NADP	4 h	4,43	5,16	6,17	7,35	<0,001	0,81	0,286	1,54	0,010	0,72
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	4,74	4,39	6,86	8,24	<0,001	0,99	0,576	1,52	0,093	1,71
ATP:ADP	4 h	1,81	1,58	2,42	1,71	0,045	0,36	0,349	0,57	0,023	0,58
	24 h	3,16	2,00	3,01	2,74	0,164	0,44	0,014	0,84	0,256	0,52
Ciclo de Calvin-Benson y síntesis de carbohidratos											
3PGA	4 h	12,39	8,48	13,00	13,68	0,083	3,36	0,133	5,61	0,763	5,24
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	4,41	7,48	11,42	10,34	<0,001	2,28	0,020	2,38	0,590	4,86
DHAP	4 h	4,40	5,16	5,16	6,19	0,032	0,80	0,108	1,03	0,135	1,50
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	3,82	4,57	6,00	6,76	<0,001	0,91	0,185	1,22	0,303	1,65
FBP	4 h	2,40	3,15	2,76	3,02	0,681	0,61	0,099	0,95	0,534	1,07
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,44	1,95	2,34	2,81	<0,001	0,24	0,025	0,42	0,018	0,35
SBP	4 h	3,00	3,40	3,49	4,19	0,099	0,78	0,349	0,97	0,285	1,46
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	2,41	2,54	5,85	7,66	<0,001	0,77	0,700	0,79	0,038	1,67
S7P	4 h	1,93	2,50	2,99	3,22	0,006	0,58	0,209	0,98	0,528	0,86
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,21	1,64	4,53	5,36	<0,001	0,86	0,018	0,32	0,304	1,81
R5P	4 h	3,15	4,37	6,27	7,15	<0,001	0,83	0,095	1,53	0,112	1,15
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	2,56	3,50	10,07	14,98	<0,001	1,62	0,031	0,82	0,018	3,65
Ru5P + Xu5P	4 h	33,90	42,09	56,94	65,69	0,001	12,18	0,284	17,06	0,363	22,48
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	19,06	24,52	54,27	83,12	<0,001	7,81	0,096	6,86	0,012	18,56
RuBP	4 h	0,150	0,064	0,069	0,057	0,001	0,022	0,002	0,036	0,427	0,035
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,105	0,064	0,073	0,048	0,129	0,032	0,152	0,061	0,157	0,039
F6P	4 h	14,09	16,67	25,34	24,57	<0,001	4,50	0,261	5,10	0,838	8,72
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	13,38	18,96	26,84	26,43	<0,001	3,09	0,031	4,82	0,849	5,24
G6P	4 h	66,17	68,16	120,23	109,86	<0,001	18,34	0,782	17,54	0,507	35,94
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	66,47	72,48	128,49	136,00	<0,001	21,76	0,383	16,16	0,692	44,14
G1P	4 h	14,45	16,49	30,37	30,26	<0,001	2,70	0,221	3,75	0,958	4,72
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	15,05	15,86	29,90	29,99	<0,001	3,77	0,592	3,64	0,976	7,38
HPs	4 h	94,71	101,32	175,93	164,69	<0,001	20,96	0,464	20,69	0,539	42,28
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	94,90	107,30	185,23	192,41	<0,001	24,85	0,141	17,92	0,751	52,90
GBP	4 h	0,654	0,675	0,794	1,152	<0,001	0,140	0,704	0,142	0,021	0,28
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,555	0,731	1,185	1,286	<0,001	0,215	0,105	0,229	0,573	0,41
ADP-glucosa	4 h	0,060	0,050	0,059	0,077	0,051	0,013	0,393	0,026	0,013	0,012
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,055	0,043	0,100	0,147	<0,001	0,023	0,002	0,005	0,045	0,045
Almidón	4 h	0,245	0,365	0,322	0,280	0,875	0,055	<0,001	0,045	0,403	0,102
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,241	0,288	0,183	0,201	<0,001	0,038	0,136	0,064	0,440	0,046
UDP-glucosa	4 h	28,38	36,77	44,70	49,26	0,004	8,72	0,112	11,21	0,515	16,71
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	31,18	34,56	63,29	69,24	<0,001	9,19	0,274	6,88	0,483	19,47
S6P	4 h	0,223	0,283	0,226	0,271	0,903	0,078	0,370	0,152	0,194	0,077
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,236	0,320	0,324	0,448	0,004	0,065	0,084	0,102	0,030	0,108
Glucosa	4 h	0,45	0,39	0,83	1,13	<0,001	0,14	0,036	0,05	0,039	0,28
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,48	0,54	0,78	1,81	<0,001	0,16	0,131	0,08	<0,001	0,31
Fructosa	4 h	1,12	0,96	1,92	3,25	<0,001	0,37	0,082	0,18	0,003	0,80
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,74	1,12	1,03	6,86	<0,001	0,41	0,009	0,27	<0,001	0,77
Sacarosa	4 h	5,47	5,75	3,73	4,94	<0,001	0,53	0,490	0,86	0,002	0,72
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	6,00	6,73	4,44	7,23	0,095	0,63	0,128	0,97	<0,001	0,86
Fructanos	4 h	36,64	84,66	4,82	10,00	<0,001	10,77	<0,001	22,33	<0,001	2,57
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	18,99	42,34	3,04	13,63	<0,001	3,78	<0,001	6,43	<0,001	4,81
CST	4 h	49,14	97,51	15,02	24,26	<0,001	9,31	<0,001	18,96	<0,001	2,72
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	32,20	57,46	13,73	36,77	<0,001	4,27	<0,001	6,25	<0,001	6,19
T6P	4 h	0,449	0,985	0,262	0,301	0,041	0,416	0,202	0,915	0,626	0,188
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,779	1,944	0,508	0,869	<0,001	0,242	0,426	0,492	0,021	0,286
T6P:sacarosa	4 h	0,078	0,142	0,060	0,056	0,057	0,054	0,233	0,120	0,551	0,018
(nmol·μmol ⁻¹)	24 h	0,301	0,240	0,082	0,128	<0,001	0,092	0,323	0,139	0,045	0,045
Glicólisis, ciclo TCA y ácidos orgánicos											
2PGA	4 h	1,71	2,05	1,96	2,17	0,424	0,49	0,420	0,96	0,305	0,48
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,73	2,71	3,13	2,97	0,024	0,70	0,058	1,03	0,759	1,24
PEP	4 h	2,53	3,07	5,78	4,68	0,006	1,59	0,228	1,02	0,442	3,26
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	3,90	3,82	5,54	7,43	<0,001	0,87	0,870	1,28	0,026	1,56
Ác. siquímico	4 h	7,07	5,47	5,64	7,38	0,651	1,12	0,098	2,00	0,033	1,54
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	5,89	8,76	7,62	9,44	0,145	1,71	0,033	2,52	0,193	3,24
Piruvato	4 h	35,29	26,74	50,64	49,15	0,001	9,33	0,046	8,30	0,848	18,91
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	26,19	28,45	43,69	70,34	<0,001	7,67	0,744	16,83	<0,001	5,46
Citrato	4 h	3,08	3,24	4,13	4,03	0,013	0,68	0,673	0,91	0,850	1,22
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	2,55	3,76	1,89	3,34	0,055	0,56	0,036	1,09	0,003	0,67
Aconitato	4 h	29,98	31,17	41,00	39,22	0,011	6,84	0,753	9,19	0,732	12,18
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	23,89	34,93	16,86	32,09	0,048	4,88	0,027	9,16	0,001	6,66
Isocitrato	4 h	17,45	19,33	30,43	30,74	<0,001	5,52	0,447	5,84	0,946	10,60
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	15,03	15,55	16,09	30,14	<0,001	3,74	0,865	7,11	<0,001	4,13

Tabla 5.1.6b. Continuación.

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Glicólisis, ciclo TCA y ácidos orgánicos											
2-oxoglutarato	4 h	35,42	37,15	53,90	63,09	<0,001	10,06	0,746	12,51	0,277	18,82
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	26,07	30,51	52,60	71,81	<0,001	10,46	0,144	6,47	0,083	22,59
Succinato	4 h	66,08	80,45	106,58	118,21	<0,001	13,60	0,125	20,60	0,258	22,75
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	117,86	119,31	118,79	123,14	0,848	26,87	0,937	42,72	0,804	45,61
Fumarato	4 h	36,14	44,65	66,44	81,10	<0,001	15,00	0,095	10,64	0,285	30,56
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	39,22	51,35	57,38	79,57	<0,001	10,37	0,121	16,47	0,020	16,92
Malato	4 h	2,54	3,37	7,12	10,52	<0,001	0,86	0,063	0,89	0,005	1,81
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	3,32	4,35	2,53	4,00	0,076	0,64	0,010	0,66	0,035	1,31
Gal6P	4 h	0,707	0,590	1,403	1,954	0,002	0,561	0,202	0,214	0,272	1,12
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,534	0,862	1,026	1,168	0,017	0,306	0,074	0,379	0,567	0,63
Gly3P	4 h	10,18	13,31	26,24	22,00	<0,001	3,36	0,025	2,56	0,196	7,31
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	13,29	15,63	22,77	22,10	<0,001	2,43	0,179	3,85	0,692	3,94
Man6P	4 h	10,69	11,72	21,09	22,48	<0,001	2,61	0,424	2,93	0,527	5,07
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	11,61	12,57	24,95	27,47	<0,001	4,10	0,438	2,92	0,488	8,36
Glicerato	4 h	212,7	231,9	410,5	433,8	<0,001	49,8	0,497	71,0	0,530	85,7
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	187,3	195,0	389,2	538,1	<0,001	68,1	0,763	59,2	0,042	141,1
Aminoácidos											
Ser	4 h	0,137	0,154	0,220	0,174	0,004	0,031	0,494	0,060	0,028	0,039
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,142	0,102	0,467	0,319	<0,001	0,044	0,192	0,069	0,004	0,076
Gly	4 h	49,12	44,68	44,64	36,32	0,184	9,98	0,619	0,022	0,090	10,07
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	40,36	35,45	49,01	45,76	0,008	6,41	0,285	10,53	0,458	10,39
Trp	4 h	5,31	4,55	12,74	10,72	<0,001	2,27	0,566	3,07	0,270	4,06
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	4,44	4,24	7,44	5,57	0,003	1,25	0,844	2,40	0,020	1,45
Tyr	4 h	18,67	16,59	24,95	21,90	0,005	3,73	0,515	7,37	0,111	3,99
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	15,91	15,43	27,01	26,92	<0,001	3,29	0,850	2,47	0,961	4,23
Phe	4 h	16,03	13,95	19,01	18,69	0,020	3,15	0,421	5,90	0,847	3,89
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	12,86	14,74	21,21	22,47	<0,001	3,00	0,362	4,67	0,547	4,85
Ala	4 h	0,231	0,161	0,753	0,345	0,003	0,200	0,059	0,075	0,057	0,426
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,218	0,168	0,915	1,314	<0,001	0,118	0,225	0,090	0,013	0,270
Leu	4 h	15,12	15,73	52,08	38,39	<0,001	5,53	0,806	6,05	0,026	11,24
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	17,79	15,40	26,70	27,52	<0,001	4,58	0,420	6,99	0,803	7,63
Val	4 h	25,43	21,61	58,64	42,83	<0,001	6,72	0,448	11,50	0,009	9,81
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	37,10	33,80	63,50	62,33	<0,001	10,58	0,642	16,09	0,876	17,49
Glu	4 h	0,836	0,727	1,184	0,947	0,001	0,150	0,276	0,222	0,061	0,252
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,843	0,965	2,146	1,885	<0,001	0,138	0,258	0,240	0,018	0,197
Arg	4 h	12,71	11,43	40,18	25,99	<0,001	5,29	0,605	5,74	0,016	10,41
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	18,96	19,76	32,41	32,49	<0,001	6,01	0,881	12,43	0,970	5,26
Gln	4 h	0,505	0,439	0,365	0,352	0,072	0,125	0,265	0,131	0,902	0,248
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,214	0,235	1,709	1,384	<0,001	0,169	0,649	0,108	0,087	0,394
His	4 h	14,93	15,99	33,57	30,21	<0,001	4,29	0,558	4,34	0,362	8,32
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	20,97	21,01	41,79	25,12	<0,001	5,74	0,988	7,43	0,008	10,38
Asp	4 h	0,226	0,169	0,324	0,280	0,002	0,056	0,066	0,062	0,368	0,116
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,423	0,387	0,723	0,377	<0,001	0,052	0,402	0,099	<0,001	0,055
Asn	4 h	0,213	0,121	0,196	0,137	0,963	0,036	0,012	0,064	0,032	0,051
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	0,375	0,494	0,508	0,112	0,015	0,094	0,092	0,147	0,001	0,160
Lys	4 h	16,12	13,59	37,03	24,24	<0,001	3,86	0,403	6,87	0,001	5,18
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	16,33	15,81	31,34	32,90	<0,001	2,92	0,815	5,52	0,372	3,97
Met	4 h	0,84	0,66	3,23	2,44	<0,001	0,50	0,413	0,48	0,109	1,02
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,81	0,96	3,67	3,63	<0,001	0,77	0,067	0,93	0,947	1,47
Thr	4 h	31,79	22,65	65,65	54,05	<0,001	7,88	0,180	14,73	0,028	9,83
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	35,80	33,25	92,34	55,91	<0,001	8,72	0,576	10,56	0,002	16,49
Ile	4 h	19,39	14,45	38,14	30,76	<0,001	3,82	0,077	5,67	0,037	6,69
(nmol·g PF ⁻¹)	24 h	20,01	18,98	27,05	26,14	0,003	5,84	0,730	7,02	0,728	6,07
Aminoácidos	4 h	2,02	1,25	2,96	2,50	<0,001	0,24	<0,001	0,35	0,012	0,34
(μmol·g PF ⁻¹)	24 h	1,63	1,80	8,75	7,53	<0,001	0,56	0,352	0,38	0,029	1,09

Resultados del experimento 2

Tabla 5.1.6c. Heat map del efecto del CO₂ en el contenido de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía con diferente aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. Los datos se expresaron como log₂ del cociente del valor de cada metabolito a CO₂ elevado frente a CO₂ ambiente para cada aporte de N de forma independiente. Según el ANOVA, se designa a cada valor el símbolo * como significativo (0,05>P≥0,001) o ** como muy significativo (P<0,001).



	Hoja bandera				Raíz			
	4 h incubación		24 h incubación		4 h incubación		24 h incubación	
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH
Energía y poder reductor								
ATP	-0,15	-0,24*	-0,42*	0,00	-0,03	-0,13	-0,37*	0,17*
ADP	-0,17	0,34	-0,32*	0,59**	0,37	0,56*	0,17	0,32*
AMP	-0,17	-0,48	-0,59**	0,27	-0,11	0,68*	0,21	0,24
NAD	-0,07	0,08	-0,02	0,22	0,07	0,02	-0,01	0,27*
NADP	0,01	0,00	-0,34*	0,33	0,22	0,25*	-0,11	0,26
Clorofilas								
Chl a	-0,05	-0,11	-0,29	-0,08				
Chl b	-0,19	-0,08	-0,40	-0,40				
Chl total	-0,08	-0,10	-0,31	-0,16				
Ciclo de Calvin-Benson y síntesis de carbohidratos								
3PGA	-0,24	0,33	0,11	0,23	-0,55	0,07	0,76*	-0,14
DHAP	0,05	0,74*	0,23	0,46*	0,23	0,26	0,26	0,17
FBP	-0,34	0,73	-0,78*	0,80*	0,39	0,13	0,44*	0,26*
SBP	0,06	0,69	-0,43	1,06*	0,18	0,26	0,08	0,39*
S7P	-0,31	0,25	-0,14	0,28	0,37	0,11	0,44*	0,24
R5P	-0,17	0,06	-0,11	0,34	0,47	0,19	0,45*	0,57*
Ru5P + Xu5P	0,05	0,01	0,02	0,12	0,31	0,21	0,36	0,62*
RuBP	0,10	-0,12	-1,57**	2,12*	-1,23*	-0,28	-0,71	-0,60
F6P	-0,08	0,38*	0,06	0,12	0,24	-0,04	0,50*	-0,02
G6P	-0,16	0,28*	0,18	0,09	0,04	-0,13	0,12	0,08
G1P	-0,07	0,02	-0,01	-0,09	0,19	-0,01	0,08	0,00
HPs	-0,11	0,24	0,09	0,06	0,10	-0,10	0,18	0,05
GBP					0,05	0,54*	0,40	0,12
ADP-glucosa	-0,65	0,49*	-0,30	0,54*	-0,26	0,38*	-0,36*	0,56*
Almidón	0,47*	0,16	1,69*	0,44*	0,58**	-0,20	0,26	0,14
UDP-glucosa	-0,21	-0,05	-0,08	0,11	0,37	0,14	0,15	0,13
S6P	0,45	0,53*	0,51*	0,89*	0,34	0,26	0,44	0,47*
Glucosa libre	0,01	0,38*	-0,08	0,05	-0,21	0,45*	0,17	1,21**
Fructosa libre	0,28	0,90*	0,87*	0,25	-0,22*	0,76*	0,60*	2,74**
Sacarosa	0,44*	0,15	0,38*	0,26	0,07	0,41*	0,17	0,70**
Fructanos	1,46*	1,29*	1,55*	0,22	1,21**	1,05**	1,16**	2,16**
CST	0,83**	0,30*	0,80**	0,25	0,99**	0,69**	0,84**	1,42**
T6P	0,44*	0,62	0,33*	0,43*	1,13	0,20	0,13	0,77*
Glicólisis, ciclo TCA y ácidos orgánicos								
2PGA	-0,95	0,06	0,20	0,34	0,26	0,15	0,65	-0,08
PEP	-0,54	1,17	-1,66*	1,25*	0,28	-0,30	-0,03	0,42*
Ác. siquímico	-0,26	0,93*	-0,61*	0,98*	-0,37	0,39*	0,57*	0,31
Piruvato	-0,37*	0,25	-0,02	0,07	-0,40*	-0,04	0,12	0,69**
Citrato	-0,33	-0,26	-0,53*	-0,43	0,07	-0,04	0,56*	0,82*
Aconitato	-0,38	-0,29*	-0,61*	-0,52	0,06	-0,06	0,55*	0,93*
Isocitrato	-0,26	-0,07	-0,13	-0,02	0,15	0,01	0,05	0,91**
2-oxoglutarato	-0,16*	0,02	-0,01	-0,02	0,07	0,23	0,23	0,45
Succinato	0,14	-0,15	0,25	0,67**	0,28	0,15	0,02	0,05
Fumarato	-0,16	-0,07	-0,64	0,82	0,31	0,29	0,39	0,47*
Malato	-0,39	-0,23	-0,73*	-0,01	0,41	0,56*	0,39*	0,66*
Gal6P	1,06*	0,19	0,37	0,27	-0,26	0,48	0,69	0,19
Gly3P	0,10	0,10	0,14	0,13	0,39*	-0,25	0,23	-0,04
Man6P	-0,24*	0,09	0,05	0,01	0,13	0,09	0,11	0,14
Glicerato	-0,20	-0,21	-0,13	-0,02	0,12	0,08	0,06	0,47*
Aminoácidos								
Ser	-0,07	-0,69*	-0,57*	-0,93**	0,17	-0,34*	-0,48	-0,55*
Gly	0,36*	-0,22	-0,47*	-0,47*	-0,14	-0,30	-0,19	-0,10
Trp	0,83	-0,30	0,24	-0,07	-0,22	-0,25	-0,07	-0,42*
Tyr	0,43	-0,56**	-0,13	0,02	-0,17	-0,19	-0,04	0,00
Phe	0,26	-0,46**	-0,31*	-0,22	-0,20	-0,02	0,20	0,08
Ala	0,03	0,04	-0,16	0,39*	-0,52	-1,13	-0,38	0,52*
Leu	0,42	-0,65*	-0,24	-0,25	0,06	-0,44*	-0,21	0,04
Val	0,53*	-0,44	-0,07	-0,46	-0,23	-0,45*	-0,13	-0,03
Glu	-0,08	-0,32*	-0,43*	-0,12	-0,20	-0,32	0,19	-0,19*
Arg	-0,16	-0,52*	-0,37*	-0,22*	-0,15	-0,63*	0,06	0,00
Gln	-0,37*	-0,34	-1,40**	-0,22	-0,20	-0,05	0,14	-0,30
His	0,75*	-0,67*	-0,20	-0,86*	0,10	-0,15	0,00	-0,73*
Asp	-0,14	-0,24	-0,39	0,06	-0,42	-0,21	-0,13	-0,94**
Asn					-0,82*	-0,52*	0,40	-2,13*
Lys	0,35	-0,27	-0,17	-0,54*	-0,25	-0,61*	-0,05	0,07
Met	0,12	-0,29	-0,25**	-0,14	-0,35	-0,40	-0,91	-0,02
Thr	0,01	-0,56*	-0,44*	-0,45**	-0,49	-0,28*	-0,11	-0,72*
Ile	0,12	-0,50*	-0,14	-0,35	-0,42	-0,31*	-0,08	-0,05
Aminoácidos	-0,60*	-0,39*	-0,80**	0,06	-0,69**	-0,24*	0,14	-0,22*

5.1.6.6. Contenido de proteínas totales, solubles y de membrana en la hoja bandera y la raíz

El crecimiento en CO₂ elevado redujo el contenido de proteínas totales en la hoja bandera y la raíz de plantas deficientes en N, junto al de las proteínas foliares de membrana a las 24 h (Tabla 5.1.6.6a). Además, el CO₂ elevado aumentó el contenido de proteínas solubles en la raíz de plantas con un aporte de N alto a las 4 h. La abundancia de N condujo, con respecto a las plantas deficientes en N, a un aumento del contenido de proteínas totales en la hoja bandera y la raíz a las 4 y 24 h de incubación, que se acompañaron de un incremento de los niveles de proteínas solubles y de membrana aunque en algún caso no llegaron a alcanzar significación estadística (Tabla 5.1.6.6a).

Tabla 5.1.6.6a. Contenido de proteínas totales, solubles y de membrana (mg·g PF⁻¹) en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Proteína total											
Hoja bandera	4 h	35,96	31,31	44,30	43,39	<0,001	4,86	0,124	6,36	0,816	9,52
	24 h	36,94	28,64	46,99	43,26	0,043	8,99	0,020	6,49	0,779	19,35
Raíz	4 h	1,20	1,29	1,90	2,07	<0,001	0,25	0,539	0,38	0,360	0,43
	24 h	1,53	1,36	2,17	2,20	<0,001	0,22	0,002	0,08	0,868	0,50
Proteína soluble											
Hoja bandera	4 h	18,63	16,66	27,21	25,03	<0,001	2,07	0,124	2,69	0,209	3,80
	24 h	19,63	18,33	28,34	25,45	<0,001	2,89	0,433	3,78	0,228	5,28
Raíz	4 h	0,73	0,90	0,77	1,08	0,353	0,25	0,442	0,48	0,042	0,29
	24 h	0,90	0,82	1,58	1,49	<0,001	0,16	0,288	0,17	0,247	0,18
Proteína de membrana											
Hoja bandera	4 h	17,32	14,65	18,11	18,36	0,301	4,55	0,294	5,69	0,951	10,00
	24 h	17,31	10,31	18,00	22,93	0,039	6,26	0,027	5,91	0,370	13,58
Raíz	4 h	0,46	0,49	1,13	0,99	<0,001	0,16	0,736	0,22	0,297	0,29
	24 h	0,63	0,54	0,59	0,72	0,543	0,24	0,251	0,17	0,554	0,52

5.1.6.7. Contenido de proteína Rubisco

El CO₂ elevado redujo el contenido de Rubisco por superficie foliar, la fracción de Rubisco en la proteína soluble y la relación rbcL:rbcS en plantas con un aporte de N bajo a las 24 h de incubación (Tabla 5.1.6.7a). La abundancia de N aumentó el contenido de Rubisco, la fracción de Rubisco en la proteína soluble y en el N foliar, y la relación rbcL:rbcS a las 4 y 24 h (Tabla 5.1.6.7a).

Tabla 5.1.6.7a. Contenido de proteína Rubisco por superficie foliar (g·m⁻²), fracción de Rubisco en la proteína soluble (% en proteína), fracción de Rubisco en el N foliar (% en N) y relación rbcL:rbcS en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Rubisco	4 h	1,06	1,08	2,20	2,08	<0,001	0,24	0,942	0,52	0,057	0,13
	24 h	1,41	1,04	2,22	2,43	<0,001	0,38	0,018	0,28	0,539	0,80
% proteína soluble	4 h	36,7	33,1	41,8	40,6	0,032	5,7	0,471	11,3	0,639	5,8
	24 h	39,5	35,3	39,8	41,1	0,006	2,0	0,007	2,5	0,429	3,7
% N foliar	4 h	40,0	35,6	59,8	58,1	<0,001	6,5	0,403	12,2	0,625	8,1
	24 h	44,5	38,8	47,9	52,9	0,002	5,0	0,144	8,4	0,148	7,3
rbcL:rbcS	4 h	0,71	0,72	0,91	0,86	0,005	0,11	0,943	0,22	0,282	0,10
	24 h	0,68	0,61	0,86	0,84	<0,001	0,05	0,013	0,05	0,774	0,11

5.1.7. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el contenido de iones en la hoja bandera y la raíz

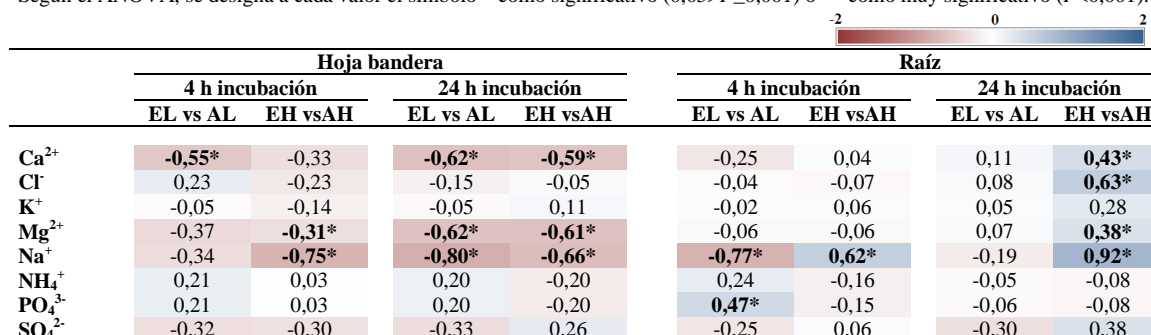
A continuación, se muestran los cambios en el contenido de iones medidos por cromatografía iónica, a excepción del contenido de NO₃⁻ que se analizó por colorimetría como se detalla en el apartado 5.1.3. El aumento de la [CO₂] redujo el contenido de Mg²⁺ y Na⁺ a las 24 h de incubación y de Ca²⁺ a las 4 y 24 h en la hoja bandera de plantas con N bajo (Tablas 5.1.7a y 5.1.7b). También redujo el contenido de Ca²⁺ a las 24 h y de Mg²⁺ y Na⁺ a las 4 y 24 h de incubación en plantas con N alto. Las plantas que crecieron con abundancia de N mostraron un mayor contenido foliar de Na⁺ a las 4 h y de Ca²⁺ y Mg²⁺ a las 24 h, y un descenso de NH₄⁺ y PO₄³⁻ a las 24 h (Tabla 5.1.7a).

Además, el CO₂ elevado disminuyó el contenido de Na⁺ y aumentó el de PO₄³⁻ en la raíz de plantas con N bajo a las 4 h, a la vez que aumentó el contenido de Ca²⁺, Cl⁻ y Mg²⁺ a las 24 h y de Na⁺ a las 4 y 24 h en la raíz de plantas con N alto (Tabla 5.1.7a). El mayor aporte de N condujo a un aumento en la raíz de K⁺ a las 4 h y de Na⁺, NH₄⁺ y PO₄³⁻ a las 4 y 24 h, junto a un descenso de Cl⁻ y Mg²⁺ a las 24 h y de Ca²⁺ y SO₄²⁻ tanto a las 4 h como a las 24 h de incubación (Tabla 5.1.7a).

Tabla 5.1.7a. Contenido de iones (μmol·g PF⁻¹) en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. *P*, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, *P*<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	<i>P</i> _N	lsd _N	<i>P</i> _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	<i>P</i> _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
Hoja bandera											
Ca ²⁺	4 h	10,65	7,28	19,43	15,46	<0,001	2,17	0,008	2,04	0,063	4,27
	24 h	13,78	8,95	23,52	15,66	<0,001	3,44	0,006	2,88	0,037	7,18
Cl ⁻	4 h	29,93	35,02	38,45	32,89	0,168	4,73	0,189	8,40	0,082	6,52
	24 h	41,83	37,81	36,04	34,80	0,057	4,56	0,260	7,92	0,642	6,46
K ⁺	4 h	126,39	122,49	133,70	121,37	0,686	16,38	0,759	31,05	0,221	22,10
	24 h	141,27	136,23	135,27	145,60	0,766	12,28	0,587	21,50	0,160	16,66
Mg ²⁺	4 h	17,77	13,78	30,81	24,87	<0,001	3,58	0,148	5,89	0,038	5,49
	24 h	26,63	17,37	38,88	25,49	0,001	5,35	0,005	5,30	0,023	10,79
Na ⁺	4 h	3,02	2,38	5,48	3,26	0,019	1,33	0,483	2,10	0,048	2,19
	24 h	4,27	2,45	3,89	2,47	0,468	0,54	0,001	0,62	0,018	1,05
NH ₄ ⁺	4 h	27,51	31,89	26,65	27,18	0,311	5,73	0,373	11,14	0,846	6,43
	24 h	28,70	32,91	25,97	22,65	0,012	4,78	0,288	8,84	0,231	6,09
PO ₄ ³⁻	4 h	32,02	37,12	31,03	31,65	0,311	6,67	0,373	12,97	0,846	7,48
	24 h	33,41	38,31	30,27	26,37	0,012	5,57	0,288	10,29	0,231	7,09
SO ₄ ²⁻	4 h	15,96	12,81	19,05	15,49	0,113	3,67	0,165	4,88	0,238	6,65
	24 h	19,89	15,86	14,67	17,51	0,333	3,88	0,218	7,16	0,185	4,75
Raíz											
Ca ²⁺	4 h	2,31	1,94	1,71	1,76	0,007	0,26	0,110	0,49	0,757	0,34
	24 h	1,81	1,96	0,99	1,33	<0,001	0,23	0,460	0,47	0,004	0,18
Cl ⁻	4 h	41,16	39,96	35,63	33,96	0,058	6,00	0,790	10,54	0,628	8,31
	24 h	38,13	40,18	15,94	24,60	<0,001	5,05	0,618	9,53	0,014	6,15
K ⁺	4 h	60,12	59,13	70,51	73,64	0,021	10,24	0,902	19,03	0,574	12,91
	24 h	53,65	55,57	51,34	62,44	0,571	8,60	0,737	13,29	0,106	14,48
Mg ²⁺	4 h	3,83	3,67	3,46	3,32	0,105	0,45	0,645	0,80	0,595	0,61
	24 h	3,47	3,65	2,10	2,73	<0,001	0,29	0,506	0,63	0,003	0,31
Na ⁺	4 h	1,87	1,10	3,53	5,41	<0,001	0,72	0,003	0,36	0,021	1,49
	24 h	1,59	1,39	2,26	4,29	<0,001	0,57	0,620	0,97	0,001	0,86
NH ₄ ⁺	4 h	0,94	1,11	3,90	3,50	<0,001	0,57	0,350	0,41	0,452	1,20
	24 h	1,09	1,05	2,46	2,32	<0,001	0,48	0,840	0,47	0,741	0,98
PO ₄ ³⁻	4 h	0,93	1,29	4,54	4,08	<0,001	0,67	0,033	0,32	0,452	1,40
	24 h	1,27	1,22	2,86	2,70	<0,001	0,56	0,840	0,54	0,741	1,14
SO ₄ ²⁻	4 h	4,81	4,05	3,08	3,20	0,021	1,05	0,442	2,26	0,683	0,69
	24 h	3,87	3,14	1,72	2,24	<0,001	0,52	0,138	1,07	0,071	0,58

Tabla 5.1.7b. Heat map del efecto del CO₂ en el contenido de iones en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía con diferente aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. Los datos se expresaron como log₂ del cociente del valor de cada ión a CO₂ elevado frente a CO₂ ambiente para cada aporte de N de forma independiente. Según el ANOVA, se designa a cada valor el símbolo * como significativo (0,05>P≥0,001) o ** como muy significativo (P<0,001).



	Hoja bandera				Raíz			
	4 h incubación		24 h incubación		4 h incubación		24 h incubación	
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH
Ca ²⁺	-0,55*	-0,33	-0,62*	-0,59*	-0,25	0,04	0,11	0,43*
Cl ⁻	0,23	-0,23	-0,15	-0,05	-0,04	-0,07	0,08	0,63*
K ⁺	-0,05	-0,14	-0,05	0,11	-0,02	0,06	0,05	0,28
Mg ²⁺	-0,37	-0,31*	-0,62*	-0,61*	-0,06	-0,06	0,07	0,38*
Na ⁺	-0,34	-0,75*	-0,80*	-0,66*	-0,77*	0,62*	-0,19	0,92*
NH ₄ ⁺	0,21	0,03	0,20	-0,20	0,24	-0,16	-0,05	-0,08
PO ₄ ³⁻	0,21	0,03	0,20	-0,20	0,47*	-0,15	-0,06	-0,08
SO ₄ ²⁻	-0,32	-0,30	-0,33	0,26	-0,25	0,06	-0,30	0,38

5.1.8. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la actividad de enzimas del metabolismo del carbono y nitrógeno

5.1.8.1. Actividad Rubisco en la hoja bandera

El crecimiento en CO₂ elevado condujo, con respecto a las plantas en CO₂ ambiente, a un descenso de la actividad Rubisco total en plantas con N abundante a las 4 h de incubación, e incrementó el estado de activación del enzima a las 24 h en aquellas deficientes en N (Tabla 5.1.8.1a). La mayor disponibilidad de N indujo un aumento de la actividad inicial y total de la Rubisco y un descenso del estado de activación del enzima en ambos periodos de incubación, que se acompañó de un aumento de la eficiencia catalítica de la Rubisco a las 4 h (Tabla 5.1.8.1a).

Tabla 5.1.8.1a. Actividad Rubisco inicial (ARI) y total (ART) por unidad de superficie foliar (μmol·s⁻¹·m⁻²), estado de activación (%) y eficiencia catalítica de la Rubisco (s⁻¹) en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negra indican efectos significativos, P<0,05 (n=4).

		AL	EL	AH	EH	P _N	lsd _N	P _{CO₂L}	lsd _{CO₂L}	P _{CO₂H}	lsd _{CO₂H}
ARI	4 h	17,76	16,81	28,55	25,51	<0,001	3,55	0,676	5,28	0,284	7,45
	24 h	18,05	14,88	24,36	26,29	<0,001	4,18	0,258	6,67	0,518	7,12
ART	4 h	25,99	23,39	62,28	53,74	<0,001	4,07	0,405	7,11	0,013	5,54
	24 h	21,71	17,58	42,13	43,34	<0,001	7,08	0,245	9,11	0,817	12,29
% activación	4 h	64,18	72,30	50,03	61,05	0,046	12,40	0,218	14,84	0,300	24,48
	24 h	81,98	91,74	58,74	56,30	<0,001	10,54	0,013	6,41	0,782	20,63
k _{cat}	4 h	1,69	1,54	2,05	1,93	0,013	0,27	0,546	0,63	0,155	0,19
	24 h	1,43	1,56	1,31	1,34	0,419	0,46	0,731	1,01	0,904	0,53

5.1.8.2. Actividad nitrato reductasa en la hoja bandera y la raíz

En la hoja bandera, el CO₂ elevado indujo, en comparación con las plantas crecidas en CO₂ ambiente, un aumento de la actividad NR máxima en plantas con N abundante a las 24 h de incubación (Tabla 5.1.8.2a). La abundancia de N aumentó la actividad NR y disminuyó el estado de activación del enzima a las 4 y 24 h de incubación. En la raíz, el CO₂ elevado disminuyó la actividad NR máxima en plantas con un aporte de N bajo a las 24 h, y aumentó el estado de activación del enzima con ambos niveles de N a las 24 h (Tabla 5.1.8.2a). El mayor aporte de N disminuyó la actividad NR máxima a las 4 h, mientras que a las 24 h aumentó la actividad NR máxima y selectiva y redujo el estado de activación de la NR.

Tabla 5.1.8.2a. Actividad nitrato reductasa máxima (ANRm) y selectiva (ANRs) por unidad de peso fresco ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y estado de activación del enzima (%) en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. P, probabilidad; lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza. Los números en negrita indican efectos significativos, $P < 0,05$ (n=4 para hoja, n=12 para raíz).

		AL	EL	AH	EH	P_N	lsd _N	$P_{\text{CO}_2\text{L}}$	lsd _{CO2L}	$P_{\text{CO}_2\text{H}}$	lsd _{CO2H}
Hoja bandera											
ANRm	4 h	12,47	11,98	14,61	15,84	0,006	1,92	0,649	2,77	0,395	3,29
	24 h	19,01	15,93	27,90	34,02	<0,001	3,52	0,248	5,88	0,032	5,34
ANRs	4 h	10,54	10,11	8,27	11,60	0,642	1,81	0,477	1,50	0,056	3,46
	24 h	16,95	15,06	17,32	21,06	0,043	3,06	0,386	4,93	0,104	4,78
% activación	4 h	83,65	84,47	56,52	73,47	<0,001	9,20	0,787	7,34	0,066	18,52
	24 h	89,57	95,31	61,92	68,18	<0,001	7,19	0,350	13,84	0,116	8,33
Raíz											
ANRm	4 h	2,16	2,26	1,71	1,92	0,008	0,29	0,607	0,37	0,368	0,48
	24 h	2,78	2,30	3,42	3,87	<0,001	0,46	0,029	0,43	0,675	0,86
ANRs	4 h	0,75	0,82	0,66	0,80	0,516	0,17	0,123	0,10	0,391	0,35
	24 h	1,57	1,81	3,42	3,87	<0,001	0,33	0,087	0,28	0,149	0,62
% activación	4 h	35,81	39,64	40,51	38,00	0,666	7,15	0,372	8,73	0,672	12,24
	24 h	56,85	76,22	55,87	66,79	0,009	3,85	<0,001	6,00	<0,001	5,20

5.1.9. Análisis multivariable del contenido de metabolitos, proteínas e iones y de las actividades enzimáticas

Se realizó un análisis multivariable con los datos de intermediarios metabólicos, proteínas, iones y actividades enzimáticas mencionados con anterioridad. Inicialmente, se efectuó un análisis indirecto de los datos mediante una representación biplot del análisis PCA para cada órgano (82 parámetros para la hoja bandera y 76 para la raíz) y periodo de incubación, que incluyó sólo las variables que explicaban la mayor variabilidad (Fig. 5.1.9a). El primer eje del PCA para la hoja bandera a las 4 h explicó el 43,5% de la divergencia en los datos y mostró que la primera componente se podría relacionar con la disponibilidad de N, mientras que la segunda componente explicó el 15,5%. Las plantas con mayor disponibilidad de N tendieron a tener un mayor contenido de compuestos nitrogenados y un menor contenido de intermediarios del metabolismo del C. En el PCA para la hoja bandera a las 24 h, el primer y segundo eje explicaron el 44,4% y 13,1% de la divergencia en los datos, respectivamente, revelando por la disposición de los centroides que el primer eje estuvo relacionado con la disponibilidad de N y el segundo con la $[\text{CO}_2]$ de crecimiento. En el PCA para la raíz a las 4 h, el primer eje explicó el 47,8% de la variabilidad y mostró una notable diferencia en la disposición de los centroides y en el comportamiento de las variables con la disponibilidad de N. En este caso, un mayor aporte de N condujo a un mayor contenido de compuestos nitrogenados, de ATP y de iones NH_4^+ y PO_4^{3-} . El eje 2 explicó el 13,4% de la variabilidad en los datos y se relacionó con la $[\text{CO}_2]$ de crecimiento. Los tratamientos en CO_2 elevado tendieron a tener un menor contenido de aminoácidos y de NH_4^+ y PO_4^{3-} con respecto a los tratamientos en CO_2 ambiente para cada disponibilidad de N. Por último, en el PCA para la raíz a las 24 h, el primer eje explicó el 59,5% de la diferencia en los datos y se relacionó con el suministro de N, mientras que el segundo eje explicó el 13,4% de la variabilidad y se relacionó con la $[\text{CO}_2]$ de crecimiento. La disposición de los centroides indicó diferencias mayores con el CO_2 de crecimiento en plantas con un aporte de N alto.

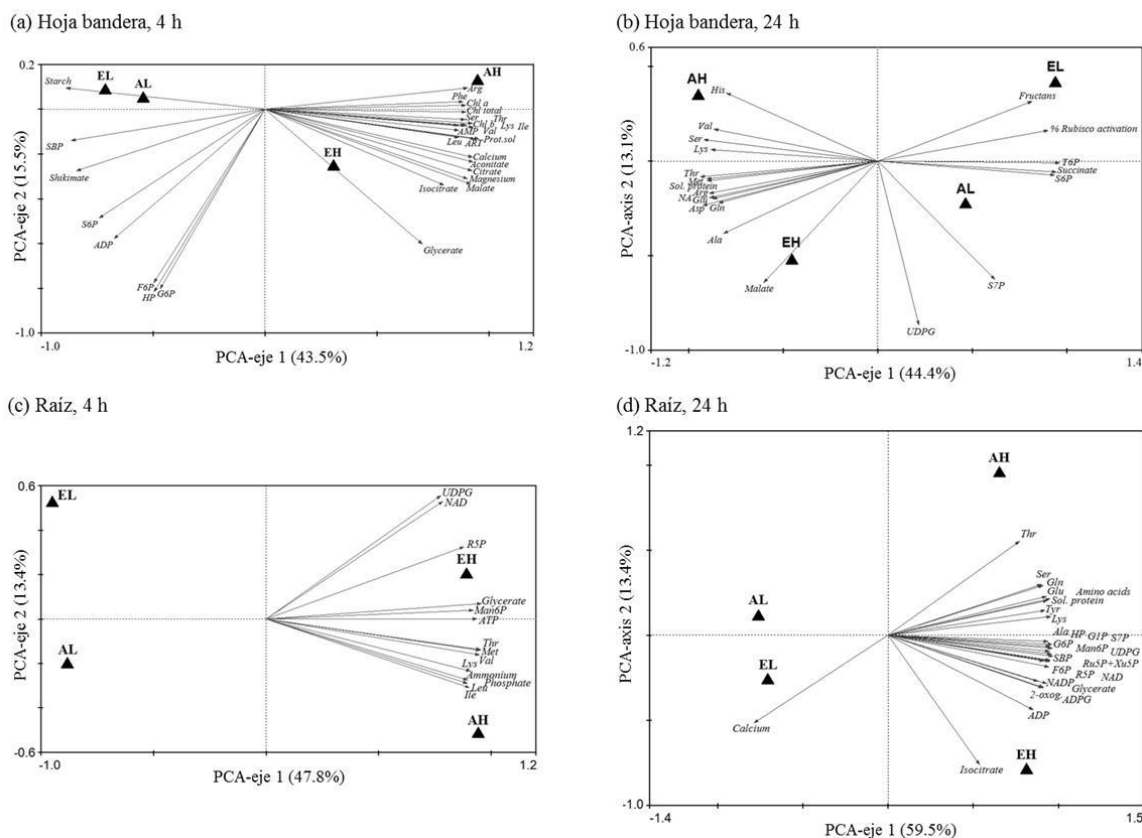


Fig. 5.1.9a. Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados de intermediarios metabólicos, proteínas, iones y actividades enzimáticas de (a) la hoja bandera a las 4 h de incubación y (b) a las 24 h, y de (c) la raíz a las 4 h y (d) a las 24 h en plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en la antesis. Los triángulos representan los centroides de los diferentes tratamientos en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻). Las flechas representan las variables analizadas que explican mayor variabilidad: 75-100% para la hoja bandera (29/83 a las 4 h y 21/83 a las 24 h) y 85-100% para la raíz (14/76 a las 4 h y 27/76 a las 24 h). Los valores de los ejes indican los porcentajes de variación total explicado por cada eje.

Tabla 5.1.9a. Análisis de redundancia del efecto del CO₂, NO₃⁻ y la interacción CO₂ × N en el contenido de metabolitos, proteínas e iones y en las actividades enzimáticas en la hoja bandera y la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. La variabilidad explicada es la suma de todos los valores canónicos propios (“eigenvalues”). La significación estadística se calculó a partir de la prueba de Monte Carlo, sin restricciones, con 999 permutaciones.

Tejido	Muestreo	Variables explicativas	Covariables	F	P	Variabilidad explicada
Hoja bandera	4 h	CO ₂	N	1,528	0,082	7,6%
		N	CO ₂	5,472	0,001	27,4%
		CO ₂ × N	CO ₂ , N	1,312	0,170	6,4%
Hoja bandera	24 h	CO ₂	N	2,221	0,002	10,0%
		N	CO ₂	6,960	0,001	31,4%
		CO ₂ × N	CO ₂ , N	1,579	0,046	6,8%
Raíz	4 h	CO ₂	N	1,704	0,011	7,0%
		N	CO ₂	9,673	0,001	39,7%
		CO ₂ × N	CO ₂ , N	1,262	0,198	5,1%
Raíz	24 h	CO ₂	N	2,526	0,002	8,4%
		N	CO ₂	14,634	0,001	48,5%
		CO ₂ × N	CO ₂ , N	2,112	0,005	6,4%

Posteriormente, se realizó un análisis multivariable directo de los mismos datos mediante un RDA con el fin de comprobar el grado de significación de los efectos de la $[CO_2]$ de crecimiento, la disponibilidad de N y su interacción. Los resultados mostraron significación estadística para los tres factores (Tabla 5.1.9a). La prueba de Monte Carlo para todos los ejes canónicos mostró significación estadística en la hoja bandera ($F=1,579$; $P=0,046$) y la raíz ($F=2,112$; $P=0,005$) a las 24 h.

Se construyeron los correspondientes gráficos biplot del análisis RDA para los casos en que resultó significativa la interacción $CO_2 \times N$, mostrando las variables que explican mayor variabilidad ($\geq 75\%$). En el RDA para la hoja bandera a las 24 h, el primer y segundo eje canónico explicaron el 35,1% y 7,5% de la variabilidad, respectivamente (Fig. 5.1.9b). Los centroides de los tratamientos fueron significativamente separados por el primer eje, mientras que el segundo eje no alcanzó significancia estadística ($P=0,079$). Ciertos parámetros, como las proteínas solubles y diferentes aminoácidos, aumentaron en plantas crecidas en CO_2 ambiente con respecto a aquellas crecidas en CO_2 elevado con un aporte de N alto, y en plantas con abundancia de N con respecto a aquellas deficientes en dicho nutriente. La deficiencia de N aumentó, en comparación con las plantas con abundancia de N, el estado de activación de la NR y el contenido de FBP y SBP en las plantas crecidas en CO_2 ambiente y de CST, fructanos y almidón en las plantas crecidas en CO_2 elevado. Se realizaron análisis RDA por separado en las plantas con un aporte de N bajo y alto, con la finalidad de evaluar si el efecto multivariable de la $[CO_2]$ de crecimiento es significativo para cada disponibilidad de N. Con un aporte de N bajo, el efecto explicativo de la $[CO_2]$ de crecimiento fue significativo ($F=2,862$; $P=0,023$), con un 32,3% de la variabilidad explicada por todos los ejes canónicos. Con un aporte de N alto, el efecto explicativo de la $[CO_2]$ fue también significativo ($F=1,925$; $P=0,023$), con un 24,3% de la variabilidad explicada por todos los ejes canónicos.

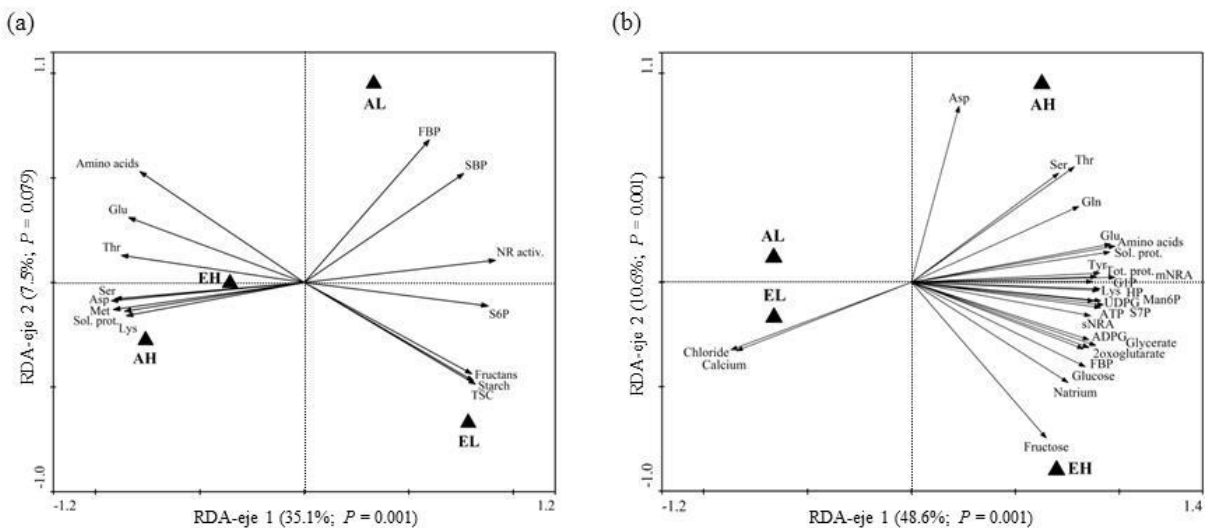


Fig. 5.1.9b. Análisis de redundancia (RDA) de los resultados de intermediarios metabólicos, proteínas, iones y actividades enzimáticas de (a) la hoja bandera y (b) la raíz a las 24 h de incubación en plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en la antesis. Los triángulos representan los centroides de los diferentes tratamientos en respuesta al CO_2 (A, 390; E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO_3^-). Las flechas representan las variables analizadas que explican mayor variabilidad (75-100%) para la hoja bandera (13/83 a las 4 h y 14/83 a las 24 h) y para la raíz (13/76 a las 4 h y 27/76 a las 24 h). Los valores de los ejes indican los porcentajes de variación total explicado por cada eje y el valor de P .

En el RDA correspondiente a la raíz a las 24 h, el primer y segundo eje canónico explicaron el 48,6% y 10,6% de la variabilidad, respectivamente (Fig. 5.1.9b). Los centroides de los tratamientos fueron

significativamente separados por el primer y segundo eje. El contenido de algunos aminoácidos y ácidos orgánicos, proteínas solubles, ATP, Na⁺ y la actividad NR aumentaron en las plantas crecidas con un aporte de N alto con respecto a aquellas con N bajo. El contenido de Cl⁻ y Ca²⁺ aumentaron en plantas con un aporte de N bajo y fueron ligeramente mayores en CO₂ elevado que en ambiente. Con un aporte de N alto, el CO₂ elevado disminuyó, en comparación con las plantas crecidas en CO₂ ambiente, el contenido total y de algunos de los aminoácidos y de las proteínas solubles, e incrementó el contenido de fructosa, Na⁺, glucosa, FBP y algunos ácidos orgánicos, entre otros compuestos. El efecto explicativo de la [CO₂] de crecimiento fue de nuevo significativo para ambos suministros de N después de realizar un análisis RDA por separado para cada disponibilidad de N ($F=1,764$ y $P=0,023$ para un aporte bajo; $F=2,880$ y $P=0,023$ para un aporte alto). La variabilidad explicada por todos los ejes canónicos fue de 22,7% y 32,4% para cada uno de los aportes de N antes indicados, respectivamente.

5.1.10. Efecto del CO₂ de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en la expresión de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera y la raíz

La plataforma de qRT-PCR para el trigo duro optimizada en esta Tesis Doctoral, como se describe en el capítulo anterior, se utilizó para evaluar el patrón de expresión génica en la hoja bandera y la raíz de este experimento (Tabla 4.1.7.2a, Anexo 3A). Dicha plataforma se amplió con la inclusión de siete nuevos genes involucrados en la ruta de síntesis de clorofilas (Tabla 5.1.10a). Para la identificación de las secuencias de los genes se siguió el mismo procedimiento empleado para el resto de genes candidatos de la plataforma (ver apartado 3.2.8 en Materiales y Métodos). Así, se propusieron seis genes ortólogos por homología con las secuencias de genes bien anotadas en otras especies vegetales en la base de datos TaGI, en concreto, se utilizaron aquellas disponibles para *Hordeum vulgare*, *Brachypodium distachyon* y *Avena sativa*. Mientras que el gen correspondiente a la protoclorofilida oxidorreductasa fue anotado como posible isoforma A después de realizar un árbol filogenético con las secuencias de otras especies vegetales. Para las secuencias de los siete nuevos genes identificados se diseñaron primers específicos, los cuales se validaron experimentalmente en material vegetal correspondiente a la hoja bandera de trigo duro cv. Regallo (Anexo 3B).

Tabla 5.1.10a. Enzimas de la síntesis de clorofilas incorporadas a la plataforma de genes para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro (*Triticum turgidum* spp. *durum*). Se indica el número EC (*Enzyme Commission number*). Los primers se validaron en tejido foliar.

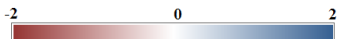
Nº acc.	Descripción	Enzima
TC407277	Probable glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, GSA-AT (95% similar a M31545 de <i>Hordeum vulgare</i>)	EC 5.4.3.8
TC400011	Probable magnesio quelatasa, MgCh (93% similar a U26545 de <i>Hordeum vulgare</i>)	EC 6.6.1.1
TC429116	Probable magnesio protoporfirina IX metiltransferasa, MgMT (86% similar a XM_003561090 de <i>B. distachyon</i>)	EC 2.1.1.11
TC369906	Probable magnesio protoporfirina IX monometil ester ciclasa, MgCy (94% similar a AY887063 de <i>Hordeum vulgare</i>)	EC 1.14.13.81
X76532	Probable protoclorofilida oxidoreductasa A, PORA	EC 1.3.1.33
TC389431	Probable clorofila sintasa, ChlS (90% similar a AJ277210 de <i>Avena sativa</i>)	EC 2.5.1.62
TC376386	Probable clorofilida a oxigenasa, CAO (94% similar a JQ627619 de <i>Hordeum vulgare</i>)	EC 1.14.13.122

En la hoja bandera de plantas deficientes en N, el crecimiento en CO₂ elevado redujo los niveles de transcritos de la mayoría de genes del metabolismo del C y N, en particular aquellos que participan en la CTEF (LHCI, proteína D1 y Fd), el ciclo de Calvin-Benson (RBA, cpn60, una CA plastídica, FBA

y TK plástica), la síntesis de almidón (SSIII, SSIV y AGPPasa), el ciclo TCA (IDH) y la asimilación del N (NR, Fd-GOGAT y CLC), junto a los TFs (Dof1 y NF-YB3) a las 4 h de incubación (Tabla 5.1.10b). En dichas condiciones, el CO₂ elevado indujo también un aumento de la abundancia de transcritos de los genes que codifican la TRE y el transportador NRT1.1B y, en menor extensión, aquellos que codifican las FTs (Tabla 5.1.10b). En la raíz de las plantas deficientes en N, el enriquecimiento en CO₂ incrementó la expresión para el transportador AMT2;1 y redujo los transcritos para la AS y AGL1 a las 4 h (Tabla 5.1.10c). Sin embargo, a las 24 h de incubación, el CO₂ elevado indujo la expresión de algunos genes que codifican proteínas fotosintéticas (LHCI, proteínas D1 y D2 y la subunidad grande de la Rubisco) en la hoja bandera de plantas deficientes en N, junto a la de otros genes que codifican proteínas que participan en la síntesis de carbohidratos (SSIII, FBPasa citosólica, SPS, 1-SST, 6-SFT, 1-FFT-A y 1-FFT-B) y la degradación de fructanos (6-KEH), y la del transportador NRT1.5B y la proteína HSP90 (Tabla 5.1.10b). Además, el enriquecimiento en CO₂ condujo a un descenso de los niveles de transcritos para la PsaB, la proteína de la fotorrespiración GO, de la pared celular cwINV, de la glicólisis (PGI citosólica, PEPC y PK), del ciclo TCA (CS y la subunidad E1 de OGDH), de la asimilación del N (NRT2.2, NAR2.1, NAR2.2, NADH-GOGAT y AS), del metabolismo de carbohidratos (subunidad pequeña de la AGPasa, SUS, 1-FEH y 6&1-FEH) y de los TFs MYB13.1 y Dof1 en las plantas deficientes en N a las 24 h (Tabla 5.1.10b). En estas condiciones, el CO₂ elevado sólo indujo la expresión del gen que codifica el transportador NRT1.5B a nivel radicular (Tabla 5.1.10c).


En las plantas con N abundante, el CO₂ elevado condujo a un aumento de transcritos de genes involucrados en la síntesis fructanos (1-SST, 6-SFT, 1-FFT-A, 1-FFT-B), la glicólisis (FBA citosólica y GAPN), la asimilación del N (NRT1.1A, NRT1.1B, NRT1.3A, NRT1.8B, GSr1 y GDH) y del TF (MYB13.1) en la hoja bandera a las 4 h de incubación (Tabla 5.1.10b), y de genes del metabolismo del N en la raíz (AMT1;2, NRT1.5B y NRT2.2; Tabla 5.1.10c). Además, el CO₂ alto disminuyó los niveles de transcritos de genes que participan en la hidrólisis de fructanos (6&1-FEH), la glicólisis (PEPC) y la asimilación del N (NAR2.1 y AS) en la hoja bandera de dichas plantas (Tabla 5.1.10b). Sin embargo, a las 24 h de incubación, el aumento de CO₂ disminuyó la expresión de genes de la CTEF (proteínas D1 y D2, FNR y ATPasa plástica), de la síntesis de clorofilas (MgCy), del ciclo de Calvin-Benson (subunidad grande de la Rubisco, dos CAs plásticas, PGK plástica y SBPasa), de la fotorrespiración (PGLP, CAT, GGAT, SGAT y SHMT), de la síntesis y degradación de carbohidratos (IPP, AGPPasa, ISO3, FBPasa citosólica, SUS, 1-FEH, 6&1-FEH, 6-KEH y TPS), de la pared celular (cwINV y CESA), de la glicólisis (HXK, PGM plástica y citosólica, PFK, F2KP, GAPN, PGK citosólica y PEPC), del ciclo TCA (ICDH) y de la asimilación del N (AS y CLC) en la hoja bandera de las plantas con abundancia de N (Tabla 5.1.10b). A su vez, el CO₂ elevado indujo a nivel foliar la expresión de los genes que codifican las proteínas GO, HSP90 y Dof1 (Tabla 5.1.10b), y de varios genes involucrados en la asimilación del N (AMT2;1, NRT1.1B, NRT1.8B y GSr1). A nivel radicular, el enriquecimiento en CO₂ indujo un notable aumento de la abundancia de transcritos de los genes para la SSI, PK y AGL1, junto a un gran número de genes de la asimilación del N (AMT1;1, AMT1;2, NRT1.5B, NRT1.7B, NRT2.1, NRT2.2, NRT2.3, NAR2.1, NAR2.2, NR, NiR y NADH- y Fd-GOGAT) en las plantas con N abundante a las 24 h de incubación (Tabla 5.1.10c).

Tabla 5.1.10b. Heat map del nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂. Los genes inducidos o reprimidos de color azul y rojo, respectivamente, según la escala de color. *, P<0,05; **, P<0,001 (n=3). Las abreviaturas de los transcritos se detallan en la Tabla 4.1.7.2a.



	4 h incubación		24 h incubación		4 h incubación		24 h incubación	
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH
Transporte electrónico fotosintético								
LHCI	-2,23*	0,17	0,95**	0,56				
LHCII	-0,21	-0,43	0,57	0,29				
PsaA	-0,14	0,07	0,16	-0,39				
PsaB	-0,11	0,22	-0,09*	-0,51				
D1	-1,17*	-0,09	1,08*	-0,55*				
D2	-0,31	0,03	0,72*	-0,45*				
Cytb6f prot. Rieske	-0,02	0,08	0,06	-0,09				
PC	-0,39	-0,14	0,51	-0,02				
Fd	-1,61*	0,32	0,27	0,43				
FNR	-0,29	0,17	0,38	-0,25*				
Energía								
ATPasa β sub. chl.	-0,44	0,00	0,56	-0,39*				
ATPasa β sub. mit.	-0,58	0,08	-0,35	0,05				
ATPasa B1 sub. vac.	-0,14	-0,03	-0,23	-0,12				
Síntesis de clorofilas								
GluTR	-1,00	-0,38	0,08	-0,02				
GSA-AT	-0,13	-0,24	-0,11	-0,15				
MgCh	-0,74	-0,14	-0,31	0,03				
MgMT	-0,69	-0,04	-0,24	0,03				
MgCy	-0,10	-0,11	-0,06	-0,48*				
PORA	-0,32	0,18	0,25	-0,27				
ChlS	-0,27	-0,18	-0,01	-0,54				
CAO	-0,22	0,08	-0,23	-0,31				
Ciclo oxidativo y reductivo de las pentosas fosfato (cloroplasto)								
Rubisco sub. gr.	-0,01	0,04	0,36*	-0,32**				
Rubisco sub. peq.	-0,75	-0,02	0,43	0,06				
RBA	-0,38*	-0,15	-0,13	-0,31				
cpn60	-1,20*	0,14	-0,12	-0,08				
CA	-0,89*	0,14	-0,26	-0,95*				
CA	-0,36	-0,12	-0,27	-0,82*				
CA	-0,40	-0,14	-0,01	-0,97				
CA	-0,07	-0,06	0,14	-0,25				
PGK plast.	0,33	0,19	0,21	-0,24*				
GAPDH plast.	-0,62	0,20	0,08	0,17				
TPI plast.	-0,17	0,19	0,06	-0,08				
FBA plast.	-0,97*	0,35	0,27	-0,39				
FBPasa plast.	-0,18	0,05	0,55	-0,22				
TK plast.	-0,70*	0,20	0,09	-0,01				
SBPasa	-0,73	0,05	0,00	-0,32*				
RPE plast.	-0,27	-0,06	0,25	-0,35				
RPI plast.	-0,14	-0,10	-0,29	0,01				
PRK plast.	-0,45	0,28	0,42	0,14				
CP12	-0,10	0,11	0,47	0,05				
Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (citósol)								
RPE cit.	-0,15	0,07	0,49	-0,61				
RPI cit.	-0,70	-0,19	-0,17	-0,05				
Fotorrespiración								
PGLP	0,05	-0,04	0,37	-0,85*				
GO	-0,29	-0,75	-0,58*	0,72*				
CAT	-0,28	0,03	-0,14	-0,62*				
GGAT	-0,09	-0,05	-0,10	-0,89*				
SGAT	-0,09	-0,02	0,17	-0,66*				
GDC sub. P	-0,25	0,24	-0,06	-0,64				
GDC sub. H	0,02	0,16	0,36	-0,65				
SHMT mit.	-0,03	0,05	0,11	-0,70*				
HPR1 perox.	0,25	0,11	0,10	-0,16				
GLYK	-0,02	0,44	0,27	0,15				
Síntesis y degradación de carbohidratos								
IPP	-0,27	0,22	0,27	-0,65**				
AGPPasa	-1,41*	-0,42	-0,50	-0,47*				
AGPasa sub. gr.	-0,32	0,07	0,09	-0,08				
AGPasa sub. peq.	-0,08	0,10	-0,19*	-0,26				
SSI	0,02	0,10	-0,16	-0,23				
SSIII	-1,13*	-0,11	0,20*	0,04				
SSIV	-1,32*	0,46	0,19	-0,26				
ISO1	0,19	-0,68	0,09	-0,22				
ISO3	0,11	0,10	-0,45	-0,76*				
TPT	-0,11	0,66	-0,32	-0,16				
GPT	0,21	0,89	0,05	-0,10				
FBPasa cit.	-0,64	0,22	0,56**	-0,66*				
NDK cit.	0,27	0,07	0,24	-0,12				
UGPasa	0,11	-0,03	-0,25	-0,05				
Síntesis y degradación de carbohidratos								
SPS	-0,74	0,05	0,62*	-0,01				
SPP	-0,16	0,06	0,25	-0,15				
SUS	-0,35	-0,37	-0,22*	-0,64*				
AInv	-0,12	-0,36*	0,16	-0,63				
1-SST	1,66	1,02**	1,32*	0,53				
6-SFT	2,39	1,89*	1,46**	0,43				
1-FFT A	1,57	1,80*	1,45*	0,64				
1-FFT B	2,41	1,25*	1,08*	0,66				
1-FEH	-0,19	-0,24	-0,81*	-0,67*				
6&1-FEH	-0,55	-1,16*	-0,60*	-1,22*				
6-KEH	-0,31	-0,40	0,70*	-2,30*				
TPS	0,06	-0,02	0,40	-0,37*				
TRE	0,53*	0,40	0,59*	0,05				
Pared celular								
CESA	-0,08	0,01	-0,07	-0,81*				
cwInv	-0,09	-0,59	-0,38*	-0,30*				
Glicólisis								
HXK	-0,37	-0,01	0,11	-0,39*				
PGM plast.	0,02	0,18	0,08	-0,53*				
PGM cit.	-0,13	0,10	0,04	-0,56*				
PGI plast.	0,10	-0,04	0,08	-0,01				
PGI cit.	-0,70	-0,74	-0,60*	0,33				
PFK	0,06	0,29	-0,22	-0,54				
PFK	-0,01	0,38	-0,16	-0,50*				
F2KP	-0,53	-0,14	-0,60	-0,73*				
FBA cit.	-0,40	0,21*	0,06	-0,27				
TPI cit.	-0,10	0,02	0,08	-0,27				
GAPC cit.	0,02	0,00	-0,07	-0,37				
GAPN cit.	-0,10	0,32*	0,15	-0,63*				
PGK cit.	-0,26	0,14	0,06	-0,17*				
PGAM	0,17	0,02	-0,13	-0,44				
PEPC	-0,06	-0,15*	-0,46*	-0,44**				
PK	0,16	0,06	-0,38*	-0,40				
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos								
PCD sub. α mit.	-0,13	-0,15	-0,18	-0,18				
CS mit.	-0,33	-0,05	-0,25*	-0,04				
IDH mit.	-0,18*	-0,04	-0,03	0,17				
ICDH cit.	0,08	-0,69	-0,20	-1,06*				
OGDC sub. E1	-0,13	-0,12	-0,54*	-0,24				
Asimilación de nitrógeno								
AMT1:2	0,14	0,49	0,05	-0,14				
AMT2:1	-0,12	0,08	-0,04	0,46*				
NRT1.1A	0,35	0,59*	0,20	0,13				
NRT1.1B	0,46*	1,02*	0,72	0,30*				
NRT1.3A	0,33	1,01*	0,27	0,17				
NRT1.5B	-0,06	0,36	0,63*	-0,58				
NRT1.7B	0,75	0,46	-0,24	-0,14				
NRT1.8B	0,16	1,37*	0,08	0,62*				
NRT2.2	-0,56	-0,40	-0,83**	-0,11				
NAR2.1	-0,28	-0,54*	-0,96*	-0,82				
NAR2.2	0,13	-0,05	-0,92*	0,09				
NADH-NR	-1,27*	1,74	0,10	0,06				
MoCo	0,02	0,24	0,08	0,07				
NiR	-0,56	1,15	-0,87	-0,16				
GS1a	0,04	0,85*	0,04	-0,09				
GSr1	-0,85	1,01*	-0,79	0,82*				
GS2a	0,08	0,03	-0,11	-0,11				
GS2b	0,54	0,14	-0,13	-0,06				
NADH-GOGAT	-0,74	0,16	-0,81*	-0,95				
Fd-GOGAT	-0,95*	0,35	-0,23	-0,54				
GDH	-0,01	0,65*	-0,07	-0,08				
AAT cit.	0,04	0,11	0,03	0,01				
AAT plast.	0,00	0,07	0,11	-0,36				
AS	-0,03	-0,93*	-0,86*	-1,00*				
CLC	-0,43*	-0,19	-0,43	-0,45*				
Estrés								
HSP90.1-A1	-0,09	0,34	2,81**	2,50*				
HSP70	-2,65	0,28	-0,02	-0,07				
Factores de transcripción								
MYB13-1	0,15	0,79*	-0,39*	-0,12				
Dof1	-0,35*	-0,14	-0,99*	0,54*				
NF-YB3	-0,42*	-0,32	-0,19	-0,19				

Tabla 5.1.10c. Heat map del nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂. Los genes inducidos o reprimidos varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente, según la escala de color. *, P<0,05; **, P<0,001 (n=3). Las abreviaturas de los transcritos se detallan en la Tabla 4.1.7.2a.



	4 h incubación		24 h incubación		4 h incubación		24 h incubación	
	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH	EL vs AL	EH vs AH
Síntesis y degradación de carbohidratos								
AGPasa sub. gr.	1,14	-0,52	0,01	-0,12				
AGPasa sub. peq.	-0,03	-0,01	-0,08	0,10				
SSI	0,13	-0,22	-0,31	1,12*				
SPS	0,39	0,04	-0,21	0,34				
Alnv	-0,06	0,17	0,05	0,46				
1-SST	0,10	0,47	-0,19	0,26				
6-SFT	0,34	0,49	-0,69	0,28				
1-FFT A	0,54	0,46	-0,16	0,06				
1-FFT B	0,33	0,29	-0,20	0,24				
Glicólisis								
HXK	0,51	0,51	0,03	0,24				
PK	-0,26	0,03	0,01	1,43**				
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos								
CS mit.	-0,03	0,17	0,06	0,43				
GDHC sub. E1	-0,01	0,14	0,08	0,27				
Asimilación de nitrógeno								
AMT1:1	-0,05	0,59	-0,26	2,11*				
AMT1:2	-0,11	0,67*	0,27	2,08**				
AMT2:1	0,54*	0,87	0,29	0,17				
NRT1.1A	0,54	-0,10	0,04	-1,11				
NRT1.1B	-0,29	-1,74	0,56	0,58				
Asimilación de nitrógeno								
NRT1.2	0,23	0,45					-0,15	-0,23
NRT1.3A	0,88	-0,12					0,00	-0,16
NRT1.5B	-1,11	1,67*					1,82*	1,13*
NRT1.7B	-0,67	-0,64					0,33	0,53*
NRT2.1	-0,45	1,02*					-0,43	2,38*
NRT2.2	-0,13	0,65					0,01	2,43*
NRT2.3	-0,09	0,87					-0,18	2,77*
NAR2.1	0,05	0,73					0,02	1,55**
NAR2.2	-0,07	0,51					-0,21	1,97**
NADH-NR	0,08	0,48					0,09	2,31*
MoCo	0,09	0,16					0,14	0,42
NiR	0,03	0,30					-0,23	2,42*
GS1a	0,14	0,10					0,25	0,39*
NADH-GOGAT	-0,24	0,11					-0,18	2,84*
Fd-GOGAT	0,00	-0,06					-0,14	2,03**
GDH	-0,06	-0,14					0,43	-0,50
AS	-1,04*	-2,23					-0,71	-2,34
Factores de transcripción								
Dof1		-0,01					-0,36	-0,07
AGL1		-0,25*					0,13	0,85*
WM30		0,15		0,01			0,15	0,06

5.1.11. Integración de los resultados de metabolitos, transcritos y proteína Rubisco

Para la visualización por rutas metabólicas de los datos integrados de metabolitos junto a los transcritos de genes del metabolismo del C y N y la proteína Rubisco, se utilizó MapMan (Figs. 5.1.11a-5.1.11g). En cada figura, se detallan los cambios que indujo el crecimiento a [CO₂] elevadas para cada una de las disponibilidades de N y periodo de incubación investigados en este estudio. Los resultados, expresados como log₂ (tratamiento en CO₂ elevado/tratamiento en CO₂ ambiente), de los metabolitos se muestran en forma de círculo, de la abundancia de transcritos en forma de cuadrado y del contenido de proteína Rubisco en forma de triángulo, los cuales se describirán en el apartado de Discusión.

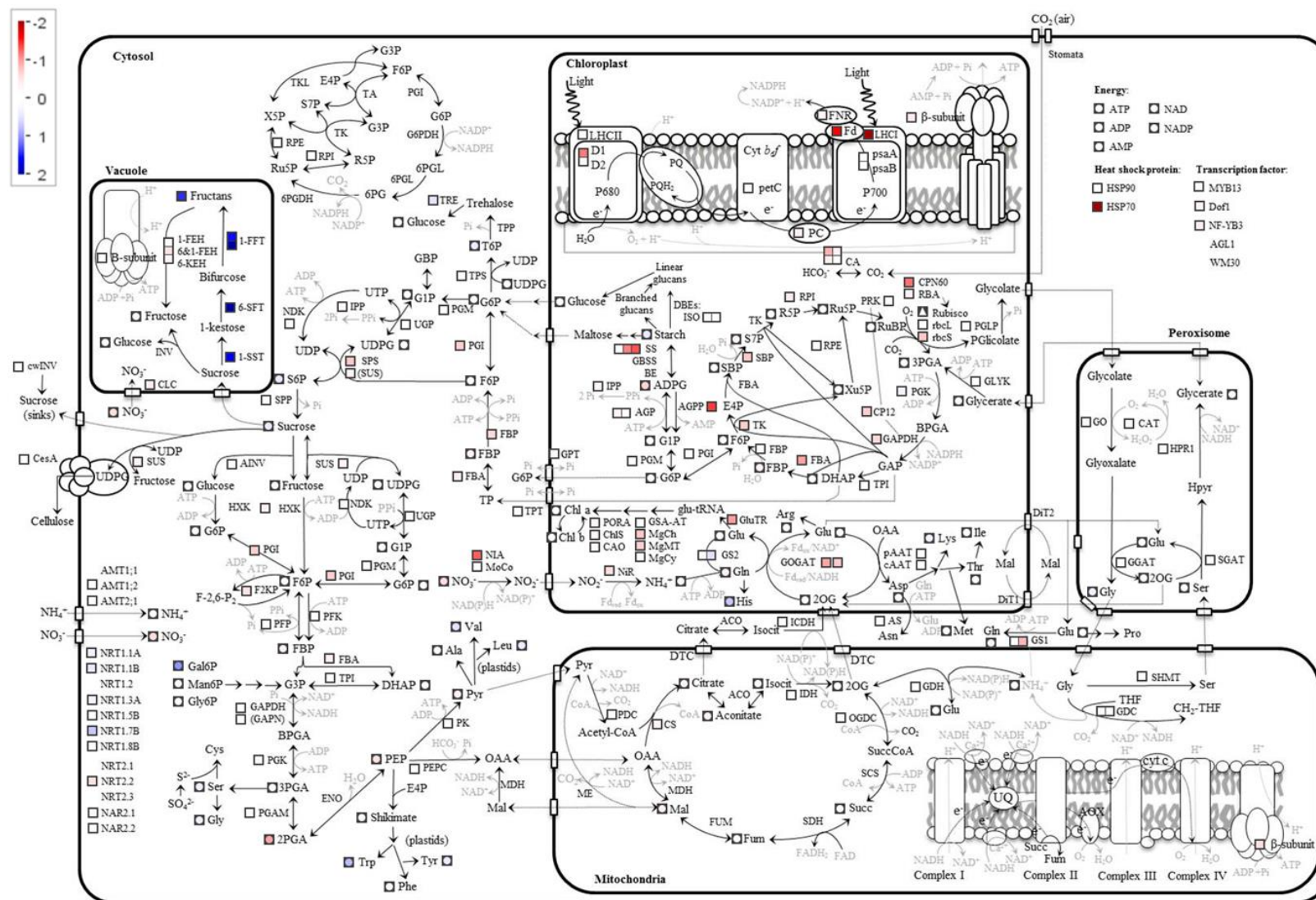


Fig. 5.1.11a. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N bajo (0,25 mM NO₃⁻) a las 4 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EL con respecto a AL.

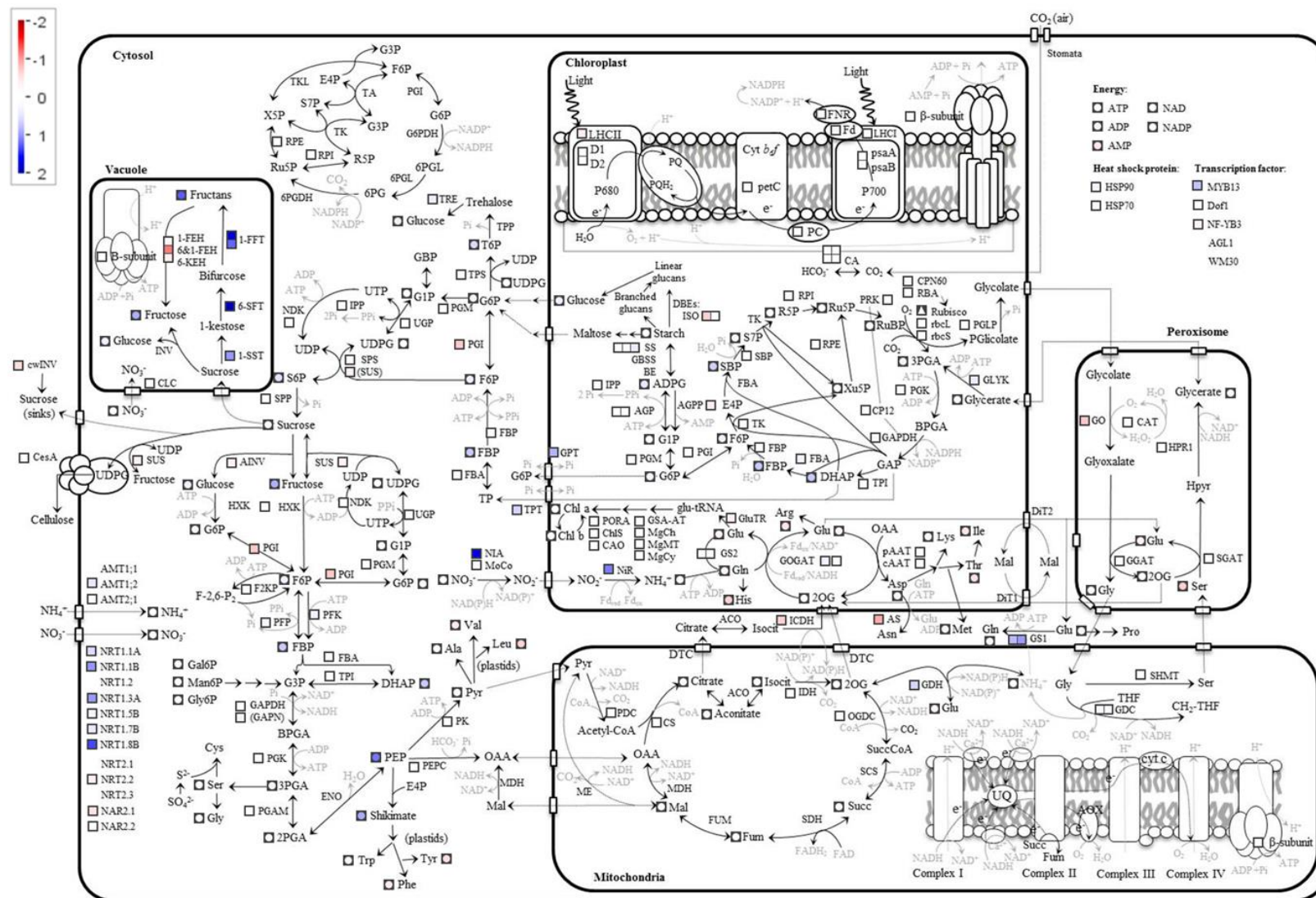


Fig. 5.1.11b. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N alto (2,5 mM NO₃⁻) a las 4 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

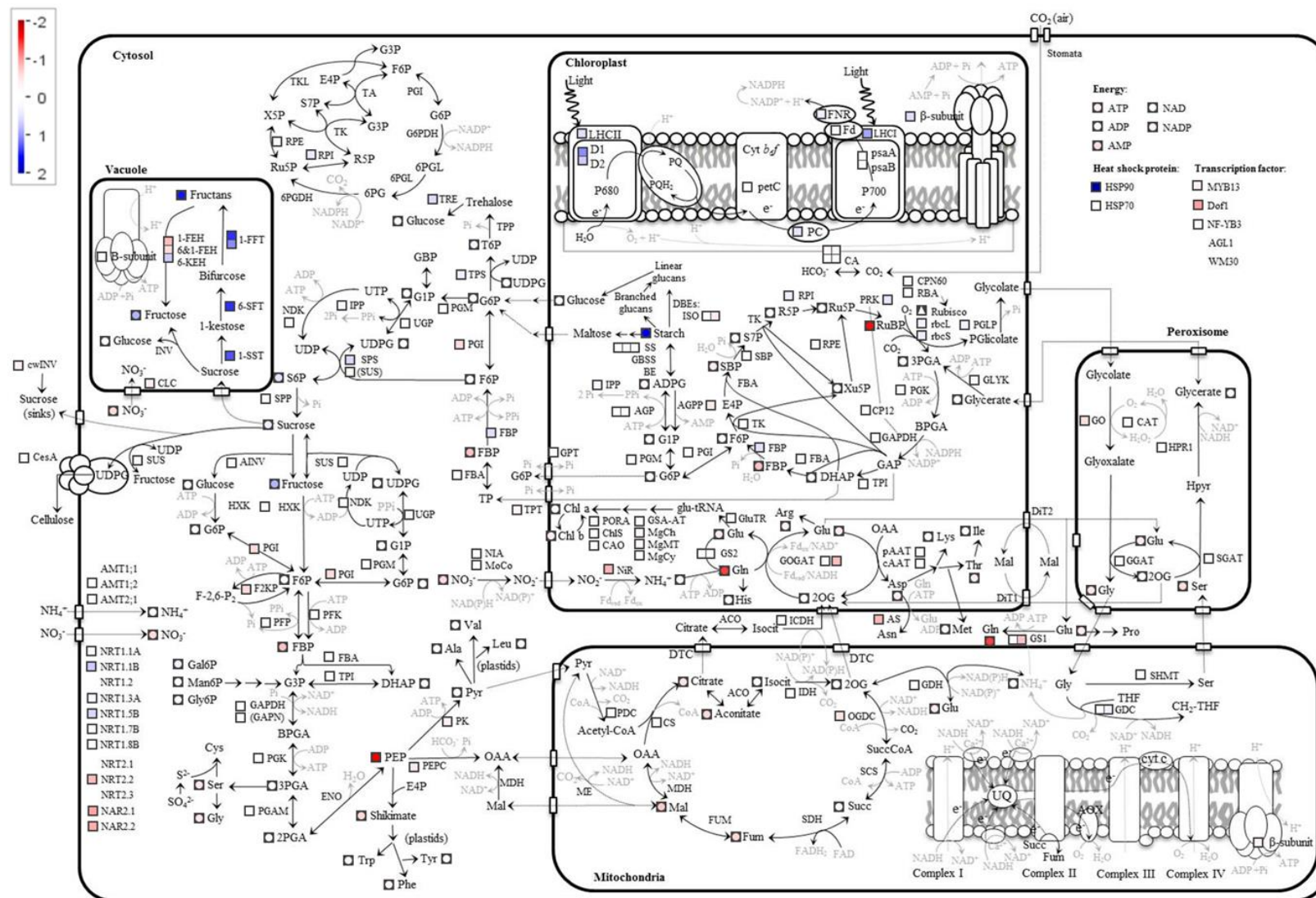


Fig. 5.11c. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N bajo (0,25 mM NO₃⁻) a las 24 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EL con respecto a AL.

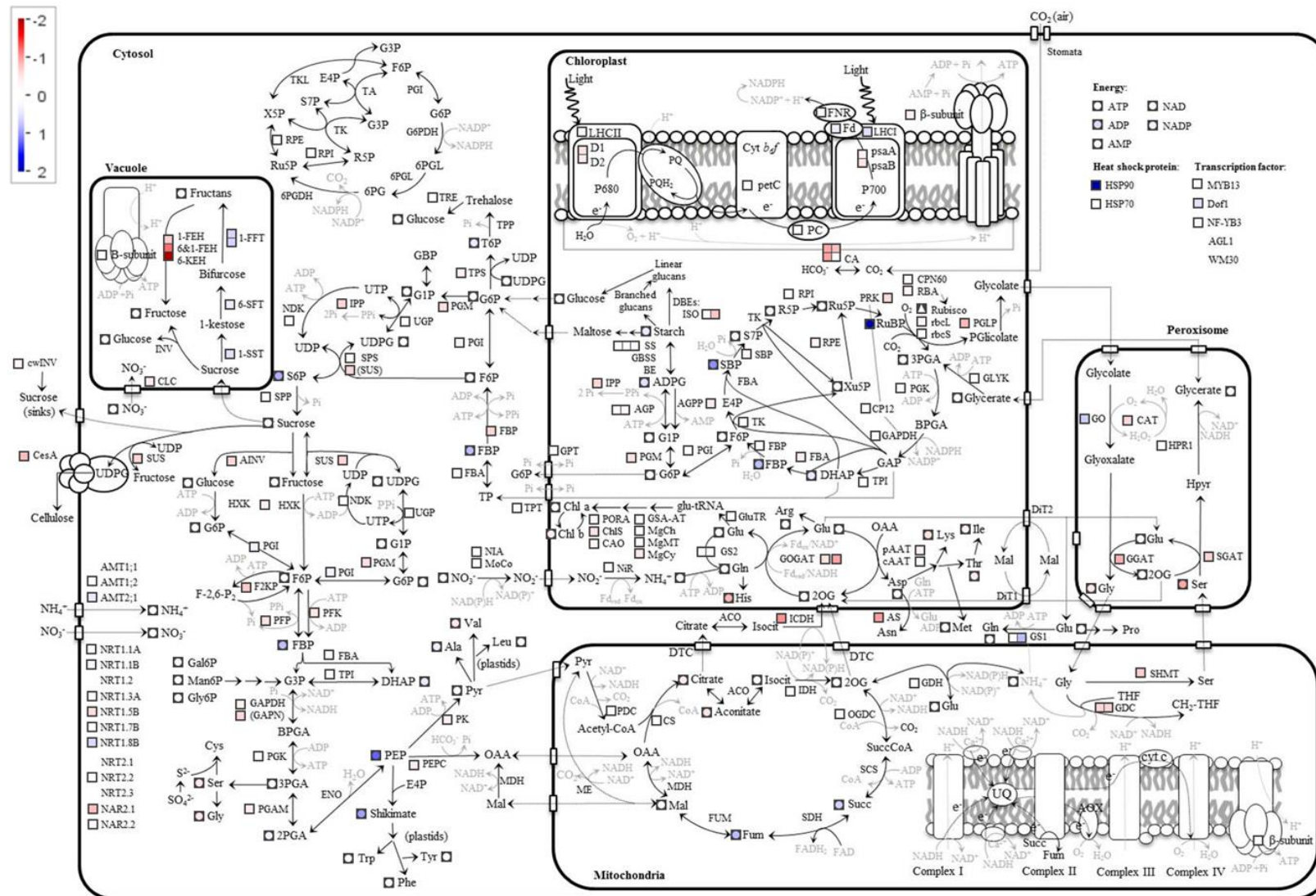


Fig. 5.1.11d. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N alto (2,5 mM NO₃⁻) a las 24 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

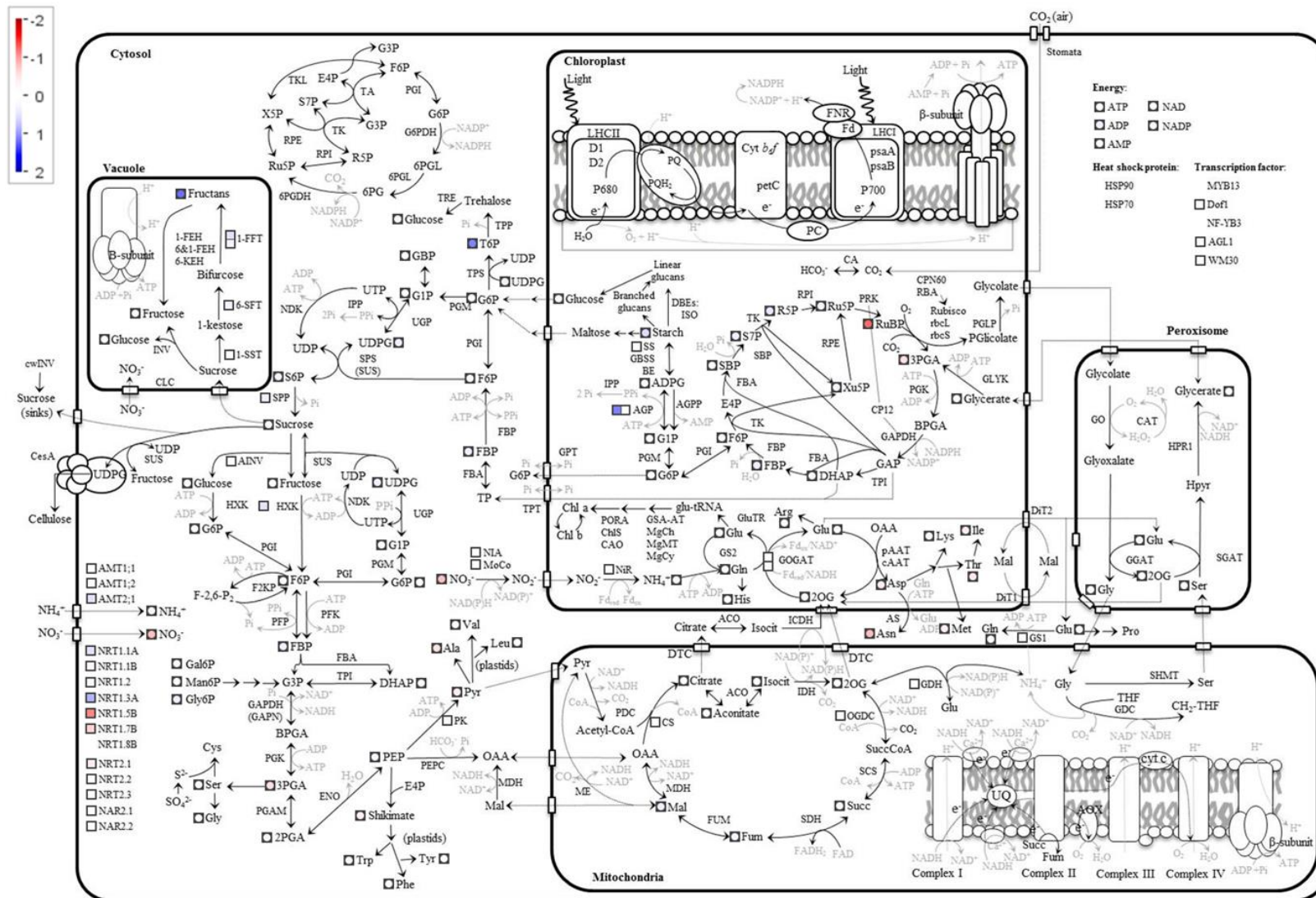


Fig. 5.11e. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO_2 (700 vs $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) para un aporte de N bajo ($0,25 \text{ mM NO}_3^-$) a las 4 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en \log_2 del tratamiento EL con respecto a AL.

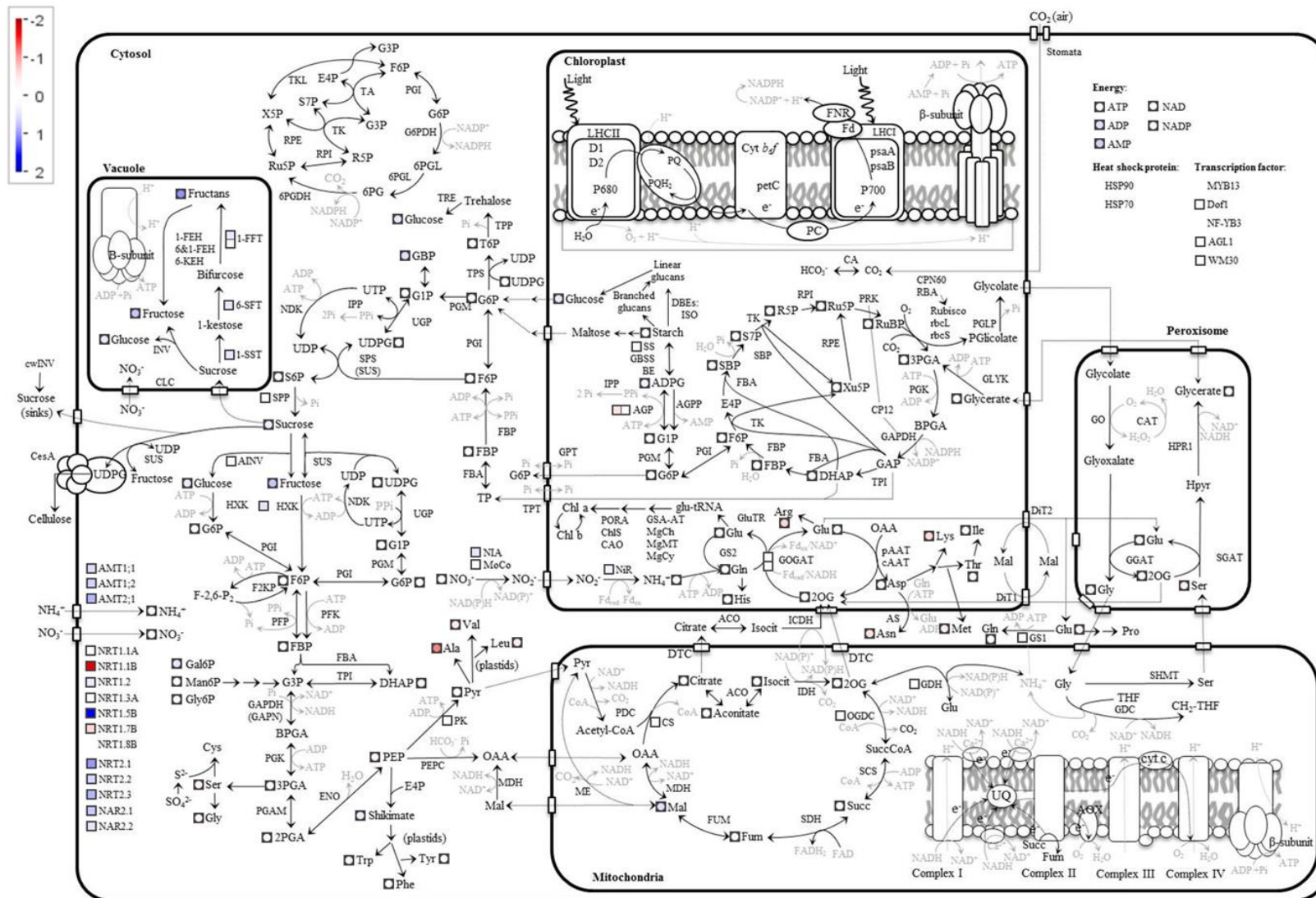


Fig. 5.1.11f. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO_2 (700 vs 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) para un aporte de N alto (2,5 mM NO_3^-) a las 4 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en \log_2 del tratamiento EH con respecto a AH.

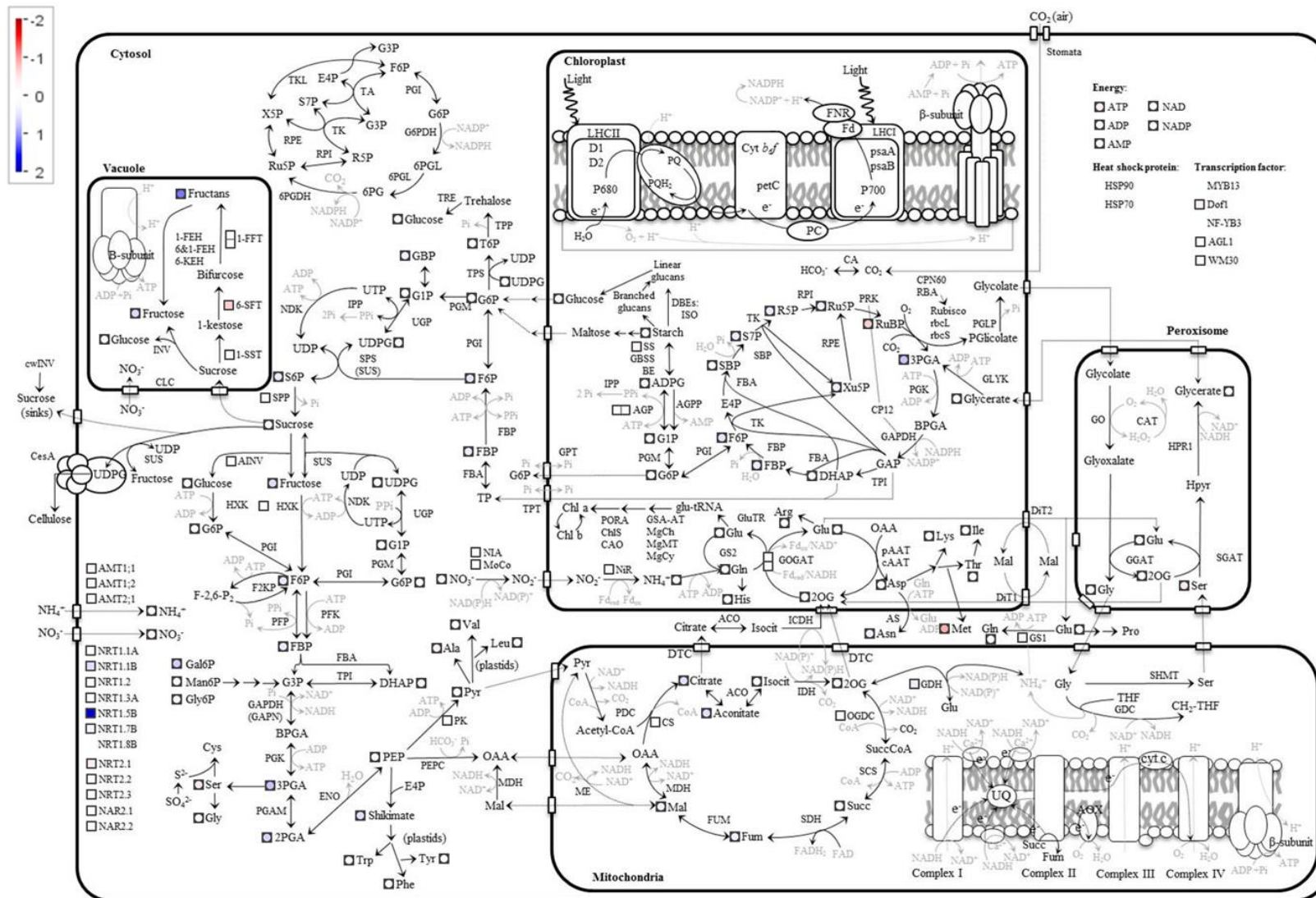


Fig. 5.1.11g. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N bajo (0,25 mM NO₃⁻) a las 24 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EL con respecto a AL.

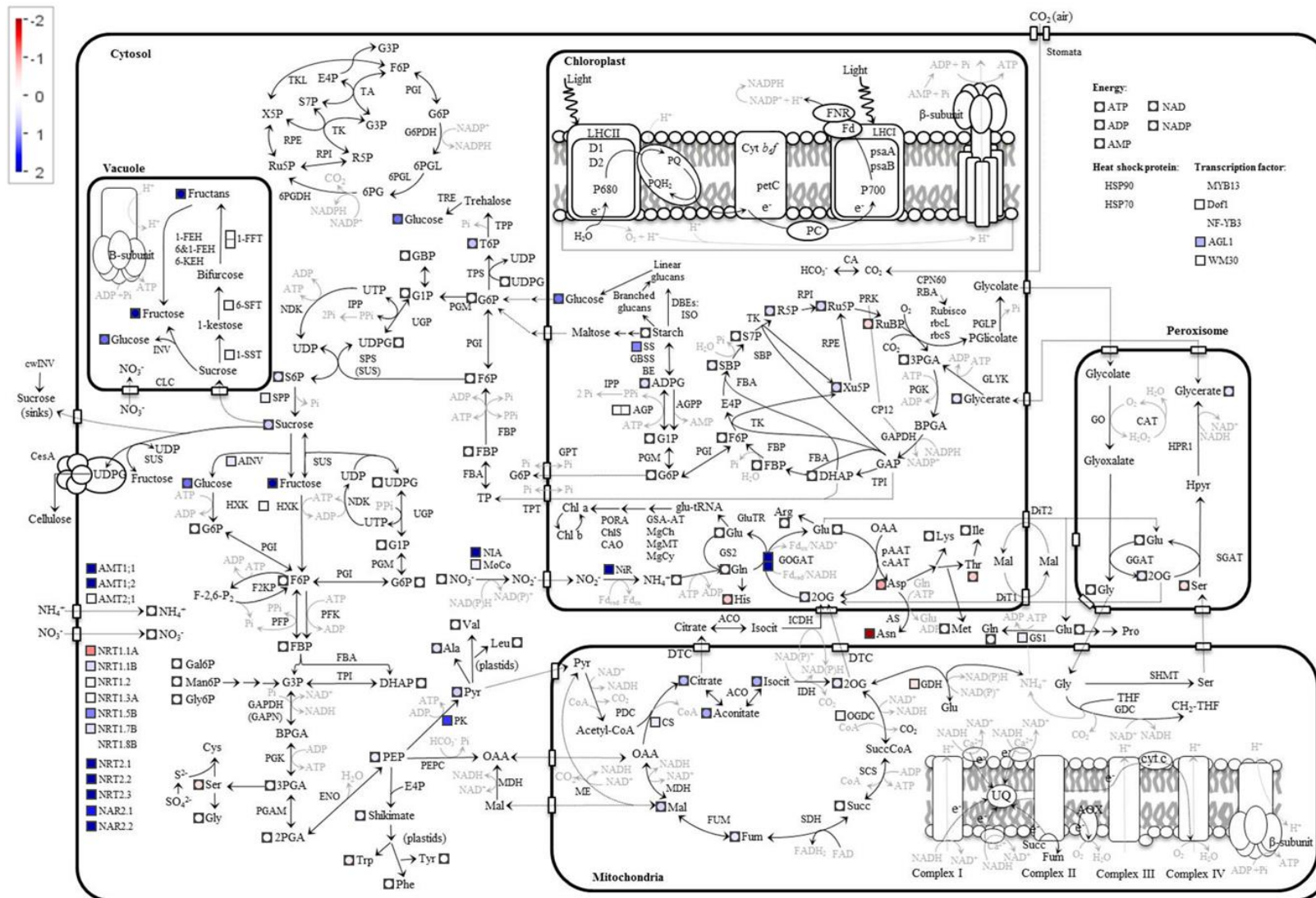


Fig. 5.1.11h. Cambios en el contenido de proteína Rubisco y de los transcritos y metabolitos de las principales rutas del metabolismo del carbono y nitrógeno en la raíz de plantas de trigo duro cultivadas en hidroponía en respuesta al aumento de CO₂ (700 vs 390 μmol·mol⁻¹) para un aporte de N alto (2,5 mM NO₃⁻) a las 24 h de incubación en la antesis. Los datos se muestran en log₂ del tratamiento EH con respecto a AH.

5.1.12. Redes de correlación entre parámetros

Para el estudio de las correlaciones entre los parámetros analizados a las 4 y 24 h de incubación, se consideraron todos los datos fisiológicos, exceptuando aquellos que se midieron únicamente a las 24 h, y bioquímicos junto a los niveles de transcritos obtenidos. A tal fin, se generó una matriz de correlación para la hoja bandera que incluía 218 parámetros y 23.653 correlaciones, y otra para la raíz con 119 parámetros y 7.021 correlaciones (Fig. 5.1.12a).

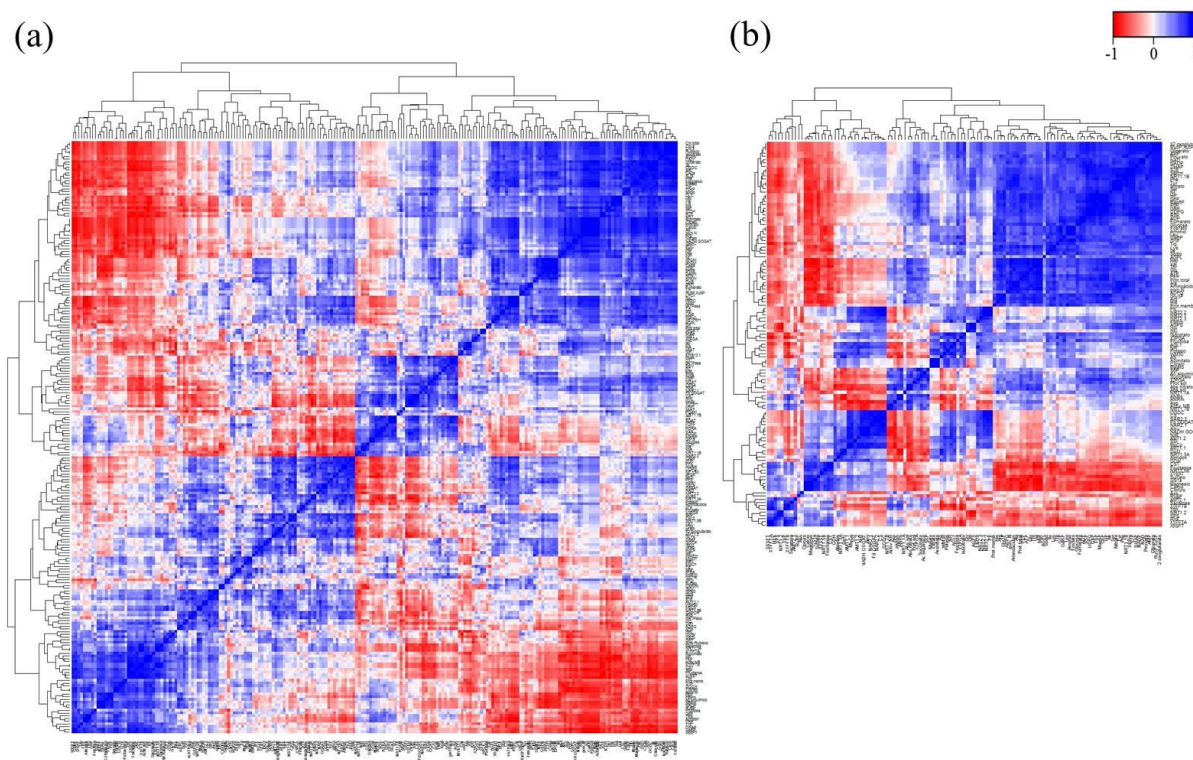


Fig. 5.1.12a. Heat map con clusters de la matriz de correlación de los parámetros analizados en (a) la hoja bandera y en (b) la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta al CO_2 (A, 390; E, $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y al aporte de N (L, 0,25; H, $2,5 \text{ mM NO}_3^-$) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. El coeficiente de Pearson se calculó para cada posible relación, utilizando los valores promedios de cada tratamiento en cada periodo de incubación. Valores próximos a 1 o -1 denotan correlaciones positivas o negativas, respectivamente. La matriz de correlación y el heat map se generó en R, utilizando el interfaz RStudio.

Se seleccionaron aquellas relaciones altamente significativas ($P < 0,01$) con un coeficiente de correlación de Pearson mayor a 0,90 o menor a $-0,90$ para las relaciones positivas (391 en hoja y 232 en raíz) y negativas (205 en hoja y 68 en raíz), respectivamente, a partir de las cuales se generaron las redes de correlaciones. De las correlaciones altamente significativas en la hoja destacaron las relaciones positivas entre el porcentaje de N foliar con ARI, diversos iones, ácidos orgánicos y proteínas solubles; entre los transcritos de los genes de la síntesis de fructanos entre sí; entre el almidón y la TPS y TRE; entre la actividad NR máxima y selectiva con los transcritos de los genes que codifican la CA, TPI plástica y NRT1.3A; entre el ATP y ART y ARI; entre las clorofilas y ARI, Rubisco, proteínas solubles y diversos ácidos orgánicos; entre los ácidos orgánicos entre sí; entre los aminoácidos entre sí; entre el contenido de fructanos y CST con los transcritos los genes que codifican proteínas de la síntesis de fructanos; entre la sacarosa con los genes involucrados en la síntesis de fructanos y el contenido CST; entre diferentes intermediarios fosforilados entre sí; entre el

contenido de proteínas solubles con ARI, Ca^{2+} , Mg^{2+} y los transcritos para la AS, una CA, PDC y PEPC; entre la T6P con los transcritos de los genes relacionados con la síntesis de fructanos, entre otras correlaciones (Fig. 5.1.12b). A su vez, entre las correlaciones negativas destacaron aquellas entre el porcentaje de N foliar con los intermediarios fosforilados; entre ARI y ART con los transcritos de genes que codifican proteínas de la síntesis de fructanos, fructanos y CST; entre el contenido de Rubisco con la expresión para la 6-SFT; entre el contenido de S6P con distintos aminoácidos y ácidos orgánicos, proteínas solubles, ARI y ART; entre fructanos y diversos aminoácidos y otros ácidos orgánicos; entre el ATP y clorofilas con diversos genes e intermediarios del metabolismo de los carbohidratos; entre el contenido de N total de la hoja con el contenido de HP; entre F6P y HPs con varios aminoácidos y ARI y ART; y entre la T6P con varios ácidos orgánicos, ARI, ART y proteínas solubles.

En la raíz, existieron un gran número de correlaciones positivas entre un amplio grupo de metabolitos, principalmente entre los distintos aminoácidos entre sí, entre ácidos orgánicos e intermediarios fosforilados, o entre algunos genes del metabolismo de N. Es importante destacar algunas relaciones negativas, como la del contenido de CST y fructanos con los aminoácidos y el porcentaje de N en la raíz, la del contenido de Asp con varios genes involucrados en el metabolismo del N y la de distintos iones con ácidos orgánicos e intermediarios fosforilados, con la excepción del contenido de NO_3^- que se correlacionó positivamente con una amplia variedad de metabolitos y con el porcentaje de N en la raíz.

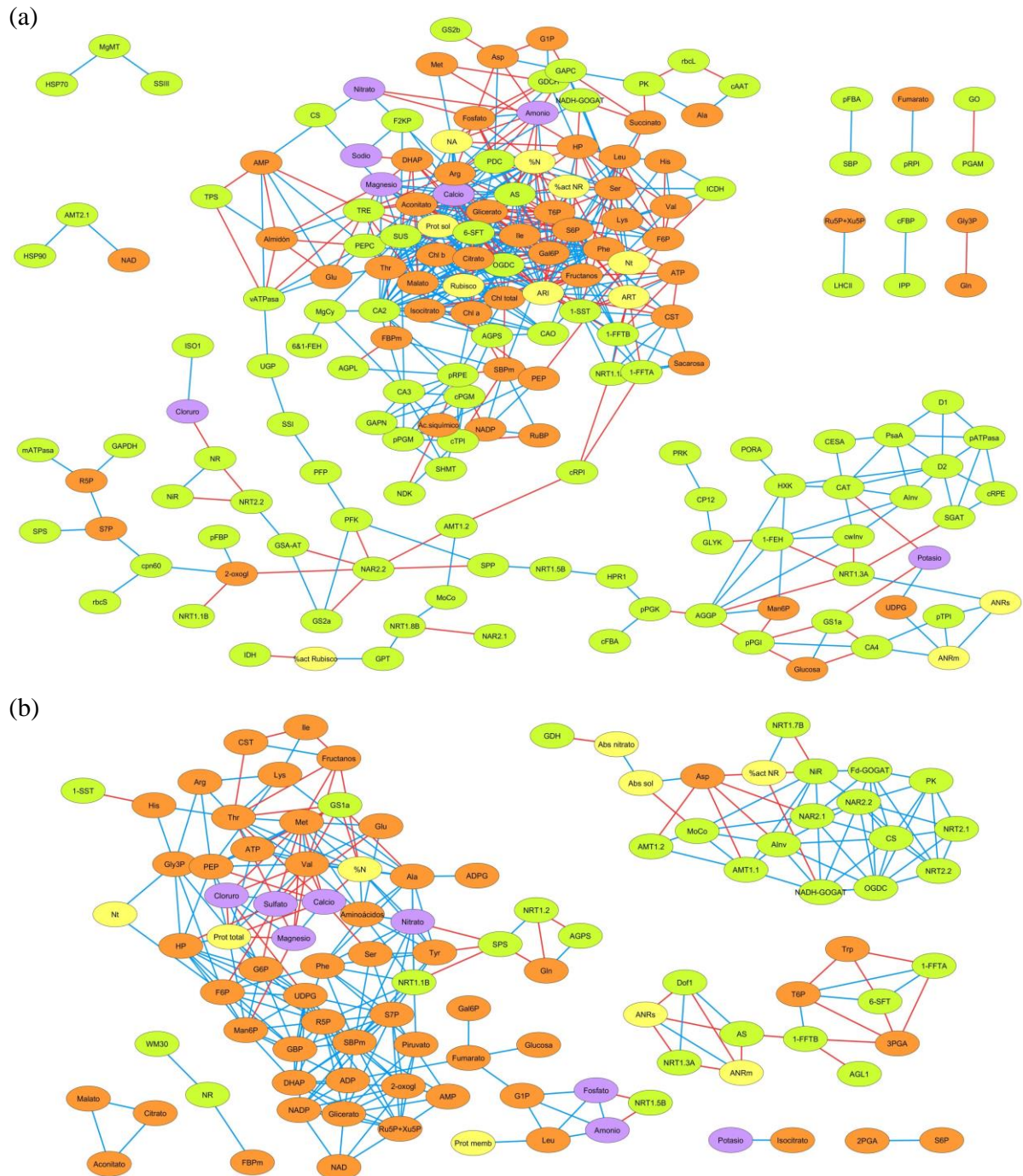


Fig. 5.1.12b. Red de correlaciones significativas entre los parámetros analizados en (a) la hoja bandera y en (b) la raíz de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en respuesta a CO₂ (A, 390; E, 700 μmol·mol⁻¹) y al aporte de N (L, 0,25; H, 2,5 mM NO₃⁻) a las 4 y 24 h de incubación en la antesis. Las correlaciones entre todos los parámetros se calcularon con el coeficiente de correlación de Pearson utilizando R. 596 correlaciones significativas en hoja y 300 en raíz (0 ≤ P < 0,01 y R_s > 0,9 para las interacciones positivas; y 0 > P > 0,01 y R_s < -0,9 para las negativas) fueron importadas en Cytoscape para la visualización de la red. Los transcritos se presentan en color verde, los metabolitos en naranja, los iones en violeta y el resto de parámetros en amarillo. Las correlaciones positivas se indican en azul y las negativas en rojo.

5.2. Dicusión del experimento 2

Ampliación de la plataforma para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro mediante la identificación de genes asociados a la biosíntesis de clorofilas

En el capítulo anterior del presente trabajo de investigación se describen los detalles de la optimización y validación de una plataforma para estudios de expresión génica por qRT-PCR en trigo duro que incorpora un importante grupo de genes del metabolismo del C y N (Tabla 4.1.7.2a, Anexo 3A), entre los cuales, se incluye un único gen asociado a la biosíntesis de clorofilas, en concreto, aquel que codifica la GluTR (Tanaka & Tanaka, 2007). Por ello, en este nuevo experimento se ha pretendido ampliar la plataforma mediante la incorporación de siete nuevos genes que codifican proteínas relacionadas con la ruta general de síntesis de tetrapirroles, la GSA-AT, y, más específicamente, aquellos que participan en la síntesis de clorofilas, tales como la MgCh, la MgMT, la MgCy, la PORA, la ChlS y la CAO (Tabla 5.1.10a). Entre los genes seleccionados solamente se encontró la secuencia del gen que codifica el enzima POR en las bases de datos disponibles para el trigo, y se anotó como posible isoforma A después de realizar un árbol filogenético con las secuencias de otras especies vegetales. Para los seis genes restantes se propusieron ortólogos utilizando la base de datos TaGI y las secuencias bien anotadas en especies vegetales próximas, como la cebada, la avena y *Brachypodium distachyon*. Al igual que para los otros genes identificados e incorporados a la plataforma, se diseñaron primers específicos para estas nuevas secuencias y se validaron experimentalmente en material foliar de trigo duro cv. Regallo. La especificidad de todos ellos se confirmó tanto por las curvas de disociación de la qRT-PCR con un único pico, como por la presencia de un único amplicón del tamaño esperado por electroforesis en geles de agarosa de los productos de la qRT-PCR.

Una disponibilidad óptima de nitrógeno indujo la acumulación de biomasa, el ahijamiento de la planta y redujo la longitud de las raíces del trigo cultivado hidropónicamente

En la antesis, la mayor disponibilidad de N en la solución nutritiva aumentó el peso seco de las diferentes partes separadas de la planta, tanto de la hoja bandera como de la parte aérea y de la raíz, y, por tanto, la biomasa total de la planta. El incremento de materia seca al aumentar la disponibilidad de N fue 3,4 veces mayor que en las plantas deficientes en N (Tabla 5.1.1.1a), lo cual confirma que el N es uno de los principales factores limitantes del crecimiento y desarrollo del trigo (Albrizio *et al.*, 2010). Este aumento de biomasa se mantuvo en un rango similar al observado en otros experimentos con trigo cultivado hidropónicamente con distintas disponibilidades de N (Oscarson, 2000; Carillo *et al.*, 2005) y en macetas con substrato (Li *et al.*, 2003; Kamiji *et al.*, 2014; Zivcak *et al.*, 2014), o con otras especies vegetales (Polley *et al.*, 1999). Se ha propuesto que las diferencias en la biomasa con la disponibilidad de N se acentúan en los cultivos hidropónicos con respecto a los estudios en el campo (Albrizio *et al.*, 2010), debido a que se excluyen las pérdidas de N por lixiviación o por competición con otros organismos (Kamiji *et al.*, 2014). La mayor disponibilidad de N indujo también el ahijamiento de la planta (Tabla 5.1.1.4a) y la elongación del tallo, a la vez que aumentó el contenido de humedad de la planta (Tabla 5.1.1.2a), tanto de la parte aérea como de la raíz, y el peso seco por área foliar (Tabla 5.1.1.3a), y redujo la longitud de la raíz (Tabla 5.1.1.4a), en conformidad con

estudios previos (Oscarson, 2000; Mi *et al.*, 2008). Además, la abundancia de N incrementó la razón parte aérea:raíz en función del peso seco, al igual que en otros estudios con trigo (Li *et al.*, 2003; Kamiji *et al.*, 2014). La distribución de biomasa entre la parte aérea y la raíz es una estrategia fundamental de las plantas para optimizar el crecimiento a fluctuaciones en el ambiente (Hachiya *et al.*, 2014). En nuestro estudio, el aumento de dicha razón sugiere que, aun cuando el peso de ambas fracciones aumentó significativamente con un mayor aporte de N, el aumento del peso seco de la parte aérea de la planta fue mayor que el de la raíz. Estos resultados, en su conjunto, evidencian la implicación del NO_3^- en señales sistémicas que estimulan el desarrollo preferencial del tallo respecto a la raíz, regulando la relación parte aérea:raíz de la planta (Scheible *et al.*, 1997c), y en señales locales que inducen la proliferación de raíces laterales (Zhang & Forde, 1998), generando cambios en la arquitectura de la planta y de la raíz. Los cambios fisiológicos descritos reflejan la influencia del N en el crecimiento y desarrollo de la planta, y la importancia de su manejo para optimizar la producción de los cultivos. Resultados que están en concordancia con los obtenidos en la experimentación anterior.

En plantas con una mayor disponibilidad de nitrógeno, la mayor acumulación de biomasa se relacionó con una mejora de la absorción de nitrógeno, de la capacidad fotosintética y de la eficiencia fotoquímica

En plantas con abundancia de N aumentó, en comparación con las plantas deficientes en N, la absorción de NO_3^- por unidad de masa de raíz y por planta, al igual que la absorción de solución nutritiva, tanto a las 4 h como a las 24 h de incubación en la antesis (Tabla 5.1.2a). El incremento de la absorción de NO_3^- pudo derivarse de una inducción coordinada del metabolismo del N (Jain *et al.*, 2011), bien mediada por el propio NO_3^- o por algún metabolito posterior en la asimilación del N (Hawkesford *et al.*, 2012), si bien existen evidencias de que el NO_3^- induce la expresión de genes involucrados en la absorción de dicho nutriente (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004). Un aumento de la absorción de NO_3^- se ha encontrado en estudios previos con plántulas de trigo crecidas hidropónicamente cuando la disponibilidad de NO_3^- en la solución aumentó de 0,01 a 10 mM (Lekshmy *et al.*, 2009; Lekshmy *et al.*, 2013). Del mismo modo, Li *et al.* (2003) observaron que, en plantas de trigo cultivado en macetas en cámaras de crecimiento, la absorción de N por la raíz aumentó drásticamente con la aplicación de N. Aunque existen evidencias de que el crecimiento prolongado en un medio rico en NO_3^- , superior al utilizado en este estudio, puede llegar a inhibir la absorción de dicho nutriente. Lekshmy *et al.* (2013) mostraron en un estudio con trigo que la mayor parte de la absorción del NO_3^- tuvo lugar en las dos primeras horas de incubación, independientemente de la disponibilidad de N. Sin embargo, el seguimiento de la evolución de la absorción de NO_3^- con el tiempo en nuestro estudio, con anterioridad a las incubaciones, puso de manifiesto que la absorción de NO_3^- se produjo a un ritmo relativamente constante durante las primeras 10-12 h de incubación en las plantas con un aporte deficiente de N, mientras que en aquellas con N abundante tuvo lugar en las primeras 48 h (datos no mostrados), coincidiendo con el momento en el que la $[\text{NO}_3^-]$ en el medio fue prácticamente inapreciable con ambas nutriciones, o lo que es lo mismo, cuando se produjo el agotamiento del NO_3^- en el medio. La mayor absorción de NO_3^- por unidad de masa de raíz en plantas con N abundante condujo, con respecto a las plantas deficientes en N, a una acumulación de NO_3^- en la planta y, con ello, del porcentaje de N relativo al NO_3^- sobre el N total de la planta (Fig. 5.1.3a), lo cual sugiere que las plantas absorbieron más NO_3^- del que pudieron asimilar. En plántulas de trigo se ha observado también un aumento del contenido de NO_3^- en la parte aérea cuando la concentración de NO_3^- en el medio fue aumentando de 0,01 a 0,1 y 1 mM NO_3^- (Lekshmy *et al.*, 2013).

Los aumentos de la absorción y del contenido de NO_3^- en las plantas con una mayor disponibilidad de N condujeron a un incremento de la concentración de N orgánico foliar (Zhang *et al.*, 2013) (Tabla 5.1.3a). Esta mejora del estado nitrogenado de la hoja se acompañó de una estimulación de la fotosíntesis, junto a un aumento de la conductancia estomática, la $[\text{CO}_2]$ intercelular y la velocidad de transpiración en la hoja (Tabla 5.1.4a), de acuerdo con Shangguan *et al.* (2000) y Zhang *et al.* (2013). El contenido de N foliar se asocia con la capacidad fotosintética (Evans, 1989) dado que un mayor contenido de N foliar conlleva un aumento del contenido de compuestos nitrogenados, tales como clorofilas, proteínas totales y solubles, particularmente Rubisco (Tablas 5.1.6.6a y 5.1.6.7a), que favorecerían la fijación fotosintética del CO_2 . Además, la abundancia de N condujo a una mejora de la eficiencia cuántica y fotoquímica máxima del PSII, mientras que la extinción no fotoquímica disminuyó (Tabla 5.1.5a), en concordancia con resultados previos en trigo blando (Shangguan *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2013), lo cual posiblemente pudo deberse a un descenso del contenido de xantofilas por unidad de clorofilas (Kitajima & Hogan, 2003). El descenso de la capacidad fotoquímica en las plantas deficientes en N pudo, al menos en parte, relacionarse con un menor contenido de clorofilas (Tabla 5.1.6a). No obstante, en estudios previos con trigo blando cultivado en macetas con diferentes disponibilidades de N no se observaron cambios en la eficiencia cuántica máxima del PSII (Zivcak *et al.*, 2014). En las plantas deficientes en N, además del descenso del contenido de clorofilas antes indicado, la razón chl a:b aumentó (Tabla 5.1.6a), lo cual sugiere que muy posiblemente tuvo lugar una alteración en la composición de los componentes tilacoidales (Kitajima & Hogan, 2003). El aumento de dicha razón podría ser indicativo de un descenso de los complejos antena cosechadores de la luz con respecto a los centros de reacción del PSII (Gutiérrez *et al.*, 2009a), o bien de un mayor descenso del PSII con respecto al PSI, ya que el segundo tiene una proporción de chl a:b mayor que el primero (Dinç *et al.*, 2012). Además, las plantas con un aporte de N bajo mejoraron la eficiencia en el uso de agua y del N en la fotosíntesis (Tabla 5.1.4c), de acuerdo con resultados previos (Conley *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007a; Novriyanti *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que la mayor disponibilidad de N favoreció la absorción de NO_3^- y la mejora del estado nitrogenado de la planta, lo cual pudo aumentar la asimilación fotosintética del CO_2 y la absorción de la luz, y, por tanto, el crecimiento y la acumulación de biomasa de las plantas.

En plantas deficientes en nitrógeno tuvo lugar una limitación del metabolismo primario y muy posiblemente una inducción del metabolismo secundario

En el presente trabajo, tanto el contenido de metabolitos como las actividades de enzimas reguladores del metabolismo del C y N en la hoja bandera y la raíz de las plantas de trigo variaron con la disponibilidad de NO_3^- en la solución nutritiva. Así, de forma generalizada considerando ambos periodos de incubación conjuntamente, a las 4 y 24 h, la menor disponibilidad de N condujo, en comparación con las plantas con abundancia de N, a un descenso de energía y poder reductor, proteínas totales y actividad NR en la hoja y la raíz, y a una disminución del contenido y actividad Rubisco en la hoja (Tablas 5.1.6a-5.1.6c, 5.1.6.7a, 5.1.6.6a, 5.1.8.1a y 5.1.8.1.2a), junto a la reducción del nivel de clorofilas ya mencionado. Un descenso del contenido de aminoácidos, proteínas solubles y totales y de la actividad NR, junto a un mayor contenido de carbohidratos no estructurales tanto en la hoja como en la raíz, se ha observado previamente en plantas de trigo deficientes en N (Carillo *et al.*, 2005) y en plantas de tabaco (Scheible *et al.*, 1997c). Además, una limitación de N condujo a descensos del contenido de clorofila en *Arabidopsis* (Scheible *et al.*, 2004), arroz (Imai *et al.*, 2005) y

trigo blando (Del Pozo *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2013), del contenido de aminoácidos en la hoja y la raíz de plantas de tabaco (Geiger *et al.*, 1999), del contenido de proteínas solubles en trigo blando (Gutiérrez *et al.*, 2013), del contenido Rubisco en arroz (Imai *et al.*, 2005), de la actividad y proteína Rubisco en trigo blando (Del Pozo *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2013), de la actividad NR foliar (Geiger *et al.*, 1999) y de la actividad NR en la raíz de *Populus spp.* (Luo *et al.*, 2013). Asimismo, la menor disponibilidad de N indujo una acumulación de intermediarios del ciclo de Calvin-Benson (FBP, SBP y RuBP, principalmente) y de la síntesis de carbohidratos (ADP-glucosa, HPs, S6P, T6P), y de carbohidratos no estructurales (almidón, sacarosa, fructanos y CST) en la hoja (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Cambios similares en algunos de los intermediarios previamente mencionados se han observado en plantas de tabaco deficientes en N abonadas tanto con KNO_3 como con NH_4NO_3 y diferente grado de deficiencia nutricional (Scheible *et al.*, 1997a; Scheible *et al.*, 1997c; Geiger *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 1999; Scheible *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2006).

Los niveles de varios intermediarios de la respiración y ácidos orgánicos (2PGA, citrato, aconitato, isocitrato, fumarato y malato) también disminuyeron en plantas deficientes en N, cambios que se acompañaron de un descenso generalizado de casi todos los aminoácidos, principalmente a las 24 h, indicativo de que tuvo lugar una limitación en la síntesis de intermediarios de la glicólisis y de los ácidos orgánicos y posterior síntesis de aminoácidos. Un patrón de cambios similar al descrito en nuestro estudio se ha observado previamente en plantas de *Arabidopsis* crecidas con dos niveles de NO_3^- , entre los que se incluyen una reducción del contenido de ATP y de poder reductor, ácidos orgánicos y aminoácidos, aunque a diferencia de nuestro estudio, el contenido de intermediarios del ciclo de Calvin-Benson y carbohidratos no estructurales tendió a disminuir cuando la disponibilidad de N fue baja (Sato & Yanagisawa, 2014). No obstante, el menor suministro de N aumentó notablemente el contenido de PEP y ácido siquímico. Estos resultados sugieren que en las plantas deficientes en N muy posiblemente disminuyó la actividad PEPC, lo cual pudo favorecer la acumulación de PEP y el descenso de ácidos orgánicos como el malato y el citrato (Scheible *et al.*, 1997a), a la vez que se indujo el metabolismo secundario como sugiere el aumento de los niveles del ácido siquímico, el punto de partida del metabolismo de los fenilpropanoides, en conformidad con estudios previos con plantas de tabaco (Fritz *et al.*, 2006). A nivel radicular, el patrón de cambios de intermediarios del metabolismo del C y N en las plantas deficientes en N fue similar al descrito para las hojas como se anticipó anteriormente. El aumento del contenido de fructanos y T6P fue similar al de las hojas, aunque el aumento de almidón y sacarosa fue menor (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). El incremento de T6P en plantas con N bajo resalta el papel señalizador de este metabolito y su potencial implicación en la regulación de la síntesis de almidón (Hendriks *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2006). Además, la mayor acumulación de fructanos, el principal carbohidrato de reserva en cereales (Pollock & Cairns, 1991; Pérez *et al.*, 2005), que de almidón o sacarosa en las plantas de trigo con una menor disponibilidad de N concuerda con estudios previos que han mostrado una acumulación preferencial de almidón que de sacarosa o hexosas en plantas de tabaco deficientes en N (Fritz *et al.*, 2006), dado que el almidón es el principal carbohidrato de reserva en dicha especie vegetal. En definitiva, estos resultados muestran como la menor absorción de NO_3^- en plantas deficientes en N condujo, en comparación con las plantas crecidas con abundancia de N, a una pérdida de N foliar y compuestos nitrogenados que se acompañó de un descenso del contenido de proteína y/o actividad de la Rubisco y la NR, limitando el metabolismo primario y, por ende, el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El CO₂ elevado indujo una mayor acumulación de biomasa en plantas deficientes en nitrógeno que en aquellas con nitrógeno abundante

El crecimiento a [CO₂] elevadas indujo, en comparación con las plantas crecidas a [CO₂] ambientales, la acumulación de biomasa en las plantas deficientes en N (Tabla 5.1.1.1a), a la vez que aumentó el peso seco por área foliar (Tabla 5.1.1.3a), de acuerdo con el aumento de fotosíntesis cuando las medidas se realizaron a sus respectivas [CO₂] de crecimiento (Tabla 5.1.4a). Sin embargo, en las plantas con N abundante, el CO₂ elevado redujo el peso seco de la hoja bandera (Gutiérrez *et al.*, 2013), aunque no tuvo efecto significativo en la biomasa de las plantas, al igual que ocurrió con el peso seco por área foliar (Tabla 5.1.1.3a). Estos resultados contrastan con el descenso de biomasa observado en las plantas con abundancia de N en el anterior experimento en una etapa similar del desarrollo del trigo. El crecimiento en CO₂ elevado típicamente produce un aumento de la biomasa en plantas de trigo crecidas tanto en el campo como en cultivos hidropónicos (Rogers *et al.*, 1996; Smart *et al.*, 1998; Bloom *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Aranjuelo *et al.*, 2013; Benlloch-Gonzalez *et al.*, 2014), siendo el aumento más intenso cuando la fertilización nitrogenada es amplia (Stitt & Krapp, 1999; Li *et al.*, 2003; Reich *et al.*, 2006). Sin embargo, el incremento de biomasa con el CO₂ elevado puede no tener lugar cuando mejora la disponibilidad de N, e incluso ser inapreciable en gramíneas en comparación con otras especies vegetales (Foyer *et al.*, 2009). Ocasionalmente, el CO₂ elevado puede inducir una mayor estimulación del crecimiento y acumulación de biomasa en condiciones limitantes de N, como se ha observado en nuestro experimento o en otros estudios previos con trigo blando (Wong & Osmond, 1991) y *Calluna vulgaris* (Whitehead *et al.*, 1997), y en variedades de trigo duro con un índice de cosecha alto (Aranjuelo *et al.*, 2013; Erice *et al.*, 2014).

El aumento de materia seca inducido por el CO₂ elevado en las plantas con un aporte de N bajo se asoció con el aumento de biomasa tanto de la parte aérea de la planta como de la raíz. Ambas fracciones de la planta aumentaron en una proporción similar, por lo que la razón parte aérea:raíz no fue modificada (Tabla 5.1.1.1a). Dicha razón tampoco se alteró en otros estudios con tabaco (Matt *et al.*, 2001), arroz (Shimono & Bunce, 2009) y trigo blando (Carlisle *et al.*, 2012) en respuesta al CO₂ elevado. Además, el número de tallos hijos aumentó con el enriquecimiento en CO₂ con ambos niveles de N (Tabla 5.1.1.4a), y pudo deberse al aumento generalizado de carbohidratos (Tablas 5.1.6a-5.1.6c) (Stitt & Krapp, 1999). El hecho de que aumentara el ahijamiento y no la biomasa de las plantas con un aporte de N alto ya se ha observado previamente en arroz (Fukayama *et al.*, 2009). En nuestro estudio, ello pudo deberse a un incremento de exudados por la raíz (Phillips *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2009), como se ha anticipado con anterioridad. Puesto que la disponibilidad de N fue notablemente disminuida en este nuevo experimento, el flujo de exudados pudo disminuir en las plantas con óptima nutrición nitrogenada con respecto a aquellas con una disponibilidad supraóptima de N, en las que pudo apreciarse una pérdida de biomasa en respuesta al CO₂ elevado y, por ello, en este estudio la biomasa de las plantas no sólo no disminuyó sino que incluso tendió a aumentar (Tabla 5.1.1.1a). Dicha hipótesis pudiera también explicar el aumento de biomasa encontrado en las plantas deficientes en N, en las que muy posiblemente la liberación de exudados fue notablemente mermada en comparación con las plantas con una nutrición subóptima en la anterior experimentación, en las que el CO₂ alto no redujo significativamente la biomasa de la planta. El CO₂ elevado disminuyó también la longitud de la raíz con ambos niveles de N (Tabla 5.1.1.4a). Previamente, van Vuuren *et al.* (1997) mostraron que el aumento de CO₂ favorecía el crecimiento radicular en las capas más superficiales del suelo, pero lo disminuía en las capas intermedias y profundas. Esto parece indicar que el aumento de la biomasa de la raíz inducido por el CO₂ elevado en plantas con un aporte de N bajo pudo deberse a la

proliferación y desarrollo de las raíces secundarias en detrimento de la elongación y crecimiento de las primarias, lo que conllevaría un cambio en la arquitectura de la raíz. Aun cuando los cambios producidos por el CO₂ elevado en el sistema radicular pueden alterar su capacidad de absorción, Kamiji *et al.* (2014) sugieren que la absorción de N parece estar controlada por los requerimientos de la parte aérea. En comparación con la primera experimentación realizada, la variabilidad de los resultados de crecimiento pudo, en parte, asociarse a las diferencias en la disponibilidad nutricional y a la frecuencia en la renovación de la solución nutritiva que, junto a otros parámetros, son fuentes de variabilidad inter- e intra-específicas (Stitt & Krapp, 1999).

El crecimiento en CO₂ elevado redujo la capacidad de asimilación de CO₂ y fotoquímica en plantas deficientes en nitrógeno

En este estudio, las medidas de la asimilación fotosintética del CO₂ a una concentración común de CO₂ en la medida, 700 μmol·mol⁻¹, mostraron que la fotosíntesis en la hoja bandera disminuyó con el crecimiento en CO₂ elevado en plantas con N bajo pero no en aquellas con N alto con independencia de la intensidad luminosa utilizada en la medida (Tabla 5.1.4a). Estos resultados muestran que la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado tuvo lugar en plantas deficientes en N. Gutiérrez *et al.* (2013) también observaron una pérdida de capacidad fotosintética en las tres primeras hojas del dosel vegetal de plantas de trigo blando crecidas en CO₂ elevado en el campo con N bajo al inicio del llenado del grano. Otros estudios han mostrado también que la aclimatación fotosintética fue más severa en plantas deficientes en N que en aquellas con amplia disponibilidad de dicho nutriente (Nakano *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Del Pozo *et al.*, 2005; Reich & Hobbie, 2012). Aunque existen evidencias de que la aclimatación al CO₂ elevado puede no tener lugar en plantas con un aporte de N bajo cuando se suministra en proporción directa al crecimiento (Farage *et al.*, 1998). En nuestro estudio, la respuesta de aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado fue mayor en plantas deficientes en N, mientras que la respuesta directa fue similar con ambas nutriciones nitrogenadas (Tabla 5.1.4b). La integración de ambas puso de manifiesto que la respuesta neta de la fotosíntesis al enriquecimiento en CO₂ fue más beneficiosa en plantas con un aporte de N abundante, al igual que en trigo blando en el campo (Del Pozo *et al.*, 2007).

Como norma general, la conductancia estomática de hojas iluminadas en plantas crecidas en CO₂ elevado disminuye (Drake *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2005a; Seneweera *et al.*, 2011). En nuestro cultivo hidropónico, la conductancia estomática descendió en plantas crecidas en CO₂ alto con respecto a aquellas en CO₂ ambiente cuando el aporte de N fue deficiente y no cuando fue abundante (Tabla 5.1.4a). Un meta-análisis con diferentes especies vegetales mostró que el cierre estomático fue más pronunciado en plantas deficientes en N, aunque la respuesta varió según el grupo funcional de plantas (Ainsworth & Rogers, 2007). El mecanismo exacto por el que el CO₂ elevado disminuye la conductancia estomática es desconocido, aunque parece involucrar una compleja red de señalización (Ainsworth & Rogers, 2007). El descenso de la conductancia de los estomas se acompañó de una disminución de la transpiración y la [CO₂] intercelular (Tabla 5.1.4a), lo cual pudo influir en la aclimatación de la fotosíntesis. No obstante, Del Pozo *et al.* (2007) observaron un descenso de los parámetros de intercambio gaseoso en CO₂ elevado con independencia de la disponibilidad de N en trigo blando crecido en el campo.

El CO₂ elevado condujo a una mejora de la eficiencia en el uso del agua y del N en la fotosíntesis en proporción similar para ambos niveles de N (Tabla 5.1.4c). La mejora del estado hídrico en CO₂

elevado se asoció con el cierre estomático y la consecuente reducción de la pérdida de agua por transpiración antes mencionados (Smart *et al.*, 1998; Polley *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003; Ainsworth & Long, 2005; Novriyanti *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2013), que aunque ocurrió con los dos niveles de N, sólo alcanzó significación estadística en las plantas con un aporte de N bajo (Tabla 5.1.4a). Aun a pesar de que el crecimiento en CO₂ elevado puede reducir el contenido de N foliar, como se describe más adelante, el aumento de la fotosíntesis generalmente es mayor, tanto en nuestro estudio como en otros anteriores (Davey *et al.*, 1999; Novriyanti *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013), lo cual sugiere que aumenta la eficiencia en el uso del N en la fotosíntesis. De manera que la fotosíntesis en CO₂ elevado puede aumentar aun cuando disminuyen las proteínas fotosintéticas por un descenso de la fotorrespiración (Stitt & Krapp, 1999).

El CO₂ elevado no alteró la eficiencia cuántica máxima, independientemente del aporte de N (Tabla 5.1.5a), al igual que se ha mostrado en dos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2008). De acuerdo con Zhang *et al.* (2013), el CO₂ elevado redujo la eficiencia operativa del PSII y aumentó la extinción no fotoquímica solamente en plantas con un aporte deficiente en N (Tabla 5.1.5a). Observaciones previas han demostrado que la eficiencia operativa del PSII es un buen parámetro indicador del funcionamiento de la CTEF (Baker, 2008). Por ello, estos resultados sugieren que aumentó la disipación de la energía de excitación en forma de calor, lo cual pudo aliviar la reducción excesiva de la CTEF y evitar el exceso de energía de excitación entre los fotosistemas (Baker, 2008; Zhang *et al.*, 2013), contribuyendo a la protección del aparato fotosintético por un mecanismo no del todo conocido en el que participan las xantofilas (Taiz & Zeiger, 2010). Se ha sugerido que en plantas sometidas a estrés frecuentemente disminuye la conductancia estomática, la fijación fotosintética del CO₂ y el transporte electrónico fotosintético, lo cual puede contribuir a un descenso de la eficiencia del PSII (Baker, 2008). Por lo tanto, el CO₂ elevado redujo la utilización de la energía fotosintética en plantas deficientes en N, limitación que se sumó a la aclimatación de la fotosíntesis antes indicada.

El CO₂ elevado no modificó la absorción de nitrato, pero aumentó su acumulación en plantas deficientes en nitrógeno

En este experimento, el CO₂ elevado no alteró la absorción de NO₃⁻ por unidad de masa de raíz ni en plantas con un aporte de N alto ni bajo, si bien tendió a disminuir la absorción en estas últimas (15%, $P=0,142$; Tabla 5.1.2a). Una toma eficiente de N depende tanto de la disponibilidad de NO₃⁻ en el medio como de su demanda por la planta, condicionada a su vez por la biomasa de la parte aérea (Kamiji *et al.*, 2014). En plantas con N abundante, la biomasa y la absorción de NO₃⁻ no aumentaron con el CO₂ elevado. Mientras que en plantas con N deficiente, la biomasa de la parte aérea y de la planta aumentó con el CO₂ alto pero no la absorción de NO₃⁻, por lo que ambos parámetros no se correlacionaron en dichas condiciones (Tabla 5.1.1.1a). Otros estudios han presentado evidencias de que la absorción y asimilación de NO₃⁻ frecuentemente no se correlacionan con la fotosíntesis y el crecimiento en CO₂ elevado (Smart *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999).

Para evaluar los posibles efectos del CO₂ de crecimiento en la absorción de N es aconsejable realizar un seguimiento a lo largo del crecimiento de las plantas (BassiriRad *et al.*, 1999). En cierto modo debido a que el estadio de desarrollo puede afectar a la absorción de N en CO₂ elevado (Makino *et al.*, 1997a; Geiger *et al.*, 1998) y a que una parte importante de la absorción tiene lugar antes de la antesis (Hirel *et al.*, 2007). Teniendo en consideración el NO₃⁻ absorbido por planta desde el inicio del experimento (Fig. 5.1.2a), pudo observarse que el CO₂ de crecimiento tampoco alteró la absorción de

dicho nutriente, y que la absorción final acumulativa en la antesis fue muy similar entre plantas crecidas en CO₂ elevado o ambiente con cada uno de los niveles de N. Estudios sobre los efectos del CO₂ elevado en la capacidad de absorción de N revelan que no existe una respuesta común (Stitt & Krapp, 1999). Así, el enriquecimiento en CO₂ disminuyó la absorción de N en una comunidad de plantas (Jackson & Reynolds, 1996), arroz (Shimono & Bunce, 2009) y trigo con un aporte abundante de NO₃⁻ (Lekshmy *et al.*, 2013); y la aumentó en *Pinus taeda* (BassiriRad *et al.*, 1996), *Prosopis glandulosa* (BassiriRad *et al.*, 1998), trigo con un aporte bajo de NO₃⁻ (Lekshmy *et al.*, 2009; Lekshmy *et al.*, 2013) y en otras especies vegetales (BassiriRad *et al.*, 2001); mientras que no la alteró en *Nardus agrostis* (BassiriRad *et al.*, 1998), sorgo (BassiriRad *et al.*, 1999) y trigo (Smart *et al.*, 1998). Por lo general, los estudios con cultivos hidropónicos muestran una mayor variabilidad de resultados en la absorción de N a diferencia de aquellos en campo, en los que es más frecuente encontrar un descenso de la absorción de N e incluso más acusado (Taub & Wang, 2008). Según Stitt & Krapp (1999), el efecto del CO₂ elevado sobre la absorción neta de N por la planta (absorción directa menos las pérdidas) se evidencia directamente del contenido de N en la planta antes que de las medidas de absorción. En este estudio, el contenido total de N de la parte aérea y de la planta no disminuyeron con el aumento de CO₂, independientemente del N aplicado (datos no mostrados), respuesta frecuentemente observada con [CO₂] elevadas (Sailo *et al.*, 2013). Asimismo, Bloom *et al.* (2002) y Carlisle *et al.* (2012) tampoco hallaron diferencias en el contenido de N de la parte aérea, la raíz o el grano en plantas de trigo crecidas con un suministro de 0,2 mM NO₃⁻, o Smart *et al.* (1998) en plántulas de trigo con dosis de 0,1 y 1 mM NO₃⁻. Nuestros resultados parecen sugerir que la absorción neta de N durante todo el experimento no se alteró con el CO₂ de crecimiento.

Resulta interesante considerar el contenido de NO₃⁻ en el total de la planta y el porcentaje de N asociado al NO₃⁻ con respecto al N total de la planta, como medidas del N inorgánico presente en la planta. El crecimiento en CO₂ elevado aumentó, con respecto al CO₂ ambiente, tanto el contenido de NO₃⁻ como la razón NO₃⁻-N/N total de la planta cuando las plantas crecieron con un suministro limitante de N, y los redujo cuando las plantas crecieron con N abundante (Fig. 5.1.3a). Estudios previos en CO₂ elevado también mostraron una acumulación de NO₃⁻ y un aumento de la razón NO₃⁻-N/N total en *Nicotiana plumbaginifolia* (Ferrario-Méry *et al.*, 1997) y trigo (Smart *et al.*, 1998; Bloom *et al.*, 2002; Carlisle *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2014). Sailo *et al.* (2013) encontraron un descenso de NO₃⁻ en la hoja de plantas de trigo blando, trigo duro y centeno crecidas en CO₂ elevado, pero el contenido de éste aumentó en el tallo. Rubio-Asensio *et al.* (2015) también observaron un aumento del contenido de NO₃⁻ en la parte aérea y la raíz de plantas de trigo crecidas en CO₂ elevado durante la noche con NO₃⁻ como única fuente de N en la solución nutritiva. Se ha propuesto que la acumulación de NO₃⁻ en CO₂ elevado podría estar influenciada por cambios en el eflujo de NO₃⁻ desde la raíz al medio (Smart *et al.*, 1998; Carlisle *et al.*, 2012). Así, en *Arabidopsis*, se ha caracterizado el transportador NAXT1 que parece estar implicado en este eflujo, aunque su papel fisiológico en la planta aún no ha sido esclarecido (Segonzac *et al.*, 2007). Investigaciones futuras que contemplen la medida del eflujo de NO₃⁻, junto a la exudación de compuestos por la raíz (Phillips *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2009), serían de interés para evaluar su potencial implicación en el balance entre el NO₃⁻ que se absorbe y el NO₃⁻ que se reduce a compuestos nitrogenados.

La pérdida de capacidad fotosintética en plantas deficientes en nitrógeno pudo asociarse con un descenso del contenido de nitrógeno orgánico a causa de una inhibición de la asimilación del nitrato

El CO₂ elevado redujo el contenido de N orgánico por superficie foliar (N asimilado) en plantas deficientes en N pero no en aquellas con abundancia en dicho nutriente (Tabla 5.1.3a), de acuerdo con Markelz *et al.* (2014a), aun a pesar de que la absorción de NO₃⁻ por unidad de masa de raíz y el N de la planta no variaron con el CO₂ de crecimiento. La acumulación de NO₃⁻ y la reducción del contenido de N orgánico foliar inducida por el CO₂ elevado en las plantas con N bajo sugiere que pudo tener lugar una inhibición de la asimilación del NO₃⁻ en compuestos orgánicos nitrogenados. Son varios los estudios que han mostrado una inhibición de la asimilación del NO₃⁻ en plantas C₃, incluido el trigo, que reciben NO₃⁻ como única fuente de N (Bloom *et al.*, 2002; Rachmilevitch *et al.*, 2004; Bloom *et al.*, 2010; Bloom *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2014; Rubio-Asensio *et al.*, 2015). Dicha inhibición parece producirse principalmente en las hojas, ya que la asimilación de NO₃⁻ en la raíz es relativamente insensible a la [CO₂] (Rubio-Asensio *et al.*, 2015). Así, en este trabajo no se observaron cambios inducidos por el CO₂ elevado en la expresión de genes relacionados con la asimilación del N en la raíz de plantas deficientes en N, tanto a las 4 como a las 24 h de incubación (Tabla 5.1.10c), mientras que en la hoja algunos transcritos disminuyeron, como veremos más adelante. Estos resultados sugieren que la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en plantas con un aporte de N bajo pudo relacionarse con una pérdida de N foliar, en conformidad con otros trabajos (Smart *et al.*, 1998; Bloom *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Bloom *et al.*, 2014).

Bloom *et al.* (2002) propusieron que la competencia entre la fijación del CO₂ y la reducción del NO₃⁻ por el poder reductor (NADH y Fd_{red}) generado durante el proceso fotosintético puede contribuir a la inhibición de la asimilación del NO₃⁻. Así, dado que la reducción del NO₃⁻ a NO₂⁻ en el citosol en la reacción catalizada por la NR requiere NADH generado a partir del malato que es transportado desde el cloroplasto, una mayor demanda de poder reductor para mantener la fotosíntesis puede limitar el transporte de malato. Además, puesto que la reducción del NO₂⁻ a NH₄⁺ por la NiR, la incorporación del NH₄⁺ en aminoácidos y el ciclo de Calvin-Benson tienen lugar en el estroma del cloroplasto y requieren Fd que es reducida (Fd_{red}) a través de la CTEF, la inducción del ciclo de Calvin por el CO₂ elevado puede limitar la Fd_{red} disponible para la reducción del NO₂⁻ y la asimilación de NH₄⁺ y, en definitiva, la asimilación del NO₃⁻. En este experimento, el CO₂ elevado aumentó la fotosíntesis en plantas deficientes en N a pesar de la pérdida de capacidad fotosintética observada cuando se midió a una [CO₂] común (Tabla 5.1.4a), a la vez que indujo un descenso del contenido de ATP, ADP, AMP y NADP en la hoja y de ATP en la raíz a las 24 h de incubación (Tablas 5.1.6a-5.1.6c). Estos resultados muestran evidencias de que tuvo lugar una limitación de la disponibilidad de energía y poder reductor en las condiciones descritas, lo cual pudo contribuir al mantenimiento de la fotosíntesis en detrimento de la asimilación del NO₃⁻, en conformidad con Bloom *et al.* (2002).

Otra de las posibles hipótesis propone que la acidificación del estroma por el CO₂ elevado puede dificultar la entrada de NO₂⁻ en el cloroplasto, que requiere que el estroma sea más alcalino que el citosol, para su posterior reducción a NH₄⁺, contribuyendo a la inhibición de la asimilación del NO₃⁻ (Bloom *et al.*, 2002). De manera que las [CO₂] elevadas pueden alterar el gradiente de pH requerido entre citosol y cloroplasto porque el movimiento del CO₂ adicional dentro del cloroplasto acidifica el estroma y porque el aumento de la fijación del CO₂ hidroliza el ATP más rápidamente, por lo que se requiere un intercambio de protones suplementario a través de la membrana tilacoidal para regenerar

el ATP. En nuestro experimento desconocemos la posible contribución de dicho mecanismo a la inhibición de la asimilación del NO_3^- antes indicada, aunque se observaron ciertos cambios que pudieron influir de alguna manera en la acidificación del estroma. Así, el CO_2 elevado modificó significativamente la expresión de algunos genes que codifican CAs plastídicas (Tabla 5.1.10b), enzimas que catalizan la conversión reversible entre CO_2 y HCO_3^- e influyen en el transporte de CO_2 (Ho *et al.*, 2012). Estos cambios pudieron haber alterado la razón $\text{HCO}_3^-:\text{CO}_2$, modificando así el pH del estroma (Price *et al.*, 2011), pero debido al desconocimiento del mecanismo de actuación de estos enzimas no podemos inferir la potencial contribución de dicha alteración al pH del estroma. En cualquier caso, el descenso del contenido de ATP inducido por el CO_2 elevado en la hoja y la raíz de plantas con N bajo a las 24 h de incubación (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c) podría avalar la hipótesis de acidificación del estroma.

La evaluación de la actividad del enzima clave en la regulación de la asimilación del N mostró que el CO_2 elevado no tuvo efecto en la actividad NR en la hoja de plantas deficientes en N, pero redujo la actividad NR máxima de la raíz a las 24 h de incubación, incluso a pesar de que el estado de activación del enzima aumentó drásticamente (Tabla 5.1.8.2a). En cambio, en plantas con un suministro abundante en N, el CO_2 elevado aumentó la actividad NR máxima de la hoja y no disminuyó la actividad NR de la raíz, aunque al igual que en plantas deficientes en N aumentó el estado de activación del enzima. Por tanto, el CO_2 elevado aumentó el estado de activación de la NR en la raíz de plantas con N alto y bajo, lo cual pudo deberse a una mayor acumulación de carbohidratos (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c) de acuerdo con Morcuende *et al.* (1998). A las 24 h de incubación, la abundancia de transcritos del gen que codifica la NR a nivel foliar no varió con el CO_2 elevado ni en plantas con N alto ni bajo, aun cuando la actividad del enzima aumentó en las primeras y no varió en las segundas (Tablas 5.1.6b y 5.1.10b). En la raíz, el CO_2 alto aumentó la expresión génica para la NR en plantas con N alto y no modificó la expresión del enzima en aquellas con N bajo, mientras que la actividad o bien no varió o disminuyó (Tabla 5.1.10c y 5.1.6c). Estos resultados muestran que no hubo una buena correlación entre el patrón de expresión y la actividad de la NR, como se ha mostrado previamente (Scheible *et al.*, 1997b; Morcuende *et al.*, 1998). Aunque el CO_2 elevado no redujo la actividad NR de la hoja de plantas deficientes en N, la reducción de la actividad NR de la raíz pudo contribuir a la inhibición de la asimilación de NO_3^- , ya que la acumulación de NO_3^- tuvo lugar a nivel de planta entera. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto del CO_2 en la actividad NR depende del nivel de N suministrado. Así, estudios previos han mostrado un descenso de la actividad NR en plantas crecidas en CO_2 elevado, tales como trigo (Bloom *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2005; Lekshmy *et al.*, 2013), *Plantago major* (Fonseca *et al.*, 1997), *Nicotiana tabacum* (Geiger *et al.*, 1999), *Nicotiana plumbaginifolia* (Ferrario-Méry *et al.*, 1997) y *Spinacia oleracea* (Kaiser *et al.*, 2000). Aunque algunos otros han mostrado que el CO_2 elevado puede estimular la actividad NR en tabaco (Geiger *et al.*, 1998), pepino (Larios *et al.*, 2001), trigo y centeno (Sailo *et al.*, 2013).

El descenso del contenido de compuestos nitrogenados inducido por el CO_2 elevado en plantas deficientes en nitrógeno se asoció con una represión de genes del metabolismo del nitrógeno

La elevada coordinación del metabolismo del N, desde la absorción del N del suelo hasta su uso en la síntesis de proteínas, se ha observado en estudios transcriptómicos con plantas de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004). En este estudio hemos visto que el CO_2 elevado

redujo el contenido de N orgánico en las plantas con N bajo, a la vez que condujo a un descenso de los niveles de transcritos de algunos genes del metabolismo del N en la hoja bandera (Tablas 5.1.10b), que fueron más acusados a las 24 h que a las 4 h de incubación. Así, el CO₂ elevado disminuyó la expresión de los genes que codifican el transportador de alta afinidad NRT2.2, los componentes NAR2.1 y NAR2.2, la GOGAT dependiente de NADH y la AS, y, en menor medida, la expresión génica para la NiR y la GSr1 ($\log_2 = -0,87$ y $-0,79$, respectivamente). El descenso de los componentes NAR2 pudo contribuir, junto al descenso de transcritos y posible nivel de proteína, a la reducción de la actividad de los transportadores NRT2 por ser necesarios los primeros para la activación de los segundos, como se ha puesto de manifiesto en plantas de *Arabidopsis* (Yong *et al.*, 2010). Además, el CO₂ elevado redujo los niveles de transcritos del factor Dof1 en las hojas de las plantas deficientes en N a las 4 y 24 h de incubación, más acentuadamente a las 24 h, a diferencia del aumento inducido en las plantas con N abundante en dicho periodo de incubación. Este TF está implicado en la regulación de la expresión de genes de la asimilación del N (Kumar *et al.*, 2009) y se ha llegado a proponer que puede desempeñar un papel importante en el fenómeno de aclimatación al crecimiento prolongado en CO₂ elevado (Fukayama *et al.*, 2009). A pesar de la represión de varios genes del metabolismo del N por el CO₂ elevado en las hojas de las plantas deficientes en N a las 24 horas de incubación, la actividad NR y la expresión del gen que codifica dicha proteína no varió con el CO₂ de crecimiento en las hojas de dichas plantas, aunque la actividad NR disminuyó en la raíz como se indicó anteriormente (Tabla 5.1.8.2a). Estos resultados sugieren que la acumulación de NO₃⁻ inducida por el CO₂ alto, o algún metabolito posterior en su asimilación, pudo actuar de señal del estado nitrogenado de la planta y retroinhibir su propia absorción y/o asimilación (Dechorgnat *et al.*, 2011; Hawkesford *et al.*, 2012), en conformidad con la represión de genes del metabolismo del N.

La inhibición del metabolismo del N inducida por el CO₂ elevado en plantas deficientes en N se acompañó, como era previsible, de un descenso del contenido de aminoácidos totales en la hoja y la raíz a las 4 h de incubación (34% y 38%, respectivamente). Destacaron los descensos de algunos de los aminoácidos, en particular, la Gln en la hoja y la Asn en la raíz (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c), aunque algunos otros no variaron e incluso aumentaron. Estos resultados contrastan con la disminución de la mayoría de los aminoácidos inducida por el CO₂ elevado en dos variedades de trigo duro cultivadas en macetas, pero que recibieron nutrición Hoagland completa (Aranjuelo *et al.*, 2013). Un descenso del contenido total de aminoácidos se ha encontrado también en hojas maduras de cebada crecidas en CO₂ elevado con amplia disponibilidad de N (Sicher & Bunce, 2008). A las 24 h de incubación, el CO₂ elevado redujo notablemente el contenido total de aminoácidos en la hoja (42%; Tablas 5.1.6a). Particularmente, descendieron los niveles de dos de los aminoácidos mayoritarios, el Glu y la Gln, los precursores de la mayoría de aminoácidos (Lam *et al.*, 1995), junto a la Ser y Gly (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). El descenso de éstos últimos aminoácidos sugiere que la reducción de la fotorrespiración en plantas crecidas en una atmósfera enriquecida en CO₂ se acompañó de un descenso del contenido foliar de aminoácidos formados en la ruta fotorrespiratoria, de acuerdo con estudios previos (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1999; Matt *et al.*, 2001). Además, el CO₂ elevado redujo el contenido de ácido siquímico en las plantas deficientes en N, precursor de los aminoácidos Trp, Phe y Tyr (Lancien *et al.*, 2006), a la vez que disminuyó los niveles de Phe pero no los de los otros aminoácidos aromáticos Trp y Tyr (Fig. 5.1.11c). Maeda & Dudareva (2012) indicaron que la mayor parte del flujo de C de la ruta del ácido siquímico se destina a la biosíntesis de Phe, razón por la cual muy posiblemente los niveles de ambos compuestos mostraron una mejor correlación. Geiger *et al.* (1999) encontraron también un descenso de los niveles de aminoácidos en hojas maduras de plantas de tabaco crecidas en CO₂ alto cuando el suministro de N fue limitado. Es importante resaltar que el CO₂ elevado afectó al contenido de Gln únicamente en las plantas con N bajo y no en aquellas con N alto.

Este aminoácido constituye la principal forma de transporte del N asimilado entre la raíz y la parte aérea, por lo que se considera como una señal del estado nitrogenado entre ambas partes de la planta, capaz de regular la absorción de N (Dechorgnat *et al.*, 2011). El crecimiento en CO₂ elevado no sólo redujo el contenido foliar de aminoácidos en las plantas con N bajo, sino también el contenido de proteínas totales y de membrana (22% y 40%, respectivamente; Tabla 5.1.6.6a), de proteína Rubisco (26%; Tabla 5.1.6.7a) y tendió a disminuir el contenido de clorofilas totales (Tabla 5.1.6a), en relación con el descenso del contenido foliar de N orgánico (Imai *et al.*, 2005). A nivel radicular, también se observó un descenso del contenido de proteína soluble en la raíz (11%; Tabla 5.1.6.6a).

En plantas con N abundante, el CO₂ elevado indujo un notable aumento de la expresión de los genes que codifican los transportadores de NO₃⁻ de baja y alta afinidad y de NH₄⁺ en la hoja y la raíz (Tablas 5.1.10b y 5.1.10c). Destaca el fuerte aumento de la abundancia de transcritos para los transportadores de las familias NRT2 y NAR2, junto a aquellos genes que codifican proteínas involucradas en la reducción del NO₃⁻ y la asimilación del NH₄⁺ en aminoácidos, tales como la NR, NiR, GS1 y NADH-GOGAT, a las 24 h de incubación en la raíz. En *Arabidopsis*, los transportadores NRT2 y los componentes NAR2 participan en la absorción de alta afinidad del NO₃⁻ externo. A pesar de que la expresión de estos transportadores aumentó con el CO₂ alto, la absorción de NO₃⁻ por unidad de masa de raíz no varió en las plantas con N abundante como se indicó previamente. También aumentaron los transcritos del gen que codifica la AGL1, un TF que, dada su homología con SOC1 de *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2006), podría actuar como activador de la floración. En ambos periodos de incubación, la expresión de los genes que codifican la GS1 en la hoja y la raíz aumentó con el CO₂ elevado (Tablas 5.1.10b y 5.1.10c). La GS1, presente en el citosol, es abundante en el floema de ambos órganos y está involucrada en la asimilación del NH₄⁺ generado tanto por la reducción del NO₃⁻ como su posterior reciclado (Sailo *et al.*, 2013). La inducción de la expresión de dicho gen en las plantas con N alto, unido al hecho de que no se modificó la expresión de los genes que codifican la GS2, podría ser indicativo de una mejora de la asimilación del N (Galili *et al.*, 2008), o bien de una mayor movilización del N hacia los sumideros (Sailo *et al.*, 2013) con respecto a las plantas deficientes en N. A las 24 h de incubación, como ya se anticipó, el CO₂ elevado aumentó la actividad NR máxima de la hoja en plantas con N abundante (Tabla 5.1.8.2a), aunque los transcritos para la NR no variaron con el CO₂ de crecimiento, al igual que el contenido total de aminoácidos. No obstante, el contenido de los aminoácidos que participan en la fotorrespiración, Ser y Gly, también disminuyó con el crecimiento en CO₂ alto en las plantas con N abundante (Tabla 5.1.6a), de acuerdo con la atenuación de la fotorrespiración (Long *et al.*, 2004). Un descenso del contenido de ambos aminoácidos se ha observado en plantas de tabaco crecidas en CO₂ elevado con abundancia de N en forma de KNO₃ y NH₄NO₃ (Geiger *et al.*, 1999). En plantas de *Arabidopsis* con una disponibilidad amplia de N, el CO₂ elevado incrementó el contenido total de aminoácidos, en particular, Glu, Gln, Asp, Ala, aunque otros disminuyeron (Watanabe *et al.*, 2014), al igual que en plantas de tabaco cultivadas con 20 mM KNO₃ (Geiger *et al.*, 1999). Sin embargo, Markelz *et al.* (2014a) mostraron que el CO₂ elevado no alteró el contenido de aminoácidos en plantas de *Arabidopsis* fertilizadas con abundancia o deficiencia de N suministrado como NH₄NO₃ (Markelz *et al.*, 2014a). En este estudio, los niveles de His disminuyeron con el aumento de CO₂ en plantas con N alto (Tablas 5.1.6a-5.1.6c), tanto en las hojas a las 4 h como en las hojas y en las raíces a las 24 h de incubación, mientras que en las hojas de plantas con N bajo aumentaron a las 4 h. La biosíntesis de His es un proceso bastante costoso energéticamente, por lo que resulta sorprendente que su contenido aumentara en plantas con N bajo, aunque podría ser indicativo de un flujo metabólico hacia el metabolismo secundario ya anticipado anteriormente (Li *et al.*, 2008). Cabe indicar que los niveles de transcritos del gen que codifica la AS, por lo general, disminuyeron con el CO₂ elevado con ambas disponibilidades de N tanto en la raíz como en la hoja (Tablas 5.1.10b y

5.1.10c), en conformidad con estudios previos con plantas de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006). Este enzima cataliza la síntesis de Asn a partir de Asp (Kumar *et al.*, 2009), que actúa como precursor de moléculas orgánicas nitrogenadas y como molécula de transporte de N durante la noche (Galili *et al.*, 2008). Además, la Asn constituye una importante forma de almacenaje de N, por lo que la modulación de la expresión del gen que codifica la proteína involucrada en su síntesis pudiera sugerir que desempeña un papel importante en la regulación del flujo del N en función de la demanda de la planta. Así, la represión inducida por el CO₂ alto en las plantas con N bajo y alto podría asociarse con el mantenimiento del metabolismo del N en las primeras y con la estimulación de la exportación para facilitar el flujo del N a los sumideros, en este caso la espiga, en las segundas, en detrimento del posible almacenaje de N cuando el crecimiento no está estimulado en condiciones ambientales de CO₂. Por último, en las plantas con N abundante, el CO₂ elevado disminuyó, con respecto a aquellas en CO₂ ambiente, el contenido de NO₃⁻ de la planta, mientras que la razón NO₃⁻-N/N total, el contenido foliar de N orgánico y de proteínas totales, además de la Rubisco, no variaron (Tablas 5.1.3a y 5.1.6.6a). Estos efectos del CO₂ elevado en las plantas con N abundante sugieren que tuvo lugar una estimulación coordinada del metabolismo del N acorde con el mantenimiento de la fotosíntesis, en contraposición a la inhibición inducida en las plantas con N bajo.

La aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en plantas deficientes en nitrógeno se relacionó con un descenso de Rubisco y una limitación en la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato

El crecimiento en CO₂ elevado redujo el contenido de proteínas solubles y de Rubisco (Tablas 5.1.6.6a y 5.1.6.7a) en plantas deficientes en N a las 24 h de incubación, y disminuyó la fracción de Rubisco en la proteína soluble (Tabla 5.1.6.7a), indicativo de que tuvo lugar un descenso selectivo de proteína Rubisco (Long *et al.*, 2004) relativo al total de proteínas solubles foliares. Aranjuelo *et al.* (2013) encontraron que la Rubisco fue la única proteína del ciclo de Calvin-Benson que descendió en plantas de trigo duro crecidas en CO₂ elevado. En un estudio de la respuesta proteómica del arroz al CO₂ elevado, Bokhari *et al.* (2007) observaron que la mayoría de isoformas de la Rubisco disminuyeron. A las 24 h de incubación, el CO₂ elevado tendió también a disminuir, aunque sin llegar a alcanzar significación estadística, la actividad inicial y total de la Rubisco un 18-19%, respectivamente (Tabla 5.1.8.1a), en plantas con N bajo, mientras que no tuvo efecto en la actividad del enzima en las plantas con abundancia de N. El hecho de que el CO₂ elevado aumentase el estado de activación de la Rubisco pudo atenuar el efecto del CO₂ en la actividad Rubisco inicial (Aranjuelo *et al.*, 2011b) en plantas con N bajo. Los cambios en la actividad Rubisco no se correlacionaron con la expresión de los genes que codifican dicha proteína (Tabla 5.1.10b). Así, el CO₂ alto aumentó la expresión del gen que codifica la subunidad grande de la Rubisco en plantas deficientes en N y la disminuyó en aquellas con abundancia de N, mientras que la expresión del gen que codifica la subunidad pequeña tendió a aumentar con N bajo y no varió con N alto. Estos resultados muestran evidencias de que la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en plantas deficientes en N se asoció con una disminución de la Rubisco, que a menudo se ha relacionado con un descenso de transcritos de los genes que codifican la proteína (Nie *et al.*, 1995a; Moore *et al.*, 1999; Foyer *et al.*, 2009) mediada por la acumulación de carbohidratos foliares, pero en nuestro estudio parece relacionarse más bien con una pérdida de N foliar, en conformidad con investigaciones previas (Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011a).

Se ha sugerido que un descenso del contenido de Rubisco o de su actividad en plantas crecidas en CO₂ elevado puede acompañarse, para mantener el equilibrio, de un aumento de la regeneración de RuBP (Theobald *et al.*, 1998; Zhang & Chen, 2009; Aranjuelo *et al.*, 2011a; Aranjuelo *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro experimento, el CO₂ elevado condujo a un importante descenso del contenido de intermediarios metabólicos de la regeneración de la RuBP en la hoja de plantas con N bajo a las 24 h (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Principalmente, se redujo el contenido de FBP y RuBP en un 42% y 66%, respectivamente, a diferencia del aumento del contenido de RuBP en un 335% en plantas con N alto, además de DHAP, FBP y SBP. Algunos estudios han puesto de manifiesto la implicación de la regeneración de la RuBP en la aclimatación fotosintética, ya sea por un descenso de P_i, de la actividad de los enzimas de este proceso o de la capacidad de transporte electrónico (Zhang *et al.*, 2008). Cen & Sage (2005) observaron que un descenso del contenido de RuBP en CO₂ elevado implicó una limitación de la fotosíntesis por la regeneración de RuBP en *Ipomoea batatas*. Asimismo, la fotosíntesis fue colimitada en CO₂ elevado por la Rubisco y la regeneración de RuBP en *Picea abies* (Urban *et al.*, 2003) y arroz (Chen *et al.*, 2005a; Zhu *et al.*, 2012), aunque en trigo se sugirió que la limitación por Rubisco era la predominante (Zhu *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2008) propusieron que la limitación de la fotosíntesis por la regeneración de la RuBP en plantas de arroz fue más importante que la limitación por Rubisco, y observaron un descenso de RuBP con el CO₂ elevado similar al de Vu *et al.* (1997). En plantas de *Polygonum cuspidatum*, el CO₂ elevado limitó la fotosíntesis por la Rubisco y la regeneración de la RuBP dependiendo de la estación del año (Onoda *et al.*, 2005). Además, Bokhari *et al.* (2007) mostraron un descenso del contenido de proteínas involucradas en la regeneración de la RuBP en el ciclo de Calvin-Benson en plantas de arroz crecidas en CO₂ elevado. Es posible que la disparidad de resultados obtenidos sobre la regeneración de la RuBP en trabajos previos se deban a los diferentes sistemas experimentales utilizados (Chen *et al.*, 2005a). El descenso de FBP inducido por el CO₂ elevado en las plantas con un aporte de N bajo podría también indicar una cierta competencia de los sustratos, bien para la regeneración de la RuBP o la síntesis de almidón (Willingham *et al.*, 1994). Estos resultados muestran evidencias de que la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en plantas deficientes en N pudo deberse a un descenso de proteína Rubisco y a una limitación en la regeneración de la RuBP.

En general, el CO₂ elevado conduce a una represión de genes relacionados con la fotosíntesis o con funciones cloroplásticas (Nie *et al.*, 1995b; Stitt & Krapp, 1999; Li *et al.*, 2006; Fukayama *et al.*, 2009; Fukayama *et al.*, 2011; Kaplan *et al.*, 2012). En este estudio, el patrón de cambios en la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis en respuesta al CO₂ elevado varió dependiendo del tiempo de incubación. Así, en las hojas de plantas deficientes en N, el CO₂ elevado redujo la expresión de genes que codifican proteínas fotosintéticas a las 4 h, tales como el LHCI, la D1, la Fd, la RBA, la cpn60, y las isoformas plastídicas de FBA y TK (Tabla 5.1.10b, Fig. 5.1.11a). Disminuyó también la abundancia de transcritos para la ATPasa cloroplástica y mitocondrial y el factor NF-YB3, al igual que para la mayoría de genes relacionados con la biosíntesis de clorofilas, aunque no alcanzaron significación estadística. El descenso de NF-YB3 pudo haber contribuido a la represión de los genes fotosintéticos (Stephenson *et al.*, 2011). A las 24 h de incubación, en plantas con un aporte de N bajo, el CO₂ elevado condujo a un aumento de los niveles de transcritos para algunas proteínas fotosintéticas, como LHCI, D1, D2 y rbcL (Tabla 5.1.10b, Fig. 5.1.11c). Kaplan *et al.* (2012) observaron que el patrón de expresión en respuesta al CO₂ elevado de ciertos genes del PSI y PSII y de la Rubisco en *Arabidopsis* varió de un muestreo a otro. En nuestro estudio, los cambios descritos en la expresión a las 4 y las 24 horas de incubación parecen reflejar más bien que el metabolismo fotosintético se encuentra sujeto a grandes cambios diarios (Geiger & Servaites, 1994; Bläsing *et al.*, 2005), al igual que el metabolismo del N (Scheible *et al.*, 1997b; Geiger *et al.*, 1998; Matt *et al.*,

2001). Así, Harmer *et al.* (2000) encontraron que el 6% de los genes de un array de Affymetrix en *Arabidopsis* se encontraban sujetos a una regulación circadiana. No obstante, la posible limitación de la regeneración de la RuBP antes indicada pudo tener lugar aun a pesar de que se produjera un aumento del contenido de ciertas proteínas de la CTEF, de acuerdo con Chen *et al.* (2005a). La mayor abundancia de transcritos para los genes fotosintéticos a las 24 h de incubación no mostró paralelismo con los descensos de fotosíntesis, energía, poder reductor, intermediarios del ciclo de Calvin-Benson y contenido de Rubisco y clorofilas (Tablas 5.1.4a, 5.1.6a y 5.1.6.7a). Existen evidencias de que a menudo el nivel de expresión génica no se relaciona con el nivel de proteína o actividad del enzima y/o los productos de reacción (Scheible *et al.*, 1997b; Geiger *et al.*, 1998; Matt *et al.*, 2001). El hecho de que el CO₂ elevado no redujera la expresión del gen que codifica la RBA, como se ha observado en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006), pudo asociarse, al menos en parte, con el aumento del estado de activación de la Rubisco en las plantas con N bajo y compensar la menor actividad del enzima.

En plantas con N alto a las 4 h de incubación, el CO₂ elevado no alteró el patrón de expresión de ninguno de los genes fotosintéticos estudiados (Fig. 5.1.11b). A las 24 h, el CO₂ elevado disminuyó los niveles de transcritos de genes que codifican proteínas fotosintéticas de la CTEF (D1, D2, FNR y la ATPasa cloroplástica), la biosíntesis de clorofilas (MgCy), el ciclo de Calvin-Benson (*rbcL*, PGK plastídica y SBPasa) y, especialmente, la fotorrespiración (Tabla 5.1.10b, Fig. 5.1.11d). Nie *et al.* (1995a) también observaron una represión de genes fotosintéticos en trigo blando crecido en sistemas FACE con amplia disponibilidad de N. Al igual que en plantas deficientes en N, el patrón de expresión de la mayoría de los genes no se correlacionó con la fotosíntesis, los intermediarios del ciclo de Calvin-Benson y los contenidos de Rubisco y clorofilas (Tablas 5.1.4a, 5.1.6a y 5.1.6.7a). Aunque puede existir una conexión simple entre los cambios de transcritos y los de proteínas, e incluso con los niveles de metabolitos y actividades enzimáticas, con frecuencia pueden no correlacionarse (Ferne & Stitt, 2012). Así, Fukayama *et al.* (2009) mostró que el CO₂ elevado condujo a cambios significativos en el perfil transcriptómico de arroz, pero no en el proteoma. Estas discrepancias pueden deberse a factores como la regulación transcripcional, las modificaciones post-traduccionales, el balance entre síntesis y degradación proteica, y la regulación metabólica, entre otras. La inducción de la HSP90 por el CO₂ elevado en las hojas de las plantas con ambas disponibilidades de N a las 24 h (Tabla 5.1.10b), podría indicar una respuesta activa de la planta al ambiente (Li *et al.*, 2008).

En plantas C₃, el CO₂ elevado conduce generalmente a una inhibición de la fotorrespiración debido a la competencia entre el CO₂ y el O₂ por el centro activo de la Rubisco (Long *et al.*, 2006). En nuestro estudio, el crecimiento en CO₂ elevado redujo la expresión de la mayoría de los genes involucrados en la fotorrespiración en las hojas de plantas con abundancia de N a las 24 h (Tabla 5.1.10b), como se ha mostrado anteriormente en soja (Ainsworth *et al.*, 2006) y *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, en las plantas deficientes en N únicamente disminuyó la expresión del gen que codifica la GO, aunque los niveles de Ser y Gly disminuyeron no sólo en plantas con N bajo sino también en aquellas con alto N, como ya se indicó anteriormente, si bien el contenido de glicerato no varió (Tabla 5.1.6a y 5.1.6c). El flujo fotorrespiratorio parece ser controlado mayoritariamente por la oxigenación de la RuBP catalizada por la Rubisco, ya que se piensa que el resto de enzimas de la ruta fotorrespiratoria se encuentran en exceso (Douce & Neuburger, 1999; Foyer *et al.*, 2009). Estos resultados muestran evidencias de que el enriquecimiento en CO₂ condujo a una inhibición de la fotorrespiración con ambas disponibilidades de N. Además, en plantas de *Arabidopsis* y trigo crecidas en CO₂ elevado se ha mostrado que la inhibición de la fotorrespiración provoca un descenso de la asimilación de NO₃⁻ (Rachmilevitch *et al.*, 2004; Bloom, 2015), bien porque reduce el reciclado de N a través del ciclo fotorrespiratorio del N (Foyer *et al.*, 2009), o bien porque afecta indirectamente a la fotoasimilación

del NO_3^- (Bloom, 2015). Por lo tanto, la limitación de la fotorrespiración pudo afectar a la asimilación del NO_3^- con ambas disponibilidades de N.

El CO_2 elevado indujo una mayor acumulación de carbohidratos en las hojas de plantas deficientes en nitrógeno. El aumento del contenido de fructanos en CO_2 elevado se correlacionó con la inducción de la expresión de las fructosiltransferasas

El enriquecimiento en CO_2 condujo a una acumulación de carbohidratos en la hoja bandera de las plantas de trigo con ambas disponibilidades de N (Stitt & Krapp, 1999). A las 24 h de incubación, el efecto del CO_2 elevado en el contenido foliar de carbohidratos en las plantas deficientes en N fue más acentuado que en aquellas con N abundante, ya que aumentó el contenido de fructosa, sacarosa, fructanos, CST y, en mayor medida, almidón en plantas con N bajo (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c), y sólo el de almidón en plantas con N alto. El mayor aumento de carbohidratos, particularmente de reserva (almidón y fructanos), en CO_2 elevado en las hojas de plantas con un aporte de N bajo pudo derivarse de una restricción en la capacidad de sumidero de las plantas (Seneweera, 2011; Aranjuelo *et al.*, 2013), condicionada a su vez por la limitación en la asimilación del N. El desequilibrio entre el metabolismo del C y N en las plantas crecidas en CO_2 elevado con deficiencia de N se puso de manifiesto con el aumento de carbohidratos no estructurales y el descenso de aminoácidos en las hojas, tanto a las 4 como a las 24 horas de incubación. Mientras que en las plantas crecidas en CO_2 elevado con N abundante no se observó una acumulación de azúcares solubles a las 24 h, muy posiblemente como consecuencia de una mayor coordinación entre ambos metabolismos en las primeras horas de luz (24 h de incubación, 2 h después del comienzo de fotoperiodo) para mantener la exportación de fotoasimilados. Sin embargo, con la progresión del fotoperiodo (4 h de incubación, 6 h de luz) el flujo del N requerido para la mayor provisión de C fotosintético pudo ser insuficiente para mantener una velocidad de exportación similar, lo cual conllevaría una perturbación en la interacción del metabolismo del C y N (Li *et al.*, 2008). En conformidad con nuestros resultados, el CO_2 elevado indujo una mayor acumulación de carbohidratos foliares, principalmente almidón, en plantas de tabaco con N bajo que en aquellas con N alto tanto cuando recibieron KNO_3 como NH_4NO_3 (Geiger *et al.*, 1999).

El CO_2 elevado condujo a un descenso de los niveles de transcritos para la subunidad pequeña de la AGPasa en plantas con un aporte de N bajo a las 24 h de incubación y no modificó la expresión de la subunidad grande del enzima, aun cuando los niveles de almidón aumentaron fuertemente con respecto a las plantas crecidas en CO_2 ambiente (Tablas 5.1.6a, 5.1.6c y 5.1.9b). Si bien los niveles de transcritos para la isoforma III de la SS aumentaron ligeramente. Estos resultados contrastan con el aumento de la expresión del gen que codifica la subunidad grande de la AGPasa, la subunidad reguladora, inducido por el CO_2 alto en plantas de tabaco deficientes en N, en correlación con la mayor acumulación de almidón (Geiger *et al.*, 1999). Estudios con trigo duro también han mostrado que el aumento de almidón en CO_2 elevado se relacionó con una mayor expresión de los genes de su síntesis (Fukayama *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2012) y del contenido de proteínas de la ruta (Aranjuelo *et al.*, 2013). Aunque otros autores señalan que a menudo no existe un cambio coordinado entre los niveles de transcritos y proteínas del metabolismo del almidón, y que las regulaciones post-transcripcionales (Grennan, 2006) y post-traduccionales (Orzechowski, 2008) juegan un papel crucial. Sin embargo, el aumento de sacarosa en las hojas de plantas deficientes en N crecidas en CO_2 elevado a las 24 h se correlacionó con un incremento de los niveles de transcritos de la SPS (Li *et al.*, 2006) y

la FBPassa citosólica, y del intermediario metabólico S6P (Tablas 5.1.6a, 5.1.6c y 5.1.9b). Ambos enzimas son claves en la regulación de la síntesis de sacarosa, como se ha observado en trigo y otras especies vegetales (Trevanion *et al.*, 2004; Zhang & Chen, 2009; Sharma *et al.*, 2010). En plantas con N abundante, el CO₂ elevado reprimió el gen que codifica la FBPassa citosólica y el contenido de sacarosa no varió. Lunn *et al.* (2006) mostraron evidencias de que los niveles del metabolito T6P se relacionan con los de sacarosa, al igual que Yadav *et al.* (2014). En nuestro estudio, el CO₂ elevado condujo a un aumento del contenido de T6P y de sacarosa a las 4 y 24 h de incubación en plantas deficientes en N, y de T6P en plantas con N alto a las 24 h (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). Dada la escasa relación existente entre los transcritos y el contenido de almidón en las plantas crecidas en CO₂ alto con deficiencia de N, un mecanismo plausible mediado por la T6P podría explicar este hecho en respuesta a la luz y la acumulación de azúcares (Hendriks *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2006). El cual contempla que la T6P podría actuar de señal que facilitase el desvío de parte del exceso de sacarosa hacia la síntesis de almidón e inducir, a su vez, la activación redox post-traducciona de la AGPassa con la consiguiente estimulación de la biosíntesis de almidón (Hendriks *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2006). Además, Tsai & Gazzarrini (2014) propusieron que el aumento de sacarosa y T6P se relaciona con cambios metabólicos que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, como sugiere el aumento de biomasa encontrado en las plantas crecidas en CO₂ elevado y N bajo (Tabla 5.1.1.1a).

A las 24 h de incubación, el CO₂ elevado indujo la expresión de los genes que codifican las FTs (Fukayama *et al.*, 2011) en plantas deficientes en N y, en mucha menor extensión, en aquellas con N abundante (Tablas 5.1.6a y 5.1.6c). A su vez, el CO₂ elevado condujo a una represión de la mayoría de los genes que codifican las FEHs, que fue más acentuada en las plantas con N alto que con N bajo. Estos resultados sugieren que la acumulación de fructanos inducida por el CO₂ elevado en plantas deficientes en N se asoció con una estimulación de su síntesis y una represión de su degradación. Algo similar ocurrió en las plantas con N abundante, aunque en éstas el CO₂ elevado parece que facilitó más la inhibición de la degradación de los fructanos que su síntesis, en correlación con el contenido de fructanos y los transcritos para las FTs y las FEHs. El factor MYB13, que está involucrado en la activación de las FTs (Xue *et al.*, 2011), no mostró una estrecha relación con la expresión de las FTs en este experimento. No obstante, los cambios en la expresión de las FTs según la disponibilidad de N muy posiblemente pudieron asociarse con el contenido de NO₃⁻ en la parte aérea (Figura 5.1.3a), de acuerdo con Morcuende *et al.* (2004). Trabajos previos han sugerido que la represión de genes fotosintéticos por la acumulación de carbohidratos foliares puede ser más acusada en plantas con un suministro deficiente en N (Geiger *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999; Ainsworth & Long, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2013), y parece estar mediada por la fosforilación de hexosas en el citosol por la HXK (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1999). En nuestro experimento, sólo fue posible establecer una relación directa entre la acumulación de carbohidratos y la represión de genes fotosintéticos a las 4 h en plantas con un aporte deficiente de N. Además, el contenido de HPs no aumentó en ningún caso y el nivel de transcritos de la HXK sólo se modificó a las 24 h en plantas con N abundante. De este modo, no parece posible establecer una relación entre la expresión de los genes fotosintéticos y la acumulación de los carbohidratos foliares inducida por el CO₂ elevado, por lo que otros mecanismos pudieran estar implicados, como el estado nitrogenado foliar de acuerdo con nuestros estudios previos con trigo blando (Pérez *et al.*, 2005).

El descenso de intermediarios de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, junto a la represión de genes de estas rutas, inducido por el CO₂ elevado en plantas deficientes en nitrógeno se asoció con una inhibición de la respiración

La respuesta al CO₂ elevado de la respiración de las plantas se ha estudiado en un amplio número de especies vegetales y se han obtenido efectos positivos y negativos (Drake *et al.*, 1999; Wang & Curtis, 2002; Davey *et al.*, 2004; González-Meler *et al.*, 2004; Leakey *et al.*, 2009a; Leakey *et al.*, 2009b; Fukayama *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Markelz *et al.*, 2014a; Markelz *et al.*, 2014b; Rubio-Asensio *et al.*, 2015). Todos estos estudios demuestran que el efecto del CO₂ elevado en la respiración depende de la especie vegetal, el estadio de desarrollo, el sistema experimental utilizado y la fuente y disponibilidad de N, por lo que no existe consenso sobre el mecanismo de respuesta exacto (Rubio-Asensio *et al.*, 2015). La respiración neta en condiciones de CO₂ elevado es el resultado del balance entre dos mecanismos opuestos: la acumulación de carbohidratos por la estimulación de la fotosíntesis, que aumenta los sustratos para la respiración, y el descenso del N foliar, que implica una menor demanda de los productos de la respiración (Leakey *et al.*, 2009a). Como hemos descrito previamente, el CO₂ elevado aumentó en mayor medida los niveles de carbohidratos en las hojas de plantas deficientes en N que en las abundantes en dicho nutriente, en particular, a las 24 h de incubación. A su vez, indujo un descenso de intermediarios metabólicos de la glicólisis y el ciclo TCA (Tabla 5.1.6a y 5.1.6c), más acusado también a las 24 h, al igual que para los aminoácidos en las plantas con N bajo. Así, descendieron significativamente los niveles de PEP (68%), ácido siquímico, citrato, aconitato y malato. En plantas con N abundante, el aumento de CO₂ incrementó notablemente los niveles de PEP (139%), ácido siquímico y succinato en la hoja a las 24 h, momento en el que el contenido total de aminoácidos no disminuyó con el CO₂ elevado. En un estudio con dos variedades de trigo duro, el CO₂ elevado redujo el contenido de ácidos orgánicos, en concreto, el citrato, el malato y el 2-oxoglutarato (Aranjuelo *et al.*, 2013). En plantas de *Arabidopsis* crecidas en CO₂ elevado en el campo se ha observado un descenso del contenido de ácidos orgánicos en dos de los tres genotipos estudiados (Li *et al.*, 2006). En esta especie vegetal, Kaplan *et al.* (2012) mostraron también un descenso generalizado de los metabolitos relacionados con la respiración, tanto en condiciones de CO₂ elevado como de CO₂ superelevado. Por el contrario, en otro estudio con *Arabidopsis*, el aumento de la [CO₂] produjo aumentos de algunos ácidos orgánicos y descensos de otros, aunque el contenido total de éstos aumentó al final del periodo diurno (Watanabe *et al.*, 2014).

Sin embargo, la expresión de los genes relacionados con la respiración en ningún caso fue inducida por el CO₂ elevado, del mismo modo que en estudios previos con soja (Ainsworth *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009b), *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2008; Markelz *et al.*, 2014a; Markelz *et al.*, 2014b), arroz (Fukayama *et al.*, 2011) y tomate (Li *et al.*, 2013). En este experimento, el CO₂ elevado redujo los niveles de transcritos de los genes que codifican la PGI citosólica, PEPC, PK, CS mitocondrial y la subunidad E1 del OGDC, y, en menor medida, la ATPasa mitocondrial en las hojas de plantas deficientes en N a las 24 h (Tabla 5.1.10b). Además, redujo la expresión de un gran número de genes que codifican enzimas de la glicólisis y del ciclo TCA en plantas con N abundante a las 24 h. En plantas de *Arabidopsis* crecidas en CO₂ elevado, la abundancia de transcritos para proteínas relacionadas con la glicólisis y el ciclo TCA disminuyeron a la mitad del periodo luminoso, aunque aumentaron al final del día (Watanabe *et al.*, 2014). En cambio, Markelz *et al.* (2014a) mostraron que el CO₂ elevado condujo a un aumento de la expresión de la mayoría de los genes respiratorios en plantas de *Arabidopsis* tanto con deficiencia como abundancia de N, cuando la fuente de N utilizada fue el NH₄NO₃. Nuestros resultados sugieren que muy posiblemente el crecimiento en CO₂ elevado

condujo a una inhibición de la respiración en plantas deficientes en N en asociación con el descenso de transcritos y metabolitos involucrados en dicho proceso, lo cual pudo limitar la disponibilidad de energía para la asimilación del NO_3^- en las hojas. Aunque no se descarta cualquier otra hipótesis plausible para explicar los cambios en el patrón de expresión de genes involucrados en la respiración junto al perfil metabólico en respuesta al CO_2 elevado según la disponibilidad de N de la planta. En apoyo a esta posible hipótesis, se han presentado evidencias de que el CO_2 elevado inhibió la actividad de ciertos enzimas de la respiración mitocondrial (Drake *et al.*, 1999; González-Meler & Siedow, 1999; González-Meler *et al.*, 2004). No obstante, la velocidad de respiración puede ser estimulada en algunas plantas C_3 (Leakey *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2013), y disminuida en otras como el trigo (Rubio-Asensio *et al.*, 2015) y *Arabidopsis* (Kaplan *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2014). Rubio-Asensio *et al.* (2015) demostraron que la respuesta al CO_2 elevado de la respiración depende de la fuente de N inorgánico disponible para la planta y disminuye cuando el NO_3^- se utiliza como única fuente de N. A su vez, nuestros resultados evidencian que la disponibilidad de éste nutriente puede modificar la respiración, al ser la reducción más acusada cuando el NO_3^- es limitante. Los estudios recientes que han indicado una estimulación de la respiración en CO_2 elevado utilizaron condiciones de cultivo muy diferentes a las nuestras. Así, se observó dicha estimulación únicamente en hojas maduras (Markelz *et al.*, 2014b) y, de manera significativa, en plantas de *Arabidopsis* con un amplio aporte de N con ambas formas de N proporcionadas conjuntamente, NO_3^- y NH_4^+ (Markelz *et al.*, 2014a), o en plantas fijadoras de N_2 atmosférico por simbiosis con bacterias como la soja (Ainsworth *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009b). Se requieren investigaciones más profundas sobre la respuesta al CO_2 elevado de la respiración de las plantas para poder establecer mecanismos de respuesta en función de la especie vegetal, el estadio de desarrollo, la fuente de N y la disponibilidad de dicho nutriente.

El CO_2 elevado indujo una mayor acumulación de carbohidratos, ácidos orgánicos y transcritos de genes del metabolismo del nitrógeno en la raíz de plantas con nitrógeno abundante que en las deficientes en dicho nutriente

A las 24 horas de incubación, el CO_2 elevado condujo a un aumento del contenido de carbohidratos solubles en la raíz tanto en las plantas con N alto como con bajo, que fue mayor en aquellas con una amplia disponibilidad de N, como muestra el contenido de CST, fructosa, glucosa, sacarosa y fructanos (Tablas 5.1.6b y 5.1.6c). En estas plantas, la mayor acumulación de carbohidratos inducida por el CO_2 alto se acompañó de un ligero aumento de la expresión de genes involucrados en su síntesis, y de un aumento significativo de la expresión del gen que codifica la SSI, aun cuando el contenido de almidón no varió significativamente (Tabla 5.1.10c). El aumento de sacarosa en la raíz pudo deberse a un aumento de su propia síntesis en este tejido o a una mayor provisión de C desde la parte aérea, dado que se trata del principal carbohidrato de transporte a los órganos no fotosintéticos (Sheen *et al.*, 1999; Lunn, 2003). El contenido de fructanos aumentó notablemente en la raíz, aunque los niveles de transcritos de los genes que codifican los enzimas de su síntesis apenas variaron con el CO_2 elevado, y a pesar de la alta correlación observada entre ambos parámetros (Figs. 5.1.11b y 6.1.4b). Estos resultados sugieren que muy posiblemente la sacarosa pudo inducir la actividad de las FTs, puesto que no es sólo el substrato para la síntesis de fructanos e inductor de la expresión génica, sino también un efector para la inducción de la actividad de las FTs (Pollock & Cairns, 1991). Recientemente, se ha propuesto un modelo para el transporte de los fructanos vacuolares al apoplasto mediado por vesículas, las cuales se sabe que permiten el transporte a larga distancia (Valluru *et al.*, 2008). Aunque no parece probable que los fructanos sean exportados a otras partes de la planta,

desconocemos las implicaciones que pudiera tener este posible transporte en la comunicación entre la parte aérea y la raíz. El CO₂ elevado también aumentó los niveles de ciertos intermediarios del anabolismo de carbohidratos en la raíz de plantas con N abundante, como la ADP-glucosa, la S6P y la T6P (Tablas 5.1.6.b y 5.1.6c). De igual modo, un enriquecimiento en CO₂ condujo a un aumento de los niveles de transcritos del gen que codifica la PK y, en menor medida, los de la HXK, la CS mitocondrial y la subunidad E1 del OGDC, y de los intermediarios de la glicólisis y el ciclo TCA, como el PEP, piruvato, citrato, aconitato, isocitrato, fumarato y malato en las plantas con N abundante (Tablas 5.1.6.b, 5.1.6c y 5.1.9c). Además, el CO₂ elevado aumentó los niveles de los intermediarios de la síntesis de carbohidratos y los ácidos orgánicos en la raíz de plantas deficientes en N, pero en menor medida que en las plantas con N abundante.

La mayor acumulación de carbohidratos inducida por el CO₂ elevado en la raíz de plantas con N abundante con respecto a aquellas con N deficiente podría implicar un incremento de la respiración, lo que permitiría la provisión de energía, poder reductor e intermediarios metabólicos en la raíz y, por consiguiente, favorecería la absorción y/o la asimilación del NO₃⁻. El aumento de los transcritos y metabolitos de las rutas respiratorias, del ATP, ADP y NAD, y la fuerte inducción de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo del N en la raíz apoyarían dicha hipótesis (Fig. 5.1.11h). Ainsworth *et al.* (2006) observaron que el CO₂ elevado estimulaba el catabolismo de carbohidratos en rutas respiratorias para la producción de energía en hojas de soja. Li *et al.* (2013) sugirieron que una mayor disponibilidad de carbohidratos y energía en plantas de tomate crecidas en CO₂ elevado condujo a una mayor respiración nocturna. Además, se sabe que los azúcares transportados a las raíces podrían tener un efecto positivo en la absorción de NO₃⁻ y NH₄⁺ (Lejay *et al.*, 1999; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Hawkesford *et al.*, 2012), siendo capaces de inducir la expresión de los transportadores y de otros genes de la asimilación de N (NR y NiR, entre otros) por un mecanismo independiente al de las HXKs (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Por ejemplo, la expresión de los transportadores NRT2 puede ser inducida por NO₃⁻ y azúcares, y reprimida por NH₄⁺, Gln o productos posteriores en la asimilación del NO₃⁻ (Krapp *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007b; Dechorgnat *et al.*, 2011; Kiba *et al.*, 2011). Así, el hecho de que los niveles de Gln no variasen con el CO₂ elevado e incluso tendieran a disminuir en las plantas con N abundante parece indicar que el aumento de transcritos de estos transportadores pudo deberse a la inducción mediada por los carbohidratos acumulados en la raíz. Resulta sorprendente que, aun cuando el CO₂ elevado indujo la expresión de la NR, la NiR y la GOGAT tanto la dependiente de NADH como de Fd en plantas con N alto, la actividad NR no aumentase significativamente, aunque sí lo hizo el estado de activación del enzima (Tabla 5.1.8.2a), como consecuencia de la acumulación de carbohidratos (Morcuende *et al.*, 2004). Mientras que los niveles de aminoácidos no sólo no aumentaron, sino que en su gran mayoría disminuyeron y las proteínas no variaron (Tablas 5.1.6b, 5.1.6c y 5.1.6.6a). Geiger *et al.* (1999) observaron que el crecimiento en CO₂ elevado condujo a un descenso del total de aminoácidos y de Glu, Gln y Asp en la raíz de plantas de tabaco fertilizadas con KNO₃, proporcionalmente mayor con altas que con bajas concentraciones de dicho nutriente, que se acompañó de un descenso de proteínas. Sería plausible hipotetizar, dado que el patrón de cambios en los niveles de metabolitos del C y N en la raíz de plantas con N bajo y alto fue bastante similar, aunque más acusado en aquellas con N alto, que muy posiblemente los aminoácidos fueron los compuestos que mayoritariamente se perdieron por exudación de la raíz. De esta manera, la raíz de las plantas con N abundante podría ser más sensible a cualquier variación en el pool de carbohidratos en comparación con las deficientes, ya de por sí ricas en C y muy limitadas en N, lo contrario a las anteriores, por lo que la pérdida de aminoácidos en las plantas deficientes en N pudo acompañarse de un descenso de proteínas en la raíz.

El CO₂ elevado redujo el contenido foliar de iones (Ca²⁺, Mg²⁺ y Na⁺) con ambas disponibilidades de nitrógeno y los aumentó en la raíz de las plantas con nitrógeno abundante

Algunos estudios en los que se ha medido la concentración de macro y micronutrientes en la parte aérea, la raíz y el grano de plantas de trigo crecidas en CO₂ elevado han mostrado que frecuentemente disminuyen (Manderscheid *et al.*, 1995; Fangmeier *et al.*, 1997; Fangmeier *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004; Carlisle *et al.*, 2012). En este estudio, aunque el CO₂ elevado modificó el contenido de iones en la hoja y la raíz de las plantas con ambas disponibilidades de N a las 4 h, los cambios más notables tuvieron lugar a las 24 h, como ya se ha anticipado para otros intermediarios metabólicos (Tablas 5.1.7a y 5.1.7b). Así, el CO₂ elevado condujo a un descenso muy similar del contenido foliar de Ca²⁺, Mg²⁺ y Na⁺ tanto en las plantas con N alto como con bajo. A diferencia de la raíz, en la que aumentó el contenido de estos nutrientes, junto al Cl⁻, pero únicamente en las plantas con amplia disponibilidad de N. Loladze (2002), en un análisis conjunto de los resultados de 25 estudios diferentes correspondientes a la concentración de ciertos nutrientes esenciales en las hojas de distintas especies vegetales y del grano de trigo, mostró que el CO₂ elevado redujo el contenido de todos los nutrientes, incluido el Ca²⁺ y el Mg²⁺. Descensos de ambos nutrientes se han encontrado en otros estudios con CO₂ alto, tanto de Ca²⁺ (Fangmeier *et al.*, 1999), como de Mg²⁺ (Carlisle *et al.*, 2012). También se ha observado un aumento de Ca²⁺ y Mg²⁺ en la raíz de plantas de trigo, aunque, a diferencia de nuestro estudio, en plantas con baja disponibilidad de NO₃⁻ (Carlisle *et al.*, 2012). El Ca²⁺ y el Mg²⁺ son elementos que forman parte de componentes estructurales de las paredes y membranas celulares y actúan como cofactores de varios enzimas, y el Ca²⁺, a su vez, desempeña un papel importante como mensajero secundario (Barceló *et al.*, 2005). En el caso del Na⁺, las funciones que ejerce son posiblemente menos conocidas, pero destaca su papel como sustituto del potasio (Ahmad *et al.*, 2012). Mientras que el Cl⁻ desempeña funciones principalmente relacionadas con las relaciones hídricas de la planta. Resulta interesante que un incremento de la absorción y acumulación de Cl⁻ se ha relacionado con un descenso de la concentración de NO₃⁻ en la parte aérea (Ahmad *et al.*, 2012), algo similar a lo ocurrido en nuestro estudio en las plantas crecidas en CO₂ elevado con N abundante. Estos resultados indican que el CO₂ elevado redujo el contenido foliar de varios iones importantes para el metabolismo de las plantas tanto con N alto como con bajo, a la vez que indujo su acumulación en la raíz de las plantas con abundancia de N, lo cual podría relacionarse con la mejora de la capacidad fotosintética y del metabolismo del N observada en éstas plantas.

El análisis multivariable de los distintos parámetros bioquímicos mostró un efecto significativo del CO₂ de crecimiento en las hojas de plantas deficientes en nitrógeno y en la raíz de aquellas con abundancia en dicho nutriente

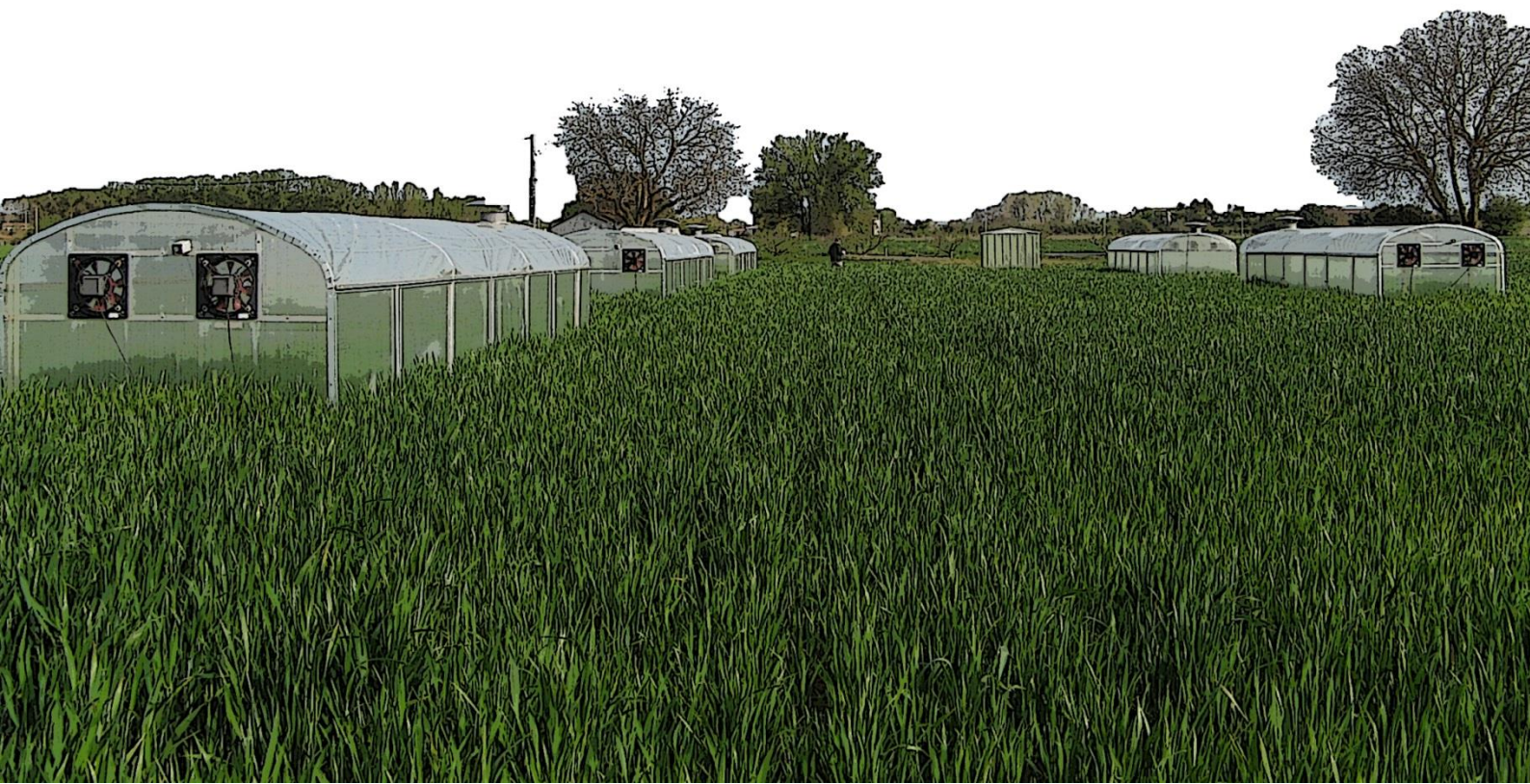
Es de interés indicar que en este trabajo se realizó un análisis conjunto de los datos previamente descritos mediante un análisis multivariable directo (PCA; Fig. 5.1.9a) e indirecto (RDA; Tabla 5.1.9a, Fig. 5.1.9b) de los niveles de intermediarios metabólicos, proteínas, iones y actividades enzimáticas en respuesta a los niveles de CO₂ y N en la hoja y la raíz de las plantas de trigo. Los resultados obtenidos del análisis de redundancia mostraron un efecto significativo de las tres fuentes de variación, CO₂ de crecimiento, disponibilidad de N y la interacción CO₂ × N sobre los parámetros (Tabla 5.1.9a). El suministro de N fue el factor experimental que mostró mayor influencia sobre las variables estudiadas, cuyo efecto fue significativo tanto en la hoja como en la raíz en los dos periodos de incubación

estudiados. A las 24 h de incubación, la interacción $\text{CO}_2 \times \text{NO}_3^-$ sobre las variables fue significativa para la hoja y la raíz. De este modo, el tratamiento estadístico multivariable puso de manifiesto que el CO_2 elevado tuvo un efecto significativo sobre los parámetros en la hoja bandera, el cual fue más acusado cuando el aporte de N fue bajo (Tabla 5.1.9a, Fig. 5.1.9b). Se observó, de acuerdo con los efectos previamente descritos, que el CO_2 elevado condujo en las plantas deficientes en N a un aumento del contenido de carbohidratos y a un descenso de compuestos nitrogenados, RuBP, Rubisco, ácidos orgánicos e iones, en asociación con la inhibición de la asimilación del N y la pérdida de capacidad fotosintética. Además, el CO_2 elevado afectó significativamente a los parámetros estudiados en la raíz, cuyo efecto fue más acentuado cuando el suministro de N fue alto (Tabla 5.1.9a, Fig. 5.1.9b). De manera que el CO_2 elevado aumentó el contenido de carbohidratos, ácidos orgánicos e iones, a la vez que indujo escasos descensos de los compuestos nitrogenados, en asociación con una mejora del estado nutricional y la inducción de genes del metabolismo del N en la raíz de plantas con N abundante. En definitiva, el análisis multivariable corrobora los resultados más relevantes mencionados en apartados anteriores.

Las redes de correlación entre parámetros de la hoja y la raíz en respuesta a los factores experimentales mostraron una coordinación entre la Rubisco, los ácidos orgánicos, los compuestos orgánicos nitrogenados y la expresión de genes del metabolismo del nitrógeno, los cuales disminuyeron con el aumento de carbohidratos o la expresión de genes de su síntesis

En este experimento, al igual que en el anterior, se construyeron redes de correlación para identificar los parámetros del metabolismo del C y N que fueron corregulados significativamente en las condiciones de crecimiento del presente estudio (Fig. 5.1.12b). A diferencia del anterior experimento, se incluyeron un mayor número de metabolitos junto a algunos iones. Se observaron importantes correlaciones positivas, en concreto, se correlacionaron los aminoácidos, el contenido de fructanos y los transcritos de los enzimas de su síntesis, los ácidos orgánicos y los transcritos de los genes involucrados en la glicólisis y el ciclo TCA, los transcritos del metabolismo del N, etc. Estos resultados sugieren que los parámetros pertenecientes a una misma ruta o grupo con funciones biológicas relacionadas se corregularon entre sí en base a los cambios en las condiciones de crecimiento de las plantas en este experimento. En el centro de la redes de correlación para la hoja y la raíz (Fig. 5.1.12b) se observó la coordinación existente entre el metabolismo del C y N dado el número de interacciones positivas entre parámetros pertenecientes a ambos metabolismos. Así, parámetros importantes como el contenido de clorofilas, de actividad y proteína Rubisco, y de intermediarios y ácidos orgánicos relacionados principalmente con el metabolismo del C, se corregularon positivamente con parámetros del metabolismo del N, como el contenido de aminoácidos y de N foliar, además de con las proteínas solubles y algunos iones importantes para la actividad de ambos metabolismos. Algunas de estas interacciones, principalmente entre la Rubisco y el N foliar, también han sido propuestas con anterioridad (Makino *et al.*, 1984; Del Pozo *et al.*, 2007; Seneweera *et al.*, 2011). De todas las interacciones negativas descritas (apartado 5.1.12b), se puede concluir que el aumento de carbohidratos o de intermediarios metabólicos y transcritos de su síntesis se asoció con una disminución de compuestos orgánicos nitrogenados, como ocurrió con la Rubisco y su actividad, los aminoácidos y las proteínas solubles. Es de resaltar la alta coordinación existente entre la expresión de genes del metabolismo primario del N con genes de la glicólisis y del ciclo TCA en la raíz.

CAPÍTULO 6: Experimento 3



6.1. Resultados del experimento 3

6.1.1. Efecto del CO₂ de crecimiento, la temperatura y la fertilización nitrogenada en los parámetros fisiológicos y bioquímicos. Resultados previos

En la Tabla 6.1.1a se muestran los valores, para los ocho tratamientos resultantes de la combinación CO₂ × temperatura × N, de los parámetros fisiológicos y bioquímicos evaluados en la hoja bandera del trigo duro cultivado en TGCs en el campo con anterioridad al análisis de expresión génica realizado en esta Tesis. El análisis de la varianza de tres factores para los parámetros evaluados mostró una gran cantidad de efectos significativos de los factores principales ([CO₂], temperatura y disponibilidad de N) y de las interacciones, particularmente relevantes fueron las correspondientes al CO₂ × N y CO₂ × temperatura.

A sus respectivas [CO₂] de crecimiento, la fotosíntesis fue un 31% mayor en las plantas crecidas en CO₂ elevado que en aquellas mantenidas en CO₂ ambiente. Sin embargo, el CO₂ elevado condujo, en comparación con las plantas crecidas a [CO₂] ambientales, a un descenso de un 62% y 35% de la capacidad fotosintética cuando las medidas se realizaron a una concentración común de 370 y 700 μmol CO₂·mol⁻¹, respectivamente. Este descenso de la fotosíntesis con el CO₂ elevado fue mayor en plantas deficientes en N (68% y 41%, respectivamente) que en aquellas con abundancia de dicho nutriente (56% y 29%, respectivamente), aunque la interacción CO₂ × N no alcanzó significación estadística. El enriquecimiento en CO₂ produjo una mayor disminución de la conductancia estomática y la transpiración, y un menor aumento de la [CO₂] intercelular con las temperaturas 4 °C más elevadas que con las ambientales. El CO₂ elevado condujo a un incremento de la biomasa que fue menor (12%) que el aumento de fotosíntesis (31%) previamente descrito (Tabla 6.1.1a). La acumulación de carbohidratos fue mayor en plantas crecidas a [CO₂] elevadas, y a su vez mayor en plantas con un suministro de N bajo (19% sacarosa, 388% fructanos y 105% almidón, aunque la glucosa descendió un 61%) que con alto (38% fructosa, 171% fructanos y 58% almidón). Por el contrario, se observaron descensos en la concentración de N en la hoja bandera y en la parte aérea de las plantas crecidas en CO₂ elevado (Tabla 6.1.1a), y la pérdida de N foliar fue mayor en plantas con una menor fertilización nitrogenada (35%) que en aquellas con amplia disponibilidad de N (11%). El descenso del contenido de N inducido por el CO₂ elevado se asoció con una reducción en los niveles de compuestos nitrogenados, como las clorofilas, los aminoácidos, las proteínas solubles y, en especial, la proteína Rubisco. Aunque el descenso del contenido de clorofilas fue mayor en plantas con un menor aporte de N (39%) que en aquellas con un mayor aporte (15%). El enriquecimiento en CO₂ disminuyó la fracción de Rubisco en el total de proteínas solubles a temperaturas ambientales pero no a temperaturas elevadas. Además, el CO₂ elevado redujo la actividad NR máxima un 36% e incrementó su estado de activación (Tabla 6.1.1a). Este descenso de la actividad NR fue mayor a temperaturas elevadas que a temperaturas ambientales. El CO₂ elevado también redujo la actividad inicial y total de la Rubisco, y la primera en mayor extensión a temperaturas superiores a las ambientales. El estado de activación de la Rubisco aumentó con el CO₂ elevado en plantas con N abundante, pero no en aquellas deficientes en N, lo cual podría parcialmente compensar el descenso de actividad Rubisco total.

Las temperaturas 4 °C por encima de las ambientales provocaron efectos menos relevantes en los diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos que el enriquecimiento en CO₂ (Tabla 6.1.1a). Así, el

Tabla 6.1.1a. Asimilación fotosintética del carbono (A_n), conductancia estomática (g_s), transpiración (E) y concentración de CO_2 intercelular (C_i) medidos a 370 y 700 $\mu mol\ CO_2 \cdot mol^{-1}$, peso seco (PS), concentración de N, contenido total de N (N_t), distribución porcentual de N entre órganos sobre el total de la planta (N_d , %), contenidos de clorofila total (chl total), glucosa, fructosa, sacarosa, fructanos, almidón, aminoácidos totales, proteína soluble y Rubisco, fracción de Rubisco en la proteína soluble, actividad Rubisco inicial (ARI) y total (ART), y su estado de activación, actividad nitrato reductasa máxima (ANRm) y selectiva (ANRs), y su estado de activación, en plantas de trigo duro cultivado en el campo en cámaras de gradiente térmico a $[CO_2]$ ambiente (A, 370 $\mu mol \cdot mol^{-1}$) o elevada (E, 700 $\mu mol \cdot mol^{-1}$), temperatura ambiente (I) o + 4 °C (F), y fertilización nitrogenada deficiente (L, 15 $kg \cdot ha^{-1}$) o abundante (H, 140 $kg \cdot ha^{-1}$) en la antesis. Si no se especifica, las medidas fueron tomadas en la hoja bandera. Cada valor es la media de 6 réplicas biológicas (3 para las medidas del intercambio gaseoso). Los valores de los parámetros para los factores principales o para la combinación de dos factores se obtienen del promedio de los tratamientos implicados. lsd, mínima diferencia significativa en el análisis de la varianza para cada efecto principal y sus interacciones; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Parámetro	Unidades	AIL	AIH	AFL	AFH	EIL	EIH	EFL	EFH	P_{CO_2}	P_N	P_T	lsd	$P_{CO_2 \times N}$	$P_{CO_2 \times T}$	$P_{T \times N}$	lsd	$P_{CO_2 \times N \times T}$	lsd
A_n 370	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	13,4	15,1	15,5	18,4	3,1	8,4	6,2	6,3	**			3,2				4,5		6,4
A_n 700	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	28,9	33,7	29,0	34,2	15,3	22,3	18,6	25,8	**	**		2,9				4,1		5,8
g_s 370	$mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	147,1	164,7	177,3	296,7	48,2	94,6	67,4	84,6	**	**	*	32,8		*		46,3	*	65,5
g_s 700	$mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	166,3	184,3	158,5	284,3	65,8	129,6	106,7	126,9	**	**		36,5				51,6	*	72,9
E_{370}	$mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	2,84	3,30	3,77	5,49	1,04	1,91	1,48	1,77	**	**	**	0,54		*		0,76		1,08
E_{700}	$mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	3,12	3,58	3,24	4,65	1,59	2,88	2,33	2,55	**	**		0,50				0,71	*	1,01
C_i 370	$\mu mol \cdot mol^{-1}$	161,2	167,1	180,1	217,5	243,8	249,6	201,1	209,5	**			32,1		*		45,4		64,2
C_i 700	$\mu mol \cdot mol^{-1}$	326,3	324,5	329,9	402,2	342,1	352,3	358,2	350,9				25,6				36,2		51,2
PS hoja bandera	g	0,12	0,15	0,11	0,12	0,13	0,12	0,12	0,12		*		0,01		*		0,01		0,02
PS parte aérea	g	3,02	3,30	3,00	3,15	3,52	3,31	3,47	3,64	**			0,27				0,39		0,55
Glucosa	$\mu mol \cdot g\ PF^{-1}$	4,65	3,67	10,44	8,52	1,86	7,68	4,01	6,19	**	*	**	1,15	**	**	*	1,62		2,30
Fructosa	$\mu mol \cdot g\ PF^{-1}$	8,32	5,00	11,21	9,38	3,11	9,89	11,27	9,89			**	1,86	**			2,62	*	3,71
Sacarosa	$\mu mol \cdot g\ PF^{-1}$	18,7	15,8	15,3	19,6	18,7	16,7	21,9	18,5	*			1,5	*			2,1	**	3,0
Fructanos	$\mu mol \cdot g\ PF^{-1}$	38,9	13,5	40,1	13,5	179,5	33,3	205,8	39,9	**	**		12,3	**			17,4		24,6
Almidón	$\mu mol \cdot g\ PF^{-1}$	2,37	1,00	1,14	0,94	3,94	1,62	3,28	1,44	**	**	**	0,24	**		**	0,34		0,48
%N hoja bandera	% peso seco	3,37	4,02	3,20	3,17	2,59	3,12	1,66	3,31	**	**	**	0,20	**			0,29	**	0,41
%N parte aérea	% peso seco	1,19	1,47	1,20	1,37	0,97	1,17	0,89	1,18	**	**		0,09				0,13		0,19
N_t hoja bandera	mg N-órgano ⁻¹	3,80	5,83	3,03	3,99	3,29	3,88	2,88	4,43	**	**	**	0,37		**		0,52	**	0,73
N_t parte aérea	mg N-órgano ⁻¹	37,1	52,8	32,5	44,5	34,3	37,8	30,9	41,1	**	**		3,7				5,2		7,4
N_d hoja bandera	%	11,5	11,6	8,0	9,2	10,1	10,5	7,2	9,8		**	**	1,0				1,3		1,9
N_d espiga	%	32,6	32,4	49,1	48,2	36,7	33,1	42,6	39,2		**	**	3,2		**		4,5		6,3
N_d resto p. aérea	%	56,1	55,4	42,9	43,3	52,8	56,4	49,6	50,1	*	**	**	2,8		**		4,0		5,6
Chl total	mg-g PF ⁻¹	2,85	3,20	2,89	3,12	1,76	2,62	1,74	2,79	**	**		0,26	*			0,37		0,53
Aminoácidos	$\mu mol \cdot g\ PF^{-1}$	25,8	30,2	21,6	21,5	17,3	19,4	16,7	18,2	**	*	**	2,0		**		2,8		3,9
Proteína soluble	mg-g PF ⁻¹	29,2	35,8	26,6	30,2	19,6	25,3	19,0	19,9	**	**	**	2,3				3,2		4,6
Rubisco	mg-g PF ⁻¹	15,1	18,3	13,7	13,1	9,3	10,1	7,8	9,0	**	*	**	0,9		*		1,3	*	1,9
Rbco % prot. sol.	%	47,8	51,6	42,4	43,0	39,0	41,9	35,4	43,9	**	*	**	4,3		*		4,3		6,0
ART	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	66,4	105,7	63,2	97,8	33,5	55,4	32,2	53,5	**	**		7,4	*			10,4		14,7
ARI	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	27,9	38,7	28,6	41,7	23,0	36,7	14,4	26,5	**	**	*	3,3		**		4,7		6,7
Rbco % activ.	%	48,7	34,3	48,0	41,7	52,3	63,5	49,0	58,0	**			4,9	**			6,9		9,8
ANRm	$\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	5,31	8,71	6,17	7,05	3,59	6,33	3,56	3,89	**	**	*	0,76			**	1,07		1,52
ANRs	$\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	2,15	3,03	2,27	2,72	3,30	3,20	1,90	1,71			**	0,39	*	**		0,55		0,78
NR % activ.	%	36,4	29,7	41,8	29,5	84,7	48,0	87,9	51,6	**	**		6,5	**			9,3		13,1

crecimiento a temperaturas elevadas no afectó a la fotosíntesis ni a la biomasa, pero aumentó la conductancia estomática y la transpiración en plantas crecidas a [CO₂] ambientales. Mientras que el contenido de glucosa y fructosa aumentó en las plantas crecidas a temperaturas elevadas, el contenido de almidón descendió. Además, el aumento de temperatura condujo a una pérdida de N en la hoja bandera debido a un descenso de la concentración en la materia seca, en el contenido total (en plantas crecidas en CO₂ ambiente) y en la distribución porcentual sobre el total de la planta. Este descenso en la adscripción de N a la hoja bandera con las temperaturas altas se acompañó de un descenso de la distribución del N al resto de la parte aérea, junto a un incremento de la adscripción del N a la espiga. El contenido de aminoácidos, proteínas solubles y proteína Rubisco, así como la fracción de Rubisco en la proteína soluble disminuyeron con el aumento de temperatura, especialmente en plantas crecidas en CO₂ ambiente. Por el contrario, la actividad Rubisco inicial y la actividad NR selectiva descendieron con la temperatura alta en CO₂ elevado pero no en ambiente. Las temperaturas elevadas indujeron un descenso de la actividad NR máxima en plantas con una fertilización nitrogenada alta pero no cuando fue baja.

6.1.2. Efecto del CO₂ de crecimiento, la temperatura y la fertilización nitrogenada en la expresión de genes del metabolismo del carbono y nitrógeno de la hoja bandera

A continuación se describen los resultados de expresión génica en la hoja bandera para los 125 genes incluidos en la plataforma desarrollada en esta Tesis Doctoral. En la Tabla 6.1.2a se muestran los efectos significativos de la [CO₂] y la temperatura de crecimiento en la abundancia de transcritos, así como las interacciones entre ellos y con la fertilización nitrogenada. Los valores de expresión génica en escala log₂ de cada tratamiento resultante de la combinación CO₂ × temperatura × N con respecto al tratamiento AIH se muestran en dicha Tabla.

De acuerdo con la pérdida de capacidad fotosintética, el crecimiento en CO₂ elevado reprimió la expresión de algunos genes que codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis, entre los que se incluyen la proteína ferrosulfurada de Rieske del Cytb₆f, la subunidad β de la ATPasa, la GluTR y la subunidad grande de la Rubisco, junto a otros relacionados con la fotorrespiración, tales como la GO y la subunidad P de la GDC (Tabla 6.1.2a). El enriquecimiento en CO₂ también disminuyó la abundancia de transcritos de genes que codifican proteínas que participan en la síntesis de almidón (la subunidad grande de la AGPasa y la isoforma I de la SS) y sacarosa (UGPasa y SPS), aunque el contenido de estos carbohidratos aumentó. La expresión de genes involucrados en la síntesis de fructanos fue fuertemente inducida por el CO₂ elevado, mientras que la expresión génica para la 6-KEH fue disminuida, en correlación con la mayor acumulación de fructanos. La expresión de algunos genes relacionados con la respiración también fue alterada por el CO₂ de crecimiento, aunque de manera menos notable. Así, se observó un descenso de los niveles de transcritos de varios que participan en el OPPP (los enzimas citosólicos RPE y RPI), la glicólisis (PEPC y PK, entre otros) y el ciclo TCA (CS y IDH). Además, el CO₂ elevado redujo la expresión de genes relacionados con la asimilación del N, tales como la NR dependiente de NADH y la AS, en relación con el descenso en la concentración de N observado en dichas condiciones, mientras que la expresión génica para la GS1 citosólica aumentó. Los genes que codifican la proteína de estrés térmico HSP90.1-A1 y el factor de transcripción NF-YB3 fueron inducidos y reprimidos, respectivamente.

Varios genes fueron también reprimidos por el CO₂ elevado en plantas con un suministro de N deficiente pero no en aquellas con abundancia de dicho nutriente (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b). Entre los

cuales se incluyen algunos pertenecientes a funciones energéticas (la subunidad β de la ATPasa mitocondrial y la B1 de la vacuolar), el ciclo de Calvin-Benson (los enzimas plastídicos PGK, TPI y RPI), la síntesis y degradación de carbohidratos (la subunidad pequeña de la AGPasa, la isoforma IV de la SS, la SPP, la SUS, la 6&1-FEH, etc.), la síntesis de celulosa (CESA), la glicólisis (F2KP, FBA citosólica, etc.), el ciclo TCA (las subunidades α y E1 del PDC y OGDC, respectivamente) y la asimilación de N (los transportadores de NO_3^- , NRT1.1B y NRT1.7B, y la GS plastídica y citosólica). El descenso de expresión génica para la PGLP y la NiR dependiente de Fd inducido por el CO_2 elevado fue más pronunciado en plantas con un aporte de N bajo que con alto.

Por otro lado, el CO_2 alteró diferencialmente la expresión de varios genes dependiendo de la temperatura de crecimiento (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b). Así, a temperaturas 4 °C superiores a las ambientales, el CO_2 elevado disminuyó la cantidad de transcritos para las proteínas LHCI y D1, la SHMT y la ISO1, mientras que aumentó la abundancia de transcritos para el transportador de NH_4^+ , AMT2;1. En cambio, a temperaturas ambientales pero no elevadas, el CO_2 alto indujo la expresión de los genes que codifican los componentes de los transportadores de NO_3^- de alta afinidad, NAR2.1 y NAR2.2.

Aun cuando el crecimiento a temperaturas elevadas no afectó a la fotosíntesis, indujo cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo del C y N (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b). De este modo, la temperatura elevada redujo la expresión de genes que codifican proteínas de la CTEF (la proteína ferrosulfurada de Rieske del Cytb_{6f} , PC, Fd y FNR), el metabolismo energético (la subunidad B1 de la ATPasa vacuolar), la síntesis de tetrapirroles (GluTR), el ciclo de Calvin-Benson (las subunidades grande y pequeña de la Rubisco), la fotorrespiración (GO, SGAT, etc.), el OPPP (los enzimas citosólicos RPE y RPI), la glicólisis (F2KP), el ciclo TCA (la subunidad E1 del OGDC) y la proteína de estrés térmico HSP70. Otros genes necesarios para la síntesis y degradación de carbohidratos (la subunidad grande de la AGPasa, la isoforma I de la SS, TPT, SPP) y la asimilación de N (los transportadores NRT.1A y NRT2.1, y la GS1 citosólica) fueron también reprimidos, lo cual se relacionó con el descenso en el contenido de almidón y compuestos nitrogenados. Por el contrario, la temperatura alta indujo la expresión génica para la 1-FEH, la invertasa de pared celular, la ICDH citosólica, el transportador NRT1.5B y la HSP90.1-A1. Cuando se combinó con una baja fertilización nitrogenada, y no con alta, la temperatura elevada reprimió la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo energético (la subunidad β de la ATPasa mitocondrial), el transporte de N (CLC) y el factor de transcripción Dof1. Además, la interacción significativa $\text{CO}_2 \times$ temperatura mostró que, en plantas expuestas a $[\text{CO}_2]$ elevadas, la expresión de los genes que codifican las proteínas LHCI, D1, SHMT y NiR fue disminuida con la temperatura elevada, mientras que la expresión del gen para el componente NAR2.2 aumentó. En cambio, en plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, las temperaturas elevadas disminuyeron los niveles de transcritos de genes involucrados en la glicólisis (PGI citosólica) y la asimilación de N (el transportador AMT2;1 y el componente NAR2.1).

Resultados del experimento 3

Tabla 6.1.2a. Principales efectos en la abundancia de transcritos del CO₂ elevado (700 μmol·mol⁻¹) y la temperatura elevada (+ 4 °C a las ambientales) y las interacciones entre ellos y con la fertilización nitrogenada (N bajo, 15 kg·ha⁻¹; N alto, 140 kg·ha⁻¹). Los colores azul y rojo indican inducción y represión, respectivamente, relativa al nivel en el tratamiento ambiente, mientras que el blanco indica que no existen diferencias significativas. Se omitió la columna para la interacción temperatura elevada × N alto debido a que ningún transcrito cambió significativamente. Las abreviaturas de los transcritos se detallan en la Tabla 4.1.7.2a.

Descripción	CO ₂ elevado				Temperatura elevada				
	Efecto princ.	× N bajo	× N alto	× temp. elev.	× temp. amb.	Efecto princ.	× N bajo	× CO ₂ elev.	× CO ₂ amb.
Transporte electrónico fotosintético									
LHCI				■				■	
LHCII									
PsaA									
PsaB									
D1				■				■	
D2									
Cytb6f proteína Rieske	■					■			
PC						■			
Fd						■			
FNR						■			
Energía									
ATPasa β sub. plast.	■								
ATPasa β sub. mit.		■					■		
ATPasa B1 sub. vac.		■				■			
Síntesis de clorofilas									
GluTR	■					■			
Ciclo oxidativo y reductivo de las pentosas fosfato (cloroplasto)									
Rubisco sub. grande	■					■			
Rubisco sub. pequeña						■			
RBA	■								
cpn60									
CA						■			
CA	■					■			
CA	■					■			
CA	■					■			
PGK plast.		■				■			
GAPDH plast.	■					■			
TPI plast.		■				■			
FBA plast.	■					■			
FBPasa plast.	■					■			
TK plast.	■					■			
SBPasa						■			
RPE plast.	■					■			
RPI plast.		■				■			
PRK plast.	■					■			
CP12									
Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (citósol)									
RPE cit.	■					■			
RPI cit.	■					■			
Fotorrespiración									
PGLP		■	■				■		
GO	■					■			
CAT	■					■			
GGAT	■					■			
SGAT	■					■			
GDC sub. P	■					■			
GDC sub. H									
SHMT mit.				■				■	
HPR1 perox.	■					■			
GLYK	■					■			
Síntesis y degradación de carbohidratos									
IPP	■					■			
AGPPasa						■			
AGPasa sub. grande	■					■			
AGPasa sub. pequeña		■							
SSI	■								
SSIII									
SSIV		■							
ISO1				■					
ISO3									
TPT	■					■			
GPT		■							
FBPasa cit.						■			
NDK cit.		■							
UGPasa	■					■			
SPS	■					■			

Tabla 6.1.2a. Continuación.

Descripción	Efecto princ.	CO ₂ elevado			Temperatura elevada				
		× N bajo	× N alto	× temp. elev.	× temp. amb.	Efecto princ.	× N bajo	× CO ₂ elev.	× CO ₂ amb.
Síntesis y degradación de carbohidratos									
SPP		■				■			
SUS		■							
Alnv	■								
1-SST	■								
6-SFT	■								
1-FFT A									
1-FFT B	■								
1-FEH						■			
6&1-FEH		■					■		
6-KEH	■								
TPS									
TRE		■							
Pared celular									
CESA		■							
cwInv						■			
Glicólisis									
HXK									
PGM plast.		■							
PGM cit.		■							
PGI plast.									
PGI cit.									■
PFP									
PFK									
F2KP		■							
FBA cit.		■							
TPI cit.		■							
GAPC cit.	■								
GAPN cit.									
PGK cit.		■							
PGAM									
PEPC	■								
PK	■								
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos									
PDC α-sub. mit.		■							
CS mit.	■								
IDH mit.	■								
ICDH cit.									■
OGDC E1 sub.		■							
Asimilación de nitrógeno									
AMT1;2									
AMT2;1				■					
NRT1.1A									
NRT1.1B		■							
NRT1.3A									
NRT1.5B	■								
NRT1.7B		■							
NRT1.8B									
NRT2.2									
NAR2.1									■
NAR2.2									■
NADH-NR	■								
MoCo									
NiR		■	■						
GS1a	■								
GSr1		■							
GS2a		■							
GS2b									
NADH-GOGAT		■							
Fd-GOGAT									
GDH	■								
AAT cit.		■							
AAT plast.		■							
AS	■								
CLC		■							
Estrés									
HSP90.1-A1	■								
HSP70									
Factores de transcripción									
MYB13-1									
Dof1									■
NF-YB3	■								

Tabla 6.1.2b. Heat map del nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo cultivadas en cámaras de gradiente térmico en el campo a [CO₂] ambiente (A, 370 μmol·mol⁻¹) o elevada (E, 700 μmol·mol⁻¹), temperatura ambiente (I) o + 4 °C (F), y fertilización nitrogenada deficiente (L, 15 kg·ha⁻¹) o abundante (H, 140 kg·ha⁻¹) en la antesis. Los datos se muestran en log₂. Los genes inducidos o reprimidos de cada tratamiento con respecto al tratamiento AIH varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente, según la escala de color (n=3). Las abreviaturas de los transcritos se detallan en la Tabla 4.1.7.2a.

	AIL	AFL	AFH	EIL	EIH	EFL	EFH		AIL	AFL	AFH	EIL	EIH	EFL	EFH
Transporte electrónico fotosintético								Síntesis y degradación de carbohidratos							
LHCI	0,35	-0,17	0,24	-0,05	-0,15	-2,52	-1,57	1-SST	1,76	1,82	0,80	2,33	1,12	3,44	0,90
LHCII	0,05	-0,66	-0,46	-0,37	0,11	-2,44	-1,02	6-SFT	2,95	2,85	1,55	3,84	1,80	4,74	1,87
PsaA	0,10	-0,05	0,01	0,13	0,36	-0,63	-0,20	1-FFT A	1,23	1,52	0,69	1,59	0,81	2,20	0,35
PsaB	-0,01	-0,17	-0,13	-0,12	0,20	-0,86	-0,12	1-FFT B	2,33	2,52	1,60	3,46	1,69	3,73	1,42
D1	0,07	0,10	0,17	0,27	0,45	-0,93	-0,37	1-FEH	0,33	0,71	0,67	0,00	0,13	0,36	0,32
D2	0,27	0,01	0,16	-0,02	0,49	-0,51	-0,31	6&1-FEH	0,42	-0,06	-0,08	-0,90	-0,02	-1,72	0,08
Cytb6f prot. Rieske	0,07	-0,05	-0,21	-0,41	-0,04	-1,24	-0,50	6-KEH	0,00	-0,04	-0,75	-1,33	-0,49	-2,43	-1,30
PC	0,10	-0,22	-0,45	-0,36	0,05	-1,66	-0,62	TPS	0,44	0,30	0,31	-0,14	0,47	0,47	0,16
Fd	0,29	-0,19	-0,38	-0,26	0,19	-1,18	-0,53	TRE	0,53	-0,64	0,29	0,02	0,34	0,48	-0,03
FNR	0,25	0,03	-0,05	-0,12	0,25	-1,03	-0,38	Pared celular							
Energía								CESA	0,08	-0,02	-0,10	-0,32	0,06	-0,51	-0,06
ATPasa β sub. plast.	0,04	0,00	-0,11	-0,33	0,14	-1,78	-0,47	cwInv	0,22	0,58	0,58	-0,11	0,25	0,42	0,25
ATPasa β sub. mit.	0,30	0,12	0,11	0,03	0,30	-0,51	-0,06	Glicólisis							
ATPasa B1 sub. vac.	0,03	-0,11	-0,10	-0,48	-0,01	-0,98	-0,25	HXK	0,23	0,31	-0,21	-0,37	0,42	-0,50	-0,38
Síntesis de clorofilas								PGM plast.	0,06	0,00	-0,08	-0,41	0,03	-1,05	-0,30
GluTR	0,10	-0,47	-0,44	-0,28	-0,09	-2,11	-1,05	PGM cit.	0,19	0,00	-0,06	-0,35	0,08	-0,88	-0,31
Ciclo oxidativo y reductivo de las pentosas fosfato (cloroplasto)								PGI plast.	0,34	0,03	0,18	0,06	0,24	0,02	0,13
Rubisco sub. gr.	0,41	0,19	-0,06	0,15	-0,07	-1,11	-0,69	PGI cit.	0,80	-0,12	-0,37	-0,27	0,17	0,43	-0,30
Rubisco sub. peq.	0,33	-0,34	-0,70	-0,06	-0,17	-2,41	-0,89	PFP	0,01	0,02	-0,09	-0,31	0,13	-1,20	-0,18
RBA	0,19	-0,26	-0,12	-0,43	0,00	-1,41	-0,43	PFK	0,10	-0,29	0,17	-0,52	0,18	-0,27	0,17
cpn60	0,21	-0,20	-0,36	-0,04	-0,26	-2,03	-0,54	F2KP	0,12	-0,28	-0,33	-0,65	-0,01	-2,29	-0,73
CA	0,42	-0,71	-1,03	-0,85	-0,79	-3,11	-1,42	FBA cit.	-0,08	-0,16	-0,12	-0,34	0,02	-0,57	-0,15
CA	-0,11	-1,02	-1,38	-1,07	-0,99	-3,38	-2,02	TPI cit.	0,02	-0,20	-0,17	-0,34	0,03	-0,89	-0,23
CA	0,02	-0,99	-1,23	-0,91	-0,67	-3,13	-1,88	GAPC cit.	0,21	0,08	-0,11	-0,33	0,07	-0,99	-0,42
CA	-0,18	-0,04	0,08	-0,59	-0,22	-0,32	-0,48	GAPN cit.	0,15	-0,03	-0,20	-0,39	0,00	-1,83	-0,49
PGK plast.	0,19	-0,35	-0,57	-0,51	-0,11	-2,22	-0,77	PGK cit.	0,16	-0,11	-0,11	-0,32	0,09	-0,88	-0,27
GAPDH plast.	0,28	-0,33	-0,49	-0,27	-0,16	-2,24	-0,79	PGAM	0,04	-0,02	0,10	-0,12	0,09	-0,35	-0,24
TPI plast.	0,08	-0,21	-0,51	-0,45	-0,14	-1,54	-0,57	PEPC	0,27	0,10	0,38	-0,11	0,23	-0,66	0,05
FBA plast.	0,07	-0,20	-0,30	-0,29	0,11	-1,81	-0,54	PK	0,03	0,03	0,10	-0,30	-0,11	-0,46	-0,39
FBPasa plast.	-0,05	-0,13	-0,23	-0,23	-0,20	-1,39	-0,62	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos							
TK plast.	0,05	-0,50	-0,51	-0,55	-0,21	-1,66	-0,72	PDC sub. α mit.	0,20	-0,09	-0,13	-0,26	0,01	-0,45	-0,15
SBPasa	0,00	-0,09	-0,31	-0,17	-0,19	-1,38	-0,42	CS mit.	0,13	-0,08	-0,09	-0,30	0,04	-0,27	-0,29
RPE plast.	0,04	-0,16	-0,46	-0,49	-0,24	-1,87	-0,74	IDH mit.	0,14	-0,02	0,02	-0,13	0,14	-0,16	-0,19
RPI plast.	0,11	-0,04	-0,06	-0,38	-0,11	-0,41	-0,10	ICDH cit.	-0,07	0,39	0,66	-0,45	0,07	-0,11	0,33
PRK plast.	0,19	-0,02	-0,34	-0,18	-0,16	-1,50	-0,56	OGDC sub. E1	0,10	-0,13	-0,09	-0,23	0,10	-0,68	-0,18
CP12	0,26	-0,15	-0,43	-0,30	-0,28	-1,65	-0,73	Asimilación de nitrógeno							
Ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (citósol)								AMT1;2	0,18	0,03	-0,06	0,25	0,39	-0,27	-0,06
RPE cit.	0,35	-0,14	-0,20	0,06	0,02	-1,56	-0,46	AMT2;1	0,11	-1,05	-0,12	-0,11	0,22	0,39	0,75
RPI cit.	0,23	-0,02	-0,24	-0,07	-0,08	-1,02	-0,80	NRT1.1A	0,39	-0,02	-0,19	0,28	0,23	-0,03	-0,05
Fotorrespiración								NRT1.1B	0,27	0,54	-0,48	0,18	0,08	-0,52	0,28
GLP	0,39	0,45	0,47	-0,76	-0,36	-1,29	-0,22	NRT1.3A	-0,05	-0,14	0,13	0,01	0,25	-0,17	-0,08
GO	0,34	-0,41	-0,25	0,04	-0,13	-0,64	-0,66	NRT1.5B	-0,27	0,45	0,78	-0,81	-0,17	-0,54	-0,09
CAT	0,28	-0,21	0,08	-0,27	-0,27	-1,51	-0,65	NRT1.7B	0,15	0,22	0,22	-0,74	0,58	-0,57	-0,36
GGAT	0,19	-0,12	0,14	-0,22	-0,20	-1,52	-0,42	NRT1.8B	-0,02	0,10	0,32	-0,18	0,15	-0,87	-0,12
SGAT	0,18	-0,17	-0,14	-0,41	-0,10	-0,93	-0,55	NRT2.2	-0,04	-0,03	-0,16	0,34	-0,07	-0,40	-0,41
GDC sub. P	0,22	0,00	-0,15	-0,32	-0,22	-1,32	-0,51	NAR2.1	0,81	-1,41	-1,04	-1,62	-0,62	-1,16	-0,43
GDC sub. H	0,25	-0,08	0,11	0,02	0,09	-1,49	-0,41	NAR2.2	0,52	-0,49	-0,27	-1,02	-0,12	-0,02	0,27
SHMT mit.	0,14	-0,07	0,37	-0,30	0,07	-1,59	-0,43	NADH-NR	-0,23	-0,18	0,47	-0,86	0,11	-1,06	-0,92
HPR1 perox.	0,11	-0,24	-0,29	-0,42	-0,38	-1,08	-0,61	MoCo	0,25	-0,05	0,12	0,12	0,21	-0,27	-0,07
GLYK	0,50	0,09	-0,17	0,01	-0,12	-1,16	-0,31	Nir	0,10	0,88	0,94	-0,66	-0,15	-1,49	-0,68
Síntesis y degradación de carbohidratos								GS1a	0,48	0,32	0,17	0,78	0,47	1,25	0,89
IPP	0,26	-0,06	-0,20	-0,33	-0,14	-1,05	-0,53	GSr1	0,47	0,34	0,01	0,05	0,36	-0,28	-0,22
AGPPasa	0,96	-0,28	-0,15	0,64	-0,08	0,26	-0,23	GS2a	0,40	-0,02	-0,37	-0,15	-0,07	-1,55	-0,45
AGPasa sub. gr.	0,21	-0,08	-0,05	-0,36	-0,09	-1,46	-0,41	GS2b	0,29	0,07	0,08	0,33	-0,48	-0,24	-0,07
AGPasa sub. peq.	0,24	0,07	0,06	-0,27	-0,07	-0,83	-0,20	NADH-GOGAT	-0,15	0,04	0,09	-0,62	0,11	-0,50	0,04
SSI	0,27	0,04	0,03	-0,16	-0,18	-0,96	-0,12	Fd-GOGAT	0,40	0,13	0,14	0,14	0,34	-0,79	-0,03
SSIII	0,59	0,47	0,57	0,43	0,01	0,62	-0,03	GDH	0,01	0,01	0,29	-0,30	-0,32	-0,36	-0,16
SSIV	0,37	0,23	0,19	-0,21	0,12	-0,52	-0,18	AAT cit.	0,14	0,22	0,10	-0,35	0,20	-0,51	0,10
ISO1	0,22	0,40	0,35	0,06	0,23	0,06	-0,32	AAT plast.	0,16	0,03	-0,02	0,02	0,20	-0,95	0,02
ISO3	0,02	-0,09	0,19	-0,45	0,03	-1,48	-0,37	AS	-0,60	-0,50	-0,47	-1,47	-0,67	-1,46	-0,88
TPT	0,27	-0,19	-0,07	-0,18	0,02	-1,31	-0,17	CLC	0,32	-0,08	0,10	0,03	0,22	-0,47	-0,09
GPT	0,19	0,09	0,10	-0,30	0,26	0,03	0,19	Estrés							
FBPasa cit.	-0,01	-0,15	-0,09	-0,06	0,21	-1,30	-0,39	HSP90.1-A1	1,01	0,72	0,51	0,87	0,84	2,52	0,53
NDK cit.	0,43	0,32	0,10	-0,14	0,01	-0,05	0,19	HSP70	0,78	0,00	0,22	0,34	0,48	-0,21	-0,18
UGPasa	0,14	0,15	-0,11	-0,58	-0,25	-0,74	-0,48	Factores de transcripción							
SPS	0,52	0,09	-0,26	-0,04	0,24	-0,54	-0,75	MYB13-1	1,14	1,03	0,44	0,77	0,83	1,32	1,23
SPP	0,12	-0,14	-0,25	-0,44	-0,02	-1,07	-0,40	Dof1	0,33	0,06	0,48	0,43	0,35	-0,11	0,04
SUS	-0,05	-0,58	0,00	-0,84	0,25	-0,95	0,13	NF-YB3	-0,43	-0,17	-0,22	-0,85	-0,20	-1,84	-0,60
AInv	0,38	0,07	0,20	0,20	0,34	0,18	-0,07								

6.1.3. Integración de los resultados de metabolitos, transcritos y proteínas

Se realizó una comparativa global de los ocho tratamientos resultantes de la interacción $\text{CO}_2 \times$ temperatura \times N utilizando todos los parámetros fisiológicos y bioquímicos (Tabla 6.1.1a) y los niveles de transcritos (Tabla 6.1.2b), mediante la construcción de un heat map clusterizado (Fig. 6.1.3a). Aunque ya se han descrito en detalle los efectos de la $[\text{CO}_2]$ y la temperatura elevadas, y sus interacciones para una disponibilidad de N alta o baja, la disposición de los tratamientos de la interacción $\text{CO}_2 \times$ temperatura \times N en el heat map nos indicó las semejanzas y diferencias entre éstos considerando todas las variables estudiadas conjuntamente. Sin duda, el resultado más evidente de este análisis es que los tratamientos en CO_2 elevado con una disponibilidad de N baja (EIL y EFL) quedaron fuera del cluster principal que agrupa al resto de tratamientos.

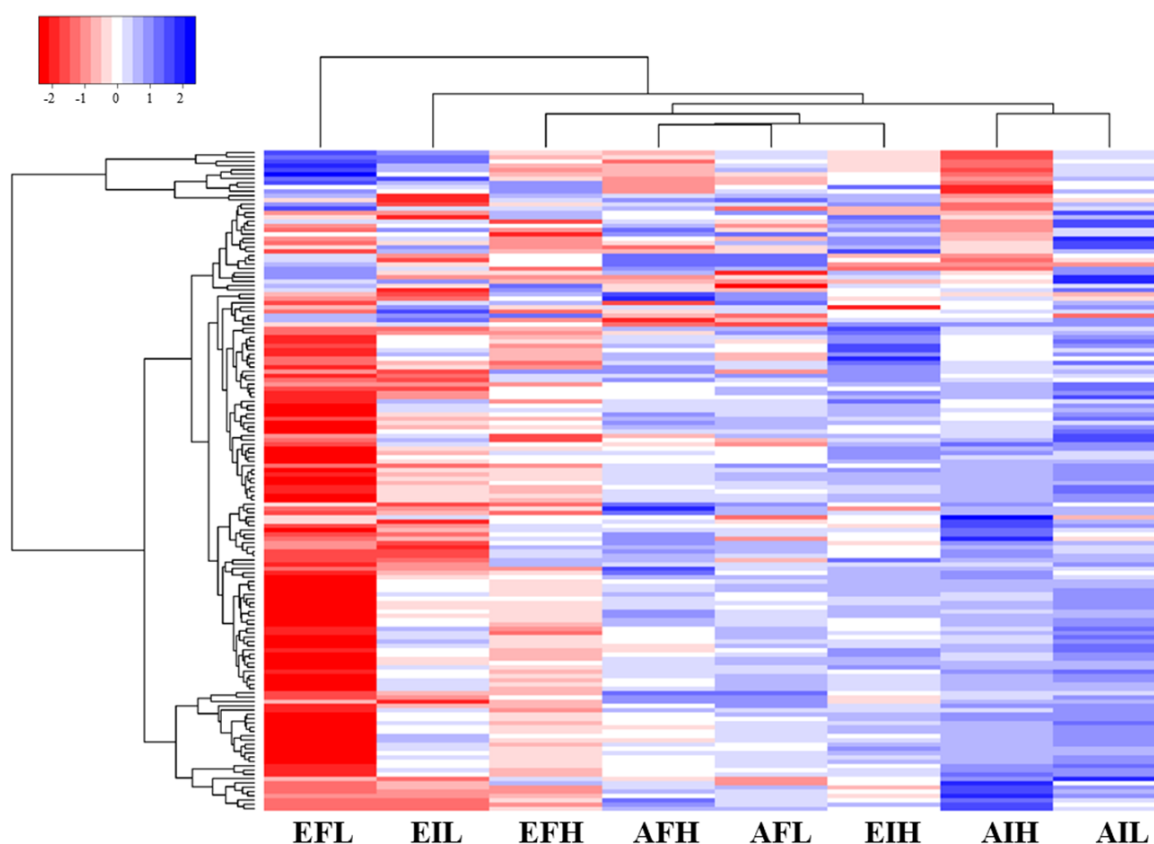


Fig. 6.1.3a. Heat map con clusters de los cambios fisiológicos, bioquímicos y de la abundancia de transcritos bajo condiciones de CO_2 ambiente (A, $370 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) o elevado (E, $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), temperatura ambiente (I) o $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ (F), y fertilización nitrogenada deficiente (L, $15 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) o abundante (H, $140 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en la hoja bandera de trigo duro cultivado en el campo en la antesis. Los datos fueron transformados a escala \log_2 de cada tratamiento con respecto al tratamiento AIH. Cada fila representa un parámetro y cada columna un tratamiento. Los valores fueron escalados en la dirección de la fila como se muestra en la leyenda.

En CO_2 y temperatura elevados con una fertilización nitrogenada deficiente (EFL), el tratamiento que reproduce las condiciones ambientales futuras previsibles con el Cambio Climático, muestra los cambios más acusados con respecto al resto de tratamientos (Fig. 6.1.3a). Aunque las diferencias en la fotosíntesis entre EFL y AIH (tratamiento con las condiciones control, CO_2 y temperatura ambiente con una fertilización nitrogenada abundante), no alcanzaron significación estadística con el test LSD para la interacción de los tres factores. Sin embargo, EFL condujo a un notable descenso de la fotosíntesis, que se estimó, en comparación con AIH, en un 58% y 45% cuando las medidas se

realizaron a una $[\text{CO}_2]$ de 370 o 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente (Tabla 6.1.1a). El descenso de la fotosíntesis se asoció con un aumento del contenido de fructosa (125%) y sacarosa (38%), junto a una fuerte acumulación, no significativa, de fructanos (1424%) y almidón (228%). EFL redujo, con respecto a AIH, la concentración de N foliar como porcentaje de materia seca (59%), el contenido de N foliar (50%) y el contenido de proteína Rubisco (57%). La mayoría de los genes estudiados fueron reprimidos en EFL con respecto a AIH, mientras que sólo algunos fueron inducidos (Tabla 6.1.2b). Así, EFL disminuyó la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, el ciclo de Calvin-Benson, la fotorrespiración, la síntesis de tetrapirroles, la glicólisis, el ciclo TCA y la asimilación de N, y aumentó la expresión de genes que codifican enzimas de la síntesis de fructanos y el factor de transcripción MYB13, junto a la proteína de estrés térmico HSP90, en comparación con AIH.

Por último, se muestran en la Fig. 6.1.3b los principales resultados obtenidos en esta experimentación –metabolitos, transcritos y proteínas– por rutas metabólicas, utilizando los programas de Microsoft Office, cuya integración se describirá en la Discusión.

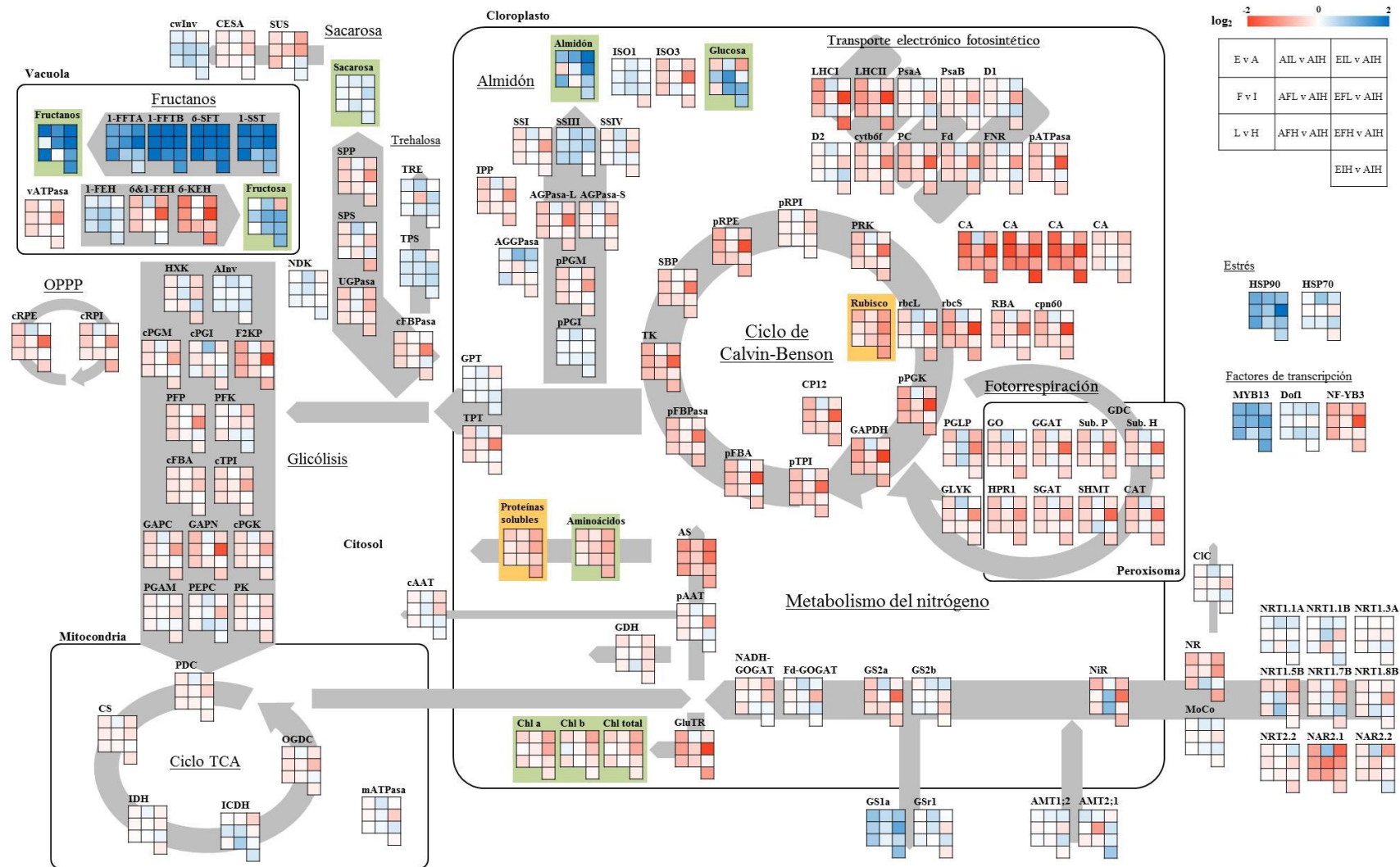


Fig 6.1.3b. Cambios en el contenido de metabolitos (cuadro con fondo verde), proteínas (cuadro con fondo amarillo) y transcritos (sin cuadro) analizados en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en el campo a $[\text{CO}_2]$ ambiente (A, $370 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) o elevada (E, $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), temperatura ambiente (I) o $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ (F), y fertilización nitrogenada deficiente (L, $15 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) o abundante (H, $140 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) en la antesis. Se detallan los cambios debidos a los efectos principales y a la combinación $\text{CO}_2 \times$ temperatura \times nitrógeno en escala \log_2 según la leyenda.

6.1.4. Red de correlación entre parámetros del metabolismo del carbono y nitrógeno en la hoja bandera de plantas de trigo duro bajo distintas condiciones ambientales. Experimentos 1, 2 y 3

Con la finalidad de integrar los resultados de los tres experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral y buscar patrones comunes de coordinación entre parámetros, se construyó una red de correlación. Cuanto mayor sea el número de datos procedentes de una amplia variedad de condiciones experimentales para los diferentes parámetros evaluados que sean incorporados a la red de correlación, mayor es la precisión de las conclusiones que de ella puedan derivarse. A tal fin, se utilizaron únicamente los resultados de los parámetros medidos en la hoja bandera comunes a los tres experimentos. Lo cual, permitió seleccionar diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos (%N de la hoja bandera, el contenido de proteínas solubles y Rubisco, la actividad Rubisco y NR y sus estados de activación, y el contenido de los distintos carbohidratos y clorofilas), además de los niveles de transcritos de los 125 genes incorporados en la plataforma para estudios de expresión génica por qRT-PCR. Dichos parámetros se midieron en un amplio rango de condiciones experimentales, las cuales se recopilan en la Tabla 6.1.4a, que nos permitieron afianzar las conclusiones tomadas. Se incluyeron también los datos pertenecientes a otro estadio de desarrollo del experimento de campo, la emergencia de la espiga. Los cuales no se han descrito en esta Tesis pero se han utilizado tanto en la construcción de la red de correlación como en la evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes de referencia para la correcta normalización de los resultados de expresión génica (apartado 4.1.7.1).

Tabla 6.1.4a. Experimentos y condiciones de cultivo utilizados para la construcción de la red de correlación.

Experimento	Cultivo	Estadio de desarrollo	[CO ₂]	Temperatura	Aporte de N	Muestreo
1	Hidropónico	Antesis	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,5 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Antesis	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	5,0 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,5 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	5,0 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Inicio llenado grano	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,5 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Inicio llenado grano	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	5,0 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Inicio llenado grano	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,5 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
1	Hidropónico	Inicio llenado grano	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	5,0 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,25 mM NO ₃ ⁻	4 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,25 mM NO ₃ ⁻	4 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	2,5 mM NO ₃ ⁻	4 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	2,5 mM NO ₃ ⁻	4 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,25 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	0,25 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	2,5 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
2	Hidropónico	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	15 °C / 20 °C	2,5 mM NO ₃ ⁻	24 h incubación
3	Campo	Emergencia espiga	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Emergencia espiga	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	15 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente	140 kg N·ha ⁻¹	-
3	Campo	Antesis	700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ambiente + 4 °C	140 kg N·ha ⁻¹	-

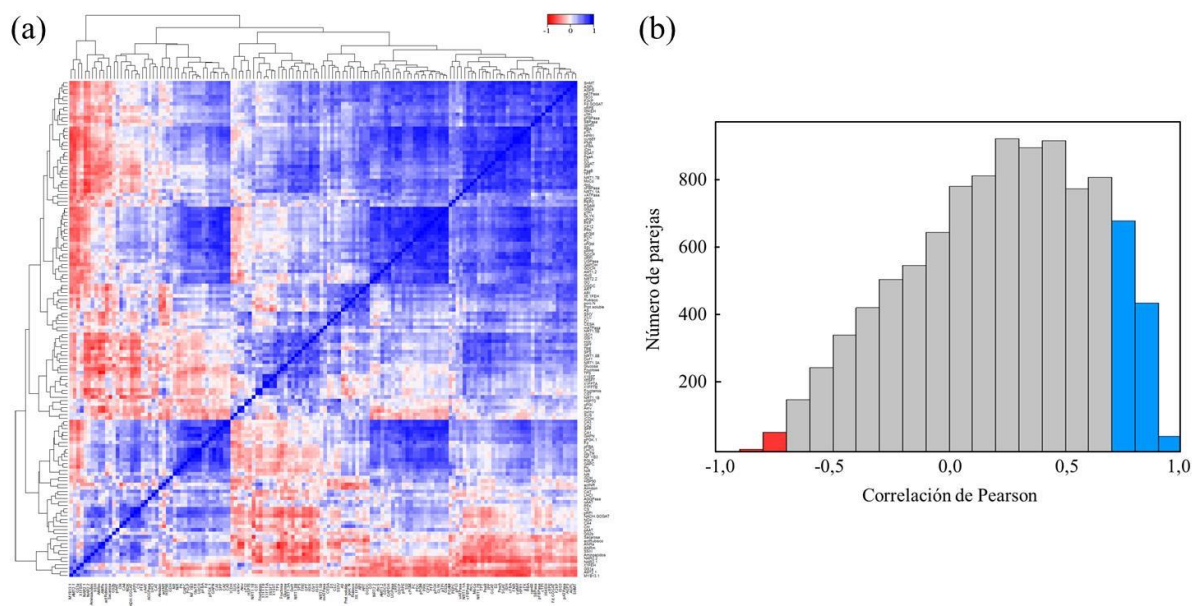


Fig. 6.1.4a. (a) Heat map con clusters de la matriz de correlación y (b) distribución de la correlación de Pearson para los parámetros comunes analizados en los experimentos 1, 2 y 3 en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en las condiciones indicadas en la Tabla 6.1.4a. El coeficiente de Pearson se calculó para cada posible relación, utilizando los valores promedios de cada tratamiento en cada muestreo. Valores próximos a 1 (azul) o -1 (rojo) denotan correlaciones positivas o negativas, respectivamente. La matriz de correlación y el heat map se generó en R y el histograma en GenStat.

Inicialmente, se generó la matriz de correlación para los 142 parámetros incluidos, obteniéndose un total de 10.011 correlaciones (Fig. 6.1.4a). Es importante señalar que sólo se analizaron las correlaciones lineales, puesto que pueden existir otro tipo de correlaciones no lineales entre los parámetros, si bien la mayoría de éstas son de tipo lineal (Mutwil *et al.*, 2010). A partir de los valores del coeficiente de correlación de Pearson y del valor P para cada correlación parámetro–parámetro, se filtraron aquellas correlaciones significativas en base a un criterio de $R > 0,7$ y $P < 0,01$ para las positivas, y de $R < -0,7$ y $P < 0,01$ para las negativas. Así, un total de 1.163 correlaciones positivas y 65 negativas fueron importadas en Cytoscape para su visualización (Fig. 6.1.4b). El análisis de los parámetros que incluyen una gran variedad de condiciones experimentales mostró que el número de correlaciones positivas entre parámetros fue muy superior al de correlaciones negativas. Además, por lo general, cada parámetro se correlacionó, a su vez, con un amplio grupo de parámetros, lo que dificultó la visualización de sus correlaciones. Con esta finalidad, se generó una nueva red de correlación y se introdujo una escala de color para representar el número de correlaciones entre parámetros (Fig. 6.1.4c), lo que mostró la relevancia de cada uno de ellos en la red.

A continuación, se detallan algunas de las relaciones más interesantes encontradas en la red. El contenido de fructanos y la expresión de los cuatro genes que codifican enzimas de su síntesis se correlacionaron positivamente todos ellos entre sí y con el contenido de CST (Fig. 6.1.4b). En cambio, no se observó ninguna relación con la expresión de los genes que codifican las FEHs, las cuales se correlacionaron con un grupo de genes con funciones diversas. El contenido de fructosa se correlacionó positivamente con el de glucosa, así como con la expresión de genes que codifican proteínas que operan de algún modo con fructosa, como fueron la HXK, el GPT y la TPS. Algunos de los genes claves de la asimilación del N se correlacionaron positivamente entre ellos (NR, NiR, NADH-GOGAT) y con la actividad NR, tanto máxima como selectiva, junto con otros genes importantes de la respiración (PK, CS). La actividad NR también se correlacionó con el contenido de

aminoácidos, con algunos genes relacionados con la fotosíntesis (LHCII, GluTR, pFBA) y con el factor de transcripción NF-YB3, implicado en la regulación de genes fotosintéticos (Stephenson *et al.*, 2011). El gen que codifica el cofactor MoCo de la NR, se correlacionó con genes del metabolismo del N (Fd-GOGAT, NRT1.1A, GSr1) y, entre otros, con la TRE, la ATPasa plastídica y el factor de transcripción Dof1, involucrado en la expresión de genes del metabolismo del C y N (Kumar *et al.*, 2009). Algunos transportadores de NO_3^- se relacionaron entre ellos, aunque de entre todos destaca el transportador NRT1.1A por su número de correlaciones, que se coexpresa con algunos otros genes de la fotosíntesis, entre otros (Fig. 6.1.4c).

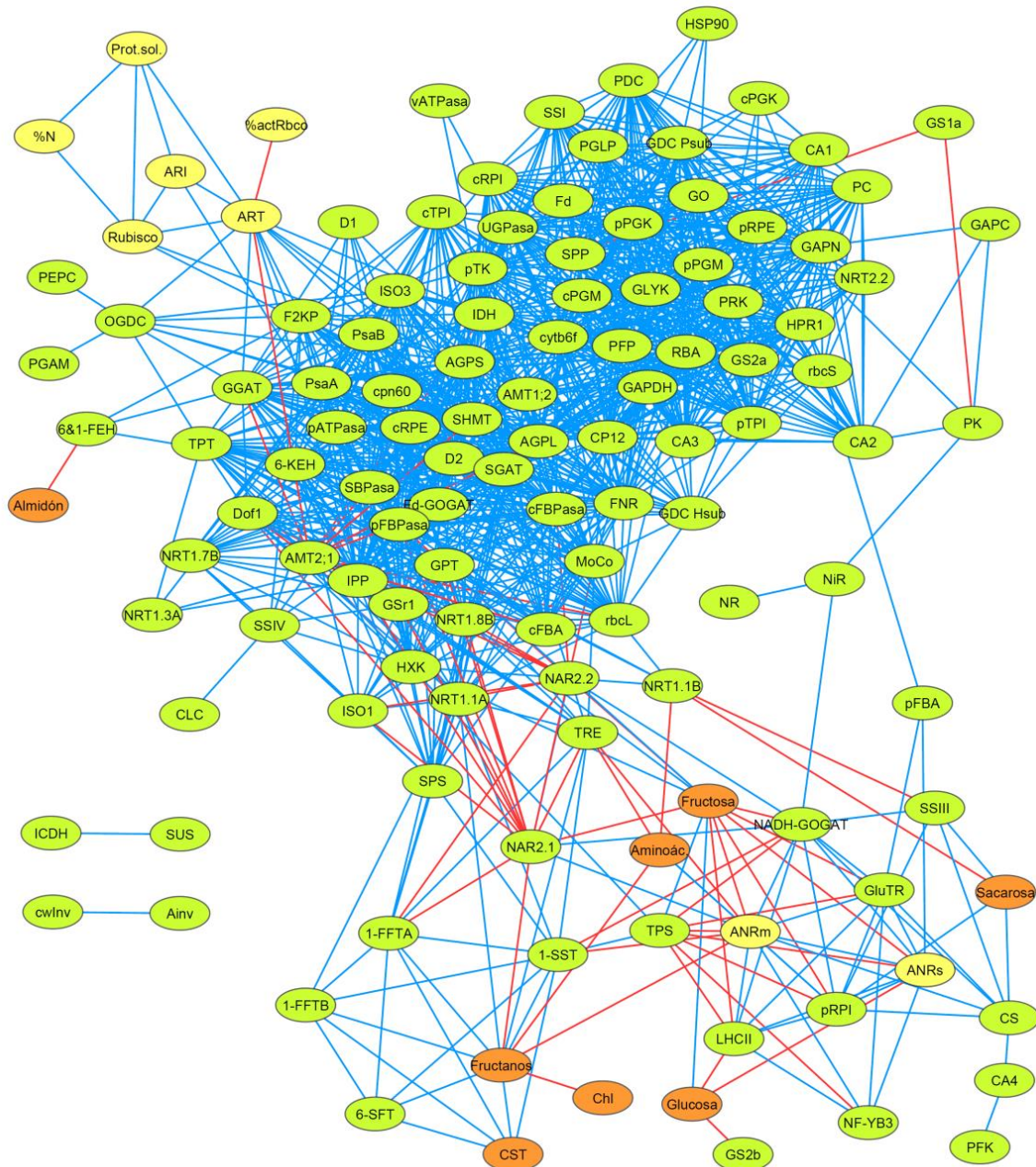


Fig. 6.1.4b. Red de correlaciones significativas entre los parámetros comunes analizados en los experimentos 1, 2 y 3 en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en las condiciones indicadas en la Tabla 6.1.4a. Las correlaciones entre todos los parámetros se calcularon con el coeficiente de correlación de Pearson utilizando R. 1.228 correlaciones significativas ($0 \leq P < 0,01$ y $R > 0,7$ para las interacciones positivas; y $0 > P > 0,01$ y $R < -0,7$ para las negativas) fueron importadas en Cytoscape para la visualización de la red. Los transcritos se presentan en color verde, los metabolitos en naranja, y el resto de parámetros en amarillo. Las correlaciones positivas se indican en azul y las negativas en rojo.

Por otro lado, se encontró una estrecha correlación positiva entre la concentración de N foliar y el contenido de proteínas solubles, en particular, Rubisco, existiendo a su vez una correlación con su actividad inicial y total, junto con la expresión de los genes que codifican las dos subunidades de la AGPasa (Fig. 6.1.4b). La actividad Rubisco se correlacionó con un amplio grupo de genes que codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis y la respiración (ATP plastídica, SHMT, GGAT, F2KP, IDH, OGDH). Los genes de dicha enzima, principalmente el de la subunidad grande, se correlacionaron con la mayoría de los genes de la CTEF y con otros genes fotosintéticos (cpn60, CP12, y algunos genes del ciclo de Calvin-Benson y la fotorrespiración, entre otros). Las CAs y las INV's se correlacionaron entre ellas. Si bien, la expresión de tres de las CAs se correlacionó con la expresión de un amplio grupo de genes relacionados con la fotosíntesis (proteína de Rieske del Cytb₆f, Fd, PC, GAPDHs, PRK, RBA, rbcS, rbcL, etc.), la fotorrespiración, la síntesis de carbohidratos (SPP, SSI, UGPasa), la glicólisis (PFK, PFP, PK) e incluso el metabolismo del N (GS2a, NRT2.2). El resto de correlaciones mostraron evidencias de la estrecha relación existente en la expresión de genes de una misma ruta, y la abundancia de nexos que se establecen entre las distintas rutas del metabolismo del C y N.

Las correlaciones negativas entre los parámetros seleccionados con el estricto criterio de significación establecido fueron escasas. Destacaron las relaciones negativas entre los carbohidratos y parámetros del metabolismo del N, como las establecidas entre el contenido de fructanos y los transcritos de las FTs con NAR2.1, la actividad NR máxima y el contenido de clorofilas y aminoácidos; de la fructosa con NAR2.1, LHCII, GluTR, NADH-GOGAT y la actividad NR máxima; de la glucosa con LHCII, GS2b y la actividad NR selectiva; y de la sacarosa con NRT1.1B (Fig. 6.1.4b). El estado de activación de la Rubisco se relacionó negativamente con su actividad total. La expresión génica de la GS1a resultó ser significativamente contraria a la de los genes PK y SPP. Con respecto al resto de relaciones negativas, los transcritos de AMT2;1, NAR2.1 y NAR2.2 ocuparon un lugar central, con múltiples interacciones con un grupo variado de transcritos para proteínas del metabolismo del C, pertenecientes al ciclo de Calvin-Benson, la glicólisis o la síntesis de carbohidratos. Sorprendentemente, los niveles de transcritos para los componentes NAR2.1 y NAR2.2 se relacionaron negativamente con los de los transportadores NRT1.1A y NRT1.8B.

Los parámetros que mostraron un mayor número de correlaciones con otros fueron los genes que codifican la subunidad grande y pequeña de la AGPasa, la FNR, la proteína de Rieske del Cytb₆f, la RBA, la SHMT y la CP12, entre otros (Fig. 6.1.4c).

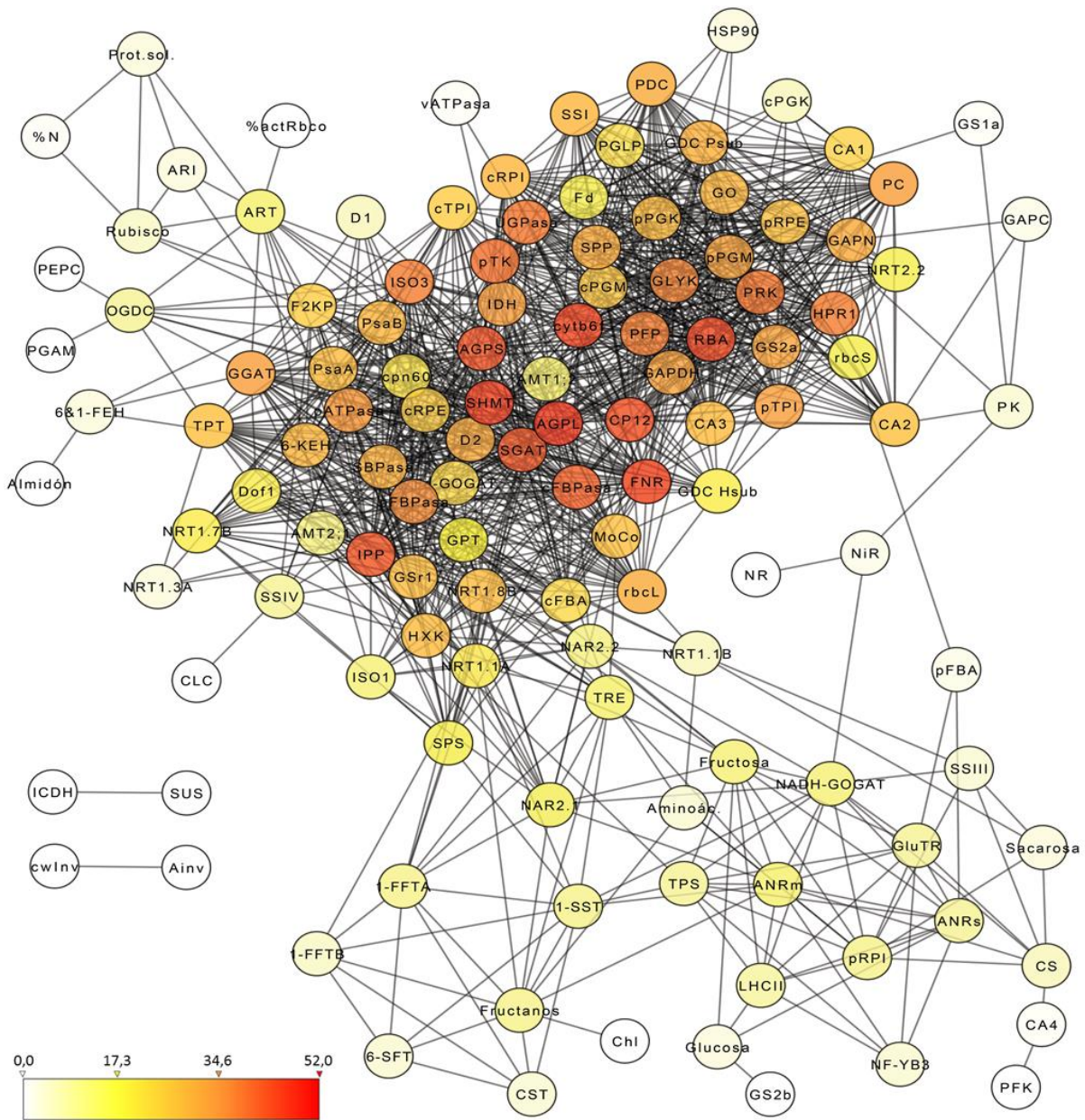


Fig. 6.1.4c. Visualización del número de correlaciones de cada parámetro con el resto sobre la red de correlaciones significativas generada con los parámetros comunes analizados en los experimentos 1, 2 y 3 en la hoja bandera de plantas de trigo duro cultivadas en las condiciones indicadas en la Tabla 6.1.4a.

6.2. Discusión del experimento 3

El CO₂ elevado aumentó la fotosíntesis y la acumulación de biomasa, y condujo a una pérdida de capacidad fotosintética que se asoció con un descenso del contenido de nitrógeno foliar y de la planta

La respuesta del trigo cultivado en el campo a [CO₂] y temperatura elevados con dos niveles de disponibilidad de N en el suelo se investigó por integración de los datos de expresión génica (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b), obtenidos con la plataforma de qRT-PCR desarrollada en esta Tesis Doctoral (Tabla 4.1.7.2a, Anexo 3A), con los de los parámetros bioquímicos y fisiológicos (Tabla 6.1.1a). En este experimento, cuando las medidas de fotosíntesis se realizaron a sus respectivas [CO₂] de crecimiento, el CO₂ elevado condujo a una estimulación de la fotosíntesis que se acompañó de una mayor acumulación de biomasa, aunque comparativamente el incremento de materia seca fue menor que el de la asimilación fotosintética del CO₂ (Tabla 6.1.1a). Un aumento de la biomasa en plantas crecidas en una atmósfera enriquecida en CO₂ se ha encontrado frecuentemente en estudios de campo (Ericc *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Gutiérrez *et al.*, 2013). Cuando las medidas de fotosíntesis se realizaron a una concentración común de CO₂ en la medida, el enriquecimiento en CO₂ condujo a una pérdida de capacidad fotosintética (Nie *et al.*, 1995a; Pérez *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Aranjuelo *et al.*, 2011a; Sinha *et al.*, 2011), que se asoció con un descenso de actividad y proteína Rubisco (Tabla 6.1.1a), de acuerdo con estudios previos (Stitt & Krapp, 1999). Asimismo, el CO₂ elevado redujo, en comparación con las plantas crecidas en CO₂ ambiente, el contenido de N de la hoja bandera y de la parte aérea de la planta (Del Pozo *et al.*, 2007; Taub & Wang, 2008; Aranjuelo *et al.*, 2011a), expresado tanto en base al peso total como a la concentración, así como el contenido de aminoácidos y proteínas solubles diferentes a la Rubisco (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Del Pozo *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Aranjuelo *et al.*, 2011a) (Tabla 6.1.1a). El hecho de que el CO₂ elevado indujera menores descensos en proteína soluble que en proteína Rubisco en plantas crecidas a temperaturas ambientales, pero no en aquellas mantenidas a temperaturas elevadas, sugiere que la pérdida selectiva de Rubisco en condiciones de CO₂ elevado (Long *et al.*, 2004) no es una respuesta generalizada. El descenso de Rubisco inducido por el CO₂ elevado pudo ser agravado por una reducción de los niveles de transcritos del gen que codifica la subunidad grande del enzima (Nie *et al.*, 1995a). Además, la represión de los genes que codifican la GDH y la AS, junto con la posible limitación de la absorción de N (Del Pozo *et al.*, 2007; Taub & Wang, 2008) en asociación con el descenso de la abundancia de transcritos para el transportador de NO₃⁻ NRT1.5B, pudieron haber contribuido a la pérdida de N de la planta (Tablas 6.1.1a y 6.1.2a, Fig. 6.1.3b).

La actividad NR se sabe que está sujeta a un complejo mecanismo de regulación que afecta tanto a la actividad del enzima, como a la expresión de los genes que la codifican y a la cantidad de proteína (Kaiser & Huber, 1994; Hawkesford *et al.*, 2012; Lambeck *et al.*, 2012). En nuestro estudio, el descenso de transcritos del gen que codifica la NR inducido por el CO₂ elevado (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b) se acompañó de una disminución de la actividad del enzima (Tabla 6.1.1a), lo cual podría ser indicativo de una menor cantidad de proteína o bien de alguna modificación post-traducciona del enzima (Hawkesford *et al.*, 2012). Sin embargo, resulta de interés indicar que la reducción de transcritos y actividad NR asociada al crecimiento a [CO₂] elevadas pudo ser compensada por un aumento del estado de activación del enzima (Tabla 6.1.1a). Estos resultados contrastan con estudios previos con trigo blando, trigo duro y centeno en sistemas FACE que han mostrado un aumento de la

actividad NR foliar en estadios de formación del grano (Sailo *et al.*, 2013), al igual que con plantas de tabaco cultivadas con NO_3^- (Geiger *et al.*, 1999). Si bien, cuando las plantas de tabaco recibieron NH_4NO_3 , el CO_2 elevado redujo la actividad NR (Geiger *et al.*, 1999), en conformidad con nuestros resultados aun cuando la fuente de N utilizada en nuestro estudio fue el NO_3^- . Lo cual pone de manifiesto la variabilidad de respuestas de la actividad NR al enriquecimiento en CO_2 (Bloom *et al.*, 2010). Aunque se ha mostrado que el crecimiento en CO_2 elevado conduce a una represión de la NR en plantas de tabaco y *Medicago truncatula* (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2013). En nuestro estudio, el descenso del contenido de aminoácidos, en especial Gln (Scheible *et al.*, 1997b; Morcuende *et al.*, 1998), y el aumento del contenido de sacarosa (Kaiser & Huber, 1994; Morcuende *et al.*, 1998) inducidos por el CO_2 elevado pudieron contribuir al aumento del estado de activación de la NR, principalmente en las plantas con un aporte de N bajo.

Se ha indicado frecuentemente que el CO_2 elevado en plantas C_3 conduce a una inhibición de la fotorrespiración debido a la competición entre el CO_2 y el O_2 por el centro activo de la Rubisco (Long *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la inhibición de la fotorrespiración con el CO_2 elevado se asoció con la represión de la mayoría de los genes involucrados en esta ruta (Tabla 6.1.2a, Fig. 6.1.3b), de acuerdo con trabajos previos con otras especies vegetales, como la soja (Ainsworth *et al.*, 2006) y *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2008). Destaca la fuerte represión del gen *cat1* que codifica una CAT, que aunque no interviene directamente en la fotorrespiración, cataliza la descomposición del H_2O_2 generado en esta ruta. Se ha descrito que los cambios en la expresión génica, traducción y/o nivel de proteína de la CAT parecen estar estrechamente relacionados con la fotorrespiración (Luna *et al.*, 2005). En nuestro estudio, se muestran evidencias de que la limitación de la fotorrespiración se acompaña de un descenso de transcritos del gen que codifica dicha proteína y, con ello, se atenúa el estrés oxidativo en hojas en CO_2 elevado (Azevedo *et al.*, 1998). Además, la inhibición de la fotorrespiración en plantas crecidas en CO_2 elevado podría disminuir la disponibilidad de poder reductor necesario para llevar a cabo la reducción de NO_3^- a NH_4^+ , como se ha mostrado previamente en trigo (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2014). Esto se debería a que al disminuir la fotorrespiración se podría limitar el transporte de malato del cloroplasto al citosol, lo cual podría reducir la cantidad de NADH necesario para la reducción de NO_3^- en la reacción catalizada por la NR (Bloom *et al.*, 2012), y así contribuir al descenso de N observado en las plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ elevadas (Tabla 6.1.1a).

Uno de los mecanismos propuestos por los que el enriquecimiento en CO_2 conduce a un descenso del contenido de N foliar y de la planta contempla que pueda derivarse de una limitación en la absorción de N como consecuencia del descenso de transpiración (Del Pozo *et al.*, 2007; Taub & Wang, 2008). Así, en nuestro estudio, el descenso de la conductancia estomática y de la tasa de transpiración en plantas crecidas en CO_2 elevado (Tabla 6.1.1a) pudo limitar la movilidad de nutrientes en el entorno de la raíz y disminuir la absorción del N del suelo (Stitt & Krapp, 1999; McDonald *et al.*, 2002; Del Pozo *et al.*, 2007), contribuyendo a la pérdida de N en las plantas. Se ha observado una relación positiva entre el estado nitrogenado de la planta y la transpiración (Conroy & Hocking, 1993; Polley *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 2002). Otros estudios indican que una insuficiente expansión del sistema radicular en plantas de trigo crecidas a $[\text{CO}_2]$ elevadas podría disminuir la absorción de N de las capas más profundas del suelo (van Vuuren *et al.*, 1997), lo cual conllevaría a que la absorción de N no se ajuste a la demanda de la planta. Por tanto, el descenso del contenido de N de las plantas crecidas en CO_2 elevado pudo deberse a una inhibición de la absorción de N, como sugiere el descenso de la transpiración y de la abundancia de transcritos para un transportador de NO_3^- , junto a la limitación en la asimilación de dicho nutriente. En conformidad con la disminución de la abundancia de transcritos

de genes del metabolismo del N y de la fotorrespiración y el descenso de actividad NR máxima previamente descritos. Por otro lado, el cierre estomático y el descenso de la transpiración observado con el CO₂ elevado podría mejorar la respuesta de las plantas al déficit hídrico por la mejora de la eficiencia en el uso de agua (Stitt & Krapp, 1999); situación que será cada vez más recurrente en áreas de nuestro entorno geográfico con el Cambio Climático.

La aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado fue mayor en plantas con una fertilización nitrogenada deficiente y se asoció con una mayor reducción de compuestos nitrogenados

La aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado fue mucho más severa en plantas deficientes en N que en aquellas con abundancia de dicho nutriente (Tabla 6.1.1a), al igual que en nuestros estudios previos con trigo de primavera cultivado en el campo (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Del Pozo *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2013) y en otras plantas C₃ (Stitt & Krapp, 1999). Esta mayor pérdida de capacidad fotosintética en plantas con un aporte de N bajo pudo asociarse a que el estado de activación de la Rubisco no aumentó como lo hizo en plantas con un aporte de N alto, en este estudio y en otros previos (Pérez *et al.*, 2005), y a que el contenido de clorofilas y la concentración de N foliar disminuyó más que en las plantas con abundancia de N (Tabla 6.1.1a). El descenso inducido por el CO₂ elevado en la expresión génica de varios transportadores de NO₃⁻, como se ha observado en arroz (Fukayama *et al.*, 2011) y *Medicago truncatula* (Guo *et al.*, 2013), y de otras proteínas que participan en la asimilación del N, como la NiR, podría haber contribuido a agravar la pérdida de N foliar (Tabla 6.1.2a). En conjunto, estos resultados sugieren que el mayor descenso de transcritos para las proteínas involucradas en la absorción y asimilación del N en plantas deficientes en N, condujo a una reducción de la concentración de compuestos nitrogenados y a una pérdida de capacidad fotosintética en CO₂ elevado (Stitt & Krapp, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2013).

El CO₂ elevado indujo la acumulación de carbohidratos foliares en mayor medida en plantas con una fertilización nitrogenada deficiente

El crecimiento a [CO₂] elevadas condujo, en comparación con las plantas crecidas en CO₂ ambiente, a un aumento del contenido de carbohidratos en la hoja bandera (Tabla 6.1.1a), principalmente fructanos (Nie *et al.*, 1995a; Pérez *et al.*, 2005), que fue mayor en plantas con un aporte de N bajo que en aquellas con N abundante, de acuerdo con estudios previos (Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2005) y el anterior cultivo hidropónico. La menor acumulación de carbohidratos en plantas con un aporte de N alto pudo estar relacionada con una inhibición de la síntesis de almidón (Scheible *et al.*, 1997a) y de fructanos por NO₃⁻ (Morcuende *et al.*, 2004), aunque éste no parece influir en el contenido de sacarosa (Scheible *et al.*, 1997a). En estudios previos con soja (Leakey *et al.*, 2009b) y arroz (Fukayama *et al.*, 2011), se correlacionó la acumulación de almidón y sacarosa en plantas crecidas en CO₂ elevado con un aumento de los niveles de transcritos de su síntesis. En cambio, en nuestro experimento, la acumulación de almidón y sacarosa en CO₂ elevado se acompañó de un descenso de la expresión de los genes involucrados en dichas rutas biosintéticas (Fig. 6.1.3b), represión que fue más acusada y abarcó a un mayor número de genes cuando el aporte de N fue bajo (Tabla 6.1.2a), al igual que en el anterior experimento. Las diferencias entre el contenido de carbohidratos y los niveles de transcritos de su biosíntesis podrían deberse a que a menudo el patrón de expresión génica no coincide

con el nivel de proteína y la actividad del enzima a lo largo del ciclo diurno (Geigenberger, 2011), o bien a regulaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales (Grennan, 2006; Orzechowski, 2008) o a que otros genes que modulan éstas rutas de síntesis no fueron evaluados, como factores de transcripción o intermediarios en la transducción de señales (Fukayama *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayor acumulación de fructanos en plantas crecidas en CO₂ elevado se asoció con una fuerte inducción de la expresión de las FTs, 1-SST, 6-SFT y 1-FFT (isoforma B) (Tablas 6.1.1a y 6.1.2a, Fig. 6.1.3b), como en estudios previos con arroz (Fukayama *et al.*, 2011). Además, la sacarosa es no sólo el substrato para la síntesis de fructanos, sino que induce también la expresión génica (Xue *et al.*, 2011) y la actividad de las FTs (Kawakami *et al.*, 2005), por lo que la mayor acumulación de sacarosa inducida por el CO₂ elevado en las plantas con un aporte bajo de N pudo facilitar la inducción de la síntesis de fructanos en comparación con las plantas con un aporte abundante en N.

El CO₂ elevado condujo a una represión de genes relacionados con la degradación de carbohidratos, SUS y 6&1-FEH, que fue más severa en plantas deficientes en N que en aquellas con N abundante, lo cual pudo haber contribuido a la mayor acumulación de carbohidratos observada en tales condiciones. La SUS participa tanto en la síntesis como en la degradación de sacarosa, aunque predomina ésta última a fin de proporcionar intermediarios para la síntesis de pared celular (Sturm *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2011), y la 6&1-FEH parece estar involucrada en la degradación de fructanos de bajo grado de polimerización (Kawakami *et al.*, 2005). Los resultados de este estudio son consistentes con la hipótesis propuesta de represión de genes fotosintéticos mediada por la acumulación de carbohidratos foliares en CO₂ elevado (Nie *et al.*, 1995a; Moore *et al.*, 1999; Stitt & Krapp, 1999). Sin embargo, otros factores como la reducción de la absorción y/o la asimilación del N pudieron también contribuir, incluso en mayor medida (Nie *et al.*, 1995a; Pérez *et al.*, 2005).

Además, el CO₂ elevado redujo los niveles de transcritos de genes involucrados en la respiración, particularmente cuando la fertilización nitrogenada fue baja (Tabla 6.1.2a, Fig. 6.1.3b). Así, disminuyeron los transcritos de genes relacionados con la glicólisis, el ciclo TCA y el gen que codifica la subunidad β de la ATPasa mitocondrial. Estudios previos han mostrado efectos variables del CO₂ sobre la respiración según la especie vegetal y diferentes factores (Drake *et al.*, 1999; Wang & Curtis, 2002; Davey *et al.*, 2004). Los resultados de este experimento de campo contrastan con la tendencia de otros estudios recientes que han observado un aumento de la velocidad de respiración y de la abundancia de transcritos de genes que codifican proteínas involucradas en esta ruta en plantas de soja crecidas en CO₂ elevado (Ainsworth *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009b), tomate (Li *et al.*, 2013) y *Arabidopsis* (Markelz *et al.*, 2014b). Además, en ésta última especie vegetal se ha encontrado que la inducción de la expresión de genes de la respiración es mucho menor en plantas con un suministro limitante de N (Markelz *et al.*, 2014a). En nuestro estudio, aun a pesar de la represión de dichos genes, la respiración nocturna podría haber sido incrementada (Davey *et al.*, 2004; Markelz *et al.*, 2014b) debido al gran aumento de carbohidratos en CO₂ elevado. No obstante, en este experimento en campo y en los dos anteriores con cultivos hidropónicos, la integración de los datos del contenido de ácidos orgánicos y los niveles de transcritos respiratorios, junto a las investigaciones de otros autores (Li *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2012; Aranjuelo *et al.*, 2013), apoyan la teoría de que el crecimiento en CO₂ elevado inhibe la respiración en trigo duro.

El CO₂ elevado redujo la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en funciones cloroplásticas, especialmente en plantas con una fertilización nitrogenada deficiente

El crecimiento de las plantas en CO₂ elevado condujo a una represión de genes relacionados con funciones cloroplásticas (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b, Fig. 6.1.3b), como se ha observado previamente tanto a nivel proteómico (Bokhari *et al.*, 2007; Aranjuelo *et al.*, 2011a) como transcriptómico (Li *et al.*, 2006; Fukayama *et al.*, 2009; Fukayama *et al.*, 2011; Kaplan *et al.*, 2012). Así, el CO₂ elevado redujo la abundancia de transcritos para algunas proteínas involucradas en la CTEF, lo cual podría explicar el descenso de actividad fotoquímica observado en estudios previos con trigo (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2011). Por el contrario, el descenso de transcritos para la LHCI y la D1 causado por el CO₂ elevado a temperaturas elevadas no se correlacionó con la mitigación por el CO₂ alto de la inhibición de la actividad fotoquímica inducida por las temperaturas altas (Gutiérrez *et al.*, 2009a). Además, el crecimiento a [CO₂] elevadas condujo a un descenso de la expresión de la mayoría de genes que codifican proteínas involucradas en el ciclo de Calvin-Benson, especialmente en las plantas deficientes en N, y la síntesis de clorofilas. Aunque la Rubisco es la proteína foliar más abundante y determinante en la actividad fotosintética, ésta puede también estar condicionada por la disponibilidad de otras proteínas limitantes del ciclo de Calvin-Benson (Stitt *et al.*, 2010; Parry *et al.*, 2011). Así, se ha sugerido que enzimas como la FBA, la TK y la SBPasa pueden influir notablemente en la fotosíntesis (Aranjuelo *et al.*, 2013). En nuestro estudio, el CO₂ elevado disminuyó los niveles de transcritos para los dos primeros enzimas, lo cual pudo haber contribuido a la aclimatación fotosintética. El descenso de expresión génica para la RBA inducido por el CO₂ elevado pudo disminuir el contenido de proteína, en conformidad con estudios previos con trigo duro cultivado en el campo (Aranjuelo *et al.*, 2011a) y arroz (Bokhari *et al.*, 2007). Este hecho podría dificultar la separación de los azúcares enlazados al centro activo de la Rubisco, inhibiendo la actividad catalítica del enzima (Parry *et al.*, 2011). Además, en las plantas crecidas en CO₂ elevado disminuyó la abundancia de transcritos de tres de las cuatro CAs plastídicas incluidas en la plataforma, al igual que en plantas de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006) y arroz (Fukayama *et al.*, 2011), lo cual pudo disminuir la conductancia del mesófilo y dificultar la difusión del CO₂ al cloroplasto (Yu *et al.*, 2007). Estos resultados contrastan con el notable aumento del nivel de proteína de una CA plastídica observado en estudios previos con trigo duro en el campo (Aranjuelo *et al.*, 2011a), aun cuando a menudo existe escasez de paralelismo entre el nivel de proteína y expresión como se ha mostrado para otras enzimas (Scheible *et al.*, 1997b; Morcuende *et al.*, 1998). En plantas de guisante se ha encontrado una expresión coordinada de las CAs y la Rubisco que permitió el mantenimiento de una óptima razón CA:Rubisco para una fijación de C eficiente (Majeau & Coleman, 1994); un paralelismo en la expresión génica de ambas proteínas se ha observado en nuestro estudio. Asimismo, el CO₂ elevado condujo a un descenso de los niveles de transcritos de uno de los enzimas limitantes de la síntesis de los tetrapirroles y clorofilas, la GluTR (Papenbrock & Grimm, 2001; Tanaka & Tanaka, 2007), en asociación con el descenso de clorofilas observado en dichas condiciones (Tabla 6.1.1a).

La inducción de la expresión del gen que codifica la proteína de estrés térmico HSP90.1-A1 por el CO₂ elevado pudo mejorar la tolerancia a cambios en el ambiente. Puesto que se trata de una chaperona que facilita el ensamblaje y la estabilización de proteínas en situaciones de estrés ambiental (Wang *et al.*, 2011). En varios estudios con diferentes especies vegetales se han mostrado fuertes cambios en la expresión de factores de transcripción en respuesta a un enriquecimiento en CO₂ (Ainsworth *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Fukayama *et al.*, 2009). En nuestro experimento, el descenso

de transcritos para la subunidad B del factor de transcripción NF-Y (NF-YB3) inducido por el CO₂ alto pudo agravar la represión de genes fotosintéticos (Stephenson *et al.*, 2011).

La temperatura elevada disminuyó el contenido de nitrógeno y proteínas foliares, y la expresión de genes relacionados con la asimilación del carbono y nitrógeno, pero no inhibió la fotosíntesis gracias al aumento de la conductancia estomática

En la bibliografía, se describen efectos variables de las temperaturas moderadamente elevadas en la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2008a; Rosenthal *et al.*, 2014). En este estudio, aun a pesar del descenso de proteína Rubisco (Vu *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2011a), y de la actividad Rubisco inicial con las [CO₂] elevadas (Pérez *et al.*, 2011a) (Tabla 6.1.1a), el aumento moderado de temperatura no inhibió la fotosíntesis, posiblemente debido a un aumento de la conductancia estomática que pudo favorecer la fotosíntesis y el enfriamiento foliar (Long, 1991; Ainsworth & Ort, 2010; Pérez *et al.*, 2011a). Se ha observado una relación positiva entre la temperatura de la hoja y la transpiración en plantas de algodón y trigo (Law & Crafts Brandner, 1999), lo que podría explicar el descenso de temperatura al disminuir la transpiración con el aumento de la temperatura ambiental. En consecuencia, la mejora de la difusión del CO₂ y la reducción de la temperatura foliar pudo facilitar el mantenimiento de la razón entre la presión parcial de CO₂ y O₂, y favorecer la carboxilación de la Rubisco frente a la oxigenación (Makino & Mae, 1999), lo cual pudo compensar el descenso de Rubisco previamente descrito.

El menor contenido de proteína Rubisco cuando se elevó la temperatura se asoció con un descenso de transcritos de la subunidad pequeña, como se observó en Pérez *et al.* (2005), y de la subunidad grande del enzima, y se acompañó de un descenso de transcritos de otros genes que codifican proteínas del ciclo de Calvin-Benson y de la CTEF, tales como LHCI y D1 (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b, Fig. 6.1.3b). Estos resultados están en concordancia con la inactivación del PSII y, más intensamente, de la Rubisco con las temperaturas altas (Law & Crafts Brandner, 1999; Salvucci, 2008), aunque el estado de activación de la Rubisco y los niveles de transcritos para la RBA no variaron. La temperatura elevada no alteró el contenido de clorofilas en este estudio ni en otros anteriores (Gutiérrez *et al.*, 2009a), aunque los niveles de transcritos para la GluTR disminuyeron. Otros estudios han mostrado que el gen *HemA1* que codifica el enzima GluTR varió su patrón de expresión con la temperatura en plantas de pepino, cebada y Arabidopsis (Papenbrock & Grimm, 2001), además de estar sujeto a un control circadiano (Rüdiger & Grimm, 2006). En este estudio, la represión de la mayoría de los genes involucrados en la fotorrespiración (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b, Fig. 6.1.3b) contrasta con el aumento previsible de este proceso con las temperaturas altas (Long, 1991; Salvucci, 2008). Un estrés térmico con temperaturas superiores a los 45 °C, las cuales superan el rango de temperatura utilizado en nuestro estudio, disminuyó la fotorrespiración (Law & Crafts Brandner, 1999) y también la cantidad de proteínas involucradas en esta ruta (Xu & Huang, 2010). Por ello, se requieren investigaciones más exhaustivas para evaluar si el crecimiento a temperaturas moderadamente elevadas inhibe la fotorrespiración.

Por otro lado, el crecimiento a temperaturas 4 °C superiores a las ambientales disminuyó el contenido de proteínas solubles, aminoácidos y N foliar, además de la actividad NR máxima en plantas con N abundante y la selectiva en plantas crecidas a [CO₂] elevadas (Tabla 6.1.1a); en asociación con una

represión de genes que participan en la asimilación del N y el metabolismo de los aminoácidos (Tablas 6.1.2a y 6.1.2b, Fig. 6.1.3b). Estos resultados sugieren una inhibición de la asimilación del N y de la posterior biosíntesis de aminoácidos en las condiciones descritas. La temperatura alta indujo, en comparación con las plantas crecidas a temperaturas ambientales, una redistribución del N en la planta, con una mayor adscripción de N a la espiga en detrimento de la hoja bandera y del resto de la parte aérea de la planta (Tabla 6.1.1a). Lo cual sugiere que las temperaturas elevadas aceleraron el crecimiento y desarrollo de las plantas y la movilización de asimilados a la espiga (Ford *et al.*, 1976). En conformidad con esta temprana movilización, el contenido de aminoácidos y almidón disminuyó con la temperatura alta, mientras que el contenido de fructosa y glucosa, las cuales pueden derivar de la degradación de otros carbohidratos, aumentó. Junto con estos cambios, la expresión génica para proteínas de la síntesis de almidón y sacarosa, la glicólisis y el ciclo TCA fue disminuida a temperaturas elevadas. Además, la inducción de la expresión del gen que codifica la proteína de choque térmico HSP90.1-A1 se asoció con la temperatura alta, de acuerdo con estudios previos (Duan *et al.*, 2011), aunque el gen que codifica la HSP70 fue ligeramente reprimido. Un descenso del contenido de dicha proteína se ha encontrado en *Agrostis scabra* y *Agrostis stolonifera* a temperaturas 20 °C superiores al control (Xu & Huang, 2010). La abundancia de transcritos para la FNR fue también disminuida por la temperatura alta, en correlación con la expresión de la HSP70, que parece desempeñar un papel importante en el plegamiento de la FNR (Tsugeki & Nishimura, 1993; Mulo, 2011). El número de genes cuya expresión fue alterada por la temperatura elevada en combinación con el CO₂ elevado, CO₂ ambiente o N bajo fue comparativamente escaso.

Los resultados de este estudio indican que el CO₂ elevado y, en menor extensión, la temperatura elevada, disminuyeron el contenido de compuestos nitrogenados, incluida la proteína Rubisco, en asociación con una represión de genes involucrados en la fotosíntesis, la fotorrespiración, el metabolismo del N y, en parte, el metabolismo del C.

El CO₂ y temperatura elevados indujeron los cambios más severos en la asimilación del carbono y nitrógeno en las plantas con fertilización nitrogenada deficiente

La comparativa global de los parámetros analizados para los ocho tratamientos resultantes de la combinación CO₂ × temperatura × N mediante un heat map clusterizado (Fig. 6.1.3a) mostró que los tratamientos que combinan el CO₂ elevado con una fertilización nitrogenada deficiente (EFL y EIL) se separaron del grupo principal que conforman el resto de tratamientos. Esto parece indicar que el aumento de temperatura influye en menor medida en los cambios drásticos para los parámetros analizados. No obstante, entre ambos tratamientos hubo notables diferencias debidas a la temperatura, dado que la disminución de la mayoría de los parámetros analizados fue mayor con la temperatura elevada. Gran parte de los parámetros fisiológicos y bioquímicos y los niveles de transcritos para proteínas asociadas al metabolismo del C y N se agruparon en un gran cluster, y fueron reprimidos con [CO₂] elevadas en comparación con las ambientales y, en menor medida, con temperatura elevada en comparación con la ambiental. La disponibilidad de N moduló esta respuesta de forma variable, y fue más intensa la disminución de los parámetros en plantas con una menor disponibilidad de N crecidas a [CO₂] elevadas que en aquellas mantenidas a [CO₂] ambientales. Una pequeña fracción de parámetros se agruparon en un cluster diferente al que contenía el resto de parámetros. Este cluster englobaba principalmente parámetros del metabolismo de los carbohidratos (parte superior de la Fig. 6.1.3a), tales como el contenido de fructosa, glucosa, almidón y fructanos, y transcritos relacionados con la síntesis de fructanos, las FTs y el TF involucrado en su activación, MYB13-1 (Xue *et al.*, 2011). Junto

al estado de activación de la Rubisco y transcritos para la GS1, que es la GS citosólica que está involucrada en procesos catabólicos (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Los valores de estos parámetros aumentaron con la disponibilidad de N baja y la [CO₂] elevada.

El tratamiento EFL ([CO₂] y temperatura elevados con una fertilización nitrogenada deficiente) fue el que mostró menores semejanzas con el resto y quedó fuera de cualquier cluster (Fig. 6.1.3a). Comparado con las plantas que crecen a [CO₂] y temperatura ambientales con una fertilización nitrogenada abundante (AIH, tratamiento control) pudo comprobarse que el patrón de cambios fue similar al inducido por el CO₂ elevado con N bajo previamente descrito (Tablas 6.1.1a, 6.1.2a y 6.1.2b). Estos resultados indican que la contribución de las temperaturas superiores a las ambientales a dichas alteraciones fueron pequeñas. Sin embargo, la magnitud de los cambios en la distribución de N dentro de la planta y la actividad NR selectiva fue mayor con la temperatura elevada (Tabla 6.1.1a). El tratamiento EFL, que simula las condiciones ambientales futuras según previsiones del IPCC para finales del siglo XXI, condujo, en comparación con AIH, a un fuerte descenso de la capacidad fotosintética. Este fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en CO₂ elevado ha sido frecuentemente observado en estudios previos con trigo de primavera cultivado en el campo (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2011a) y trigo duro (Aranjuelo *et al.*, 2011a). Esta pérdida de capacidad fotosintética se asoció con una reducción del contenido de proteína Rubisco, del estado nitrogenado de la planta y de la expresión génica para proteínas fotosintéticas (Tabla 6.1.1a, Fig. 6.1.3b). Una represión de varios genes fotosintéticos inducida por el CO₂ elevado se ha encontrado en plantas de trigo en el campo (Nie *et al.*, 1995a), al igual que un descenso de transcritos para la subunidad pequeña de la Rubisco en plantas crecidas a [CO₂] y temperatura elevados con un aporte de N bajo (Pérez *et al.*, 2005). En el presente trabajo, la represión de genes fotosintéticos en el tratamiento EFL con respecto a AIH fue generalizada (Tabla 6.1.2b, Fig 6.1.3b) y más severa que en cualquier otro tratamiento. Particularmente, los genes asociados a las proteínas cosechadoras de la luz de ambos fotosistemas, la GluTR, la Rubisco y la proteína de ensamblaje cpn60, varias CAs, junto a otros genes del ciclo de Calvin-Benson y de la respiración. Estos resultados contrastan con estudios previos con otras especies vegetales que han mostrado una inducción de los genes que participan en la respiración (Ainsworth *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2013), como se ha mencionado con anterioridad.

Las futuras condiciones ambientales promoverán una gran acumulación de carbohidratos, especialmente fructanos, en correlación con la inducción de la expresión de los genes que codifican proteínas necesarias para su síntesis (Tablas 6.1.1a, 6.1.2a y 6.1.2b), y del TF involucrado en la activación de las FTs, el MYB13-1 (Xue *et al.*, 2011), junto a la represión de aquellos relacionados con la degradación de dichos carbohidratos. A la pérdida de N foliar pudo contribuir la represión de genes del metabolismo del N (Tabla 6.1.2b, Fig 6.1.3b), como la NR, la NiR, la GS2 y la AS. Además, el descenso del estado nitrogenado de las plantas pudo acentuarse con la aceleración del desarrollo inducido por las temperaturas elevadas, lo cual pudo promover la degradación de proteínas y la removilización del N, en correlación con el aumento de la abundancia de transcritos para el gen *GS1a* (Sailo *et al.*, 2013), a fin de facilitar la exportación y la provisión de N para el desarrollo del grano.

Una red de correlación que engloba una amplia variedad de parámetros y condiciones experimentales revela la elevada correulación existente en el metabolismo primario de las plantas

Este estudio mostró que los genes que codifican los principales enzimas involucrados en la reducción del NO_3^- a NH_4^+ y la posterior asimilación en compuestos orgánicos nitrogenados, NR, NiR y NADH-GOGAT, se coexpresaron (Fig. 6.1.4b). Además, los niveles de transcritos de estos genes se correlacionaron positivamente con la actividad del enzima clave del metabolismo del N, la NR. A su vez, la actividad NR se correlacionó con el contenido de aminoácidos. Estos resultados indican la elevada coordinación existente entre todos los componentes del metabolismo del N, tanto a nivel de la expresión génica como de la actividad enzimática y los productos metabólicos, en conformidad con estudios previos (Scheible *et al.*, 1997a; Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004). Por otro lado, la actividad NR se correlacionó positivamente con algunos genes fotosintéticos (Fig. 6.1.4b). Varios genes que codifican proteínas de la respiración, como la PK y la CS, se coexpresaron con otros del metabolismo del N. Esto demuestra que la provisión de esqueletos carbonados para la síntesis de compuestos nitrogenados puede estar correlacionada a nivel transcripcional con la asimilación del N. En la red (Fig. 6.1.4b) se observó que el gen que codifica Dof1 se coexpresó con genes del metabolismo del N, de acuerdo con estudios previos con trigo (Kumar *et al.*, 2009), junto a algunos genes que codifican proteínas del metabolismo del C, tales como Rubisco, FPBasa plastídica, SBPasa y AGPasa. Mientras que otro TF, el NF-YB3, se correlacionó con la actividad NR y con la expresión de ciertos genes fotosintéticos. Particularmente, aquellos que codifican la GluTR y el LHCII, los cuales pueden estar regulados por NF-YB3 (Stephenson *et al.*, 2011). Por tanto, se corrobora la estrecha interrelación existente entre el metabolismo del C y N (Stitt & Krapp, 1999; Fernie *et al.*, 2004; Nunes-Nesi *et al.*, 2010).

No sólo en la red de correlación (Fig. 6.1.4b), sino en todos los experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral, se ha observado que el contenido de fructanos está altamente relacionado con los niveles de transcritos para las FTs, como se ha mostrado durante la hibernación de trigo de invierno (Kawakami & Yoshida, 2002; Kawakami & Yoshida, 2005), e incluso con la actividad enzimática de las FTs en condiciones de sequía (Goggin & Setter, 2004). Por lo general, el contenido de ciertos carbohidratos se correlacionó negativamente con otros parámetros involucrados en el metabolismo del N. Principalmente, una acumulación de fructanos se asoció con una menor actividad NR y un descenso de compuestos nitrogenados, como los contenidos de clorofilas y aminoácidos. La acumulación de fructosa, glucosa y sacarosa también redujo, en menor medida, los niveles de transcritos de genes involucrados en la fotosíntesis, el metabolismo del N y la actividad NR. Estos resultados sugieren que la acumulación de carbohidratos puede inhibir la fotosíntesis y la asimilación del N, bien directa o indirectamente, como estrategia para adaptar su estado metabólico a las necesidades de la planta.

La concentración de N foliar resultó determinante para el contenido de proteínas solubles en la hoja, incluida la Rubisco, que constituye una reserva importante de N (Evans, 1983; Suzuki *et al.*, 2009). La cantidad de proteína Rubisco, su actividad y los niveles de transcritos de los genes que la codifican, se correlacionaron positivamente con un grupo amplio de genes, mayoritariamente involucrados en la fotosíntesis y algunos en la respiración. Esto refuerza la importancia de la Rubisco como la proteína más abundante que desempeña un papel clave para las plantas y su aumento o descenso puede afectar notablemente al resto de componentes del aparato fotosintético. Las CAs se correlacionaron

positivamente con los genes de la Rubisco, probablemente relacionado con la función en la difusión del CO₂ en la célula de las primeras para garantizar una eficiente carboxilación del enzima (Majeau & Coleman, 1994). Dado que las funciones atribuidas a las CAs son amplias (Moroney *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2007), los genes que las codifican se coexpresaron con genes de rutas diversas.

La red de correlación puede ser también una herramienta útil para la identificación de factores clave en la regulación del metabolismo primario de las plantas, atendiendo al número de correlaciones que un parámetro presenta con los demás (Moyano *et al.*, 2015). De este modo, los transcritos de los genes del metabolismo del C y N presentaron el mayor porcentaje de correlaciones, en parte porque son los más sensibles a cualquier estímulo ambiental que modulan el metabolismo e influyen en los programas de desarrollo para el mantenimiento de la homeostasis de la planta (Cañas *et al.*, 2015), y porque representan el pool mayoritario de parámetros incorporados en la red. Así, destacaron los transcritos de los genes que codifican la AGPasa, la FNR, la proteína de Rieske del Cytb₆f, la RBA, la SHMT, la proteína CP12 y el transportador NRT1.1A (Fig. 6.1.4c); sin duda, todos ellos con diferente cometido en el metabolismo primario de las plantas.

En resumen, la red de correlación ha permitido identificar la interconexión entre la respuesta metabólica y los mecanismos de regulación subyacentes. Se muestran evidencias de que muchos de los genes del metabolismo primario del C y N se encuentran coexpresados, lo que demuestra la estrecha coordinación existente entre ambos metabolismos en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta en respuesta al ambiente. Además, se pone de manifiesto que la acumulación de ciertos metabolitos puede influir en la expresión de genes de su síntesis o de otras rutas de interconexión. Finalmente, el análisis de estas redes puede facilitar la identificación de genes claves en el control de la expresión de otros muchos genes, los cuales podrían ser dianas para la mejora genética frente a diferentes estreses abióticos.

CAPÍTULO 7: Conclusiones - Conclusions



Primera.- La plataforma desarrollada para estudios de expresión génica del metabolismo del carbono y nitrógeno por qRT-PCR en trigo duro permite la visualización de la abundancia de transcritos del metabolismo primario por rutas metabólicas. Constituye una herramienta pionera para esta especie vegetal que puede ser extrapolable a la investigación de otros factores abióticos.

Segunda.- Se ha seleccionado el gen que codifica el factor de ribosilación-ADP para la correcta normalización de los resultados de expresión génica por su elevada estabilidad, aunque pueden también utilizarse aquellos que codifican el inhibidor ARNasa L y la ubiquitina.

Tercera.- Aun a pesar de la estimulación de la fotosíntesis con el CO₂ elevado, cuando el nitrógeno se suministró en proporción directa al desarrollo del trigo, la biomasa de las plantas no sólo no aumentó sino que disminuyó con una mayor abundancia de nitrógeno. Cuando se limitó aún más la disponibilidad de dicho nutriente, el enriquecimiento en CO₂ aumentó la biomasa de las plantas con deficiencia, pero no con abundancia de nitrógeno, debido posiblemente a un incremento de los exudados de la raíz.

Cuarta.- El crecimiento en CO₂ elevado no alteró la absorción de nitrato por unidad de masa de raíz en las plantas de trigo con independencia de la disponibilidad de nitrógeno en la solución nutritiva, el estadio del desarrollo y el periodo de incubación, a excepción del descenso inducido en las plantas con nitrógeno subóptimo en el inicio del llenado del grano que no se acompañó de una pérdida de capacidad fotosintética.

Quinta.- La mayor adscripción de nitrógeno a la parte aérea, en especial a la hoja bandera, inducida por el CO₂ elevado en plantas con nitrógeno subóptimo condujo a una mejora del estado nitrogenado foliar, acompañado de un aumento de la expresión de genes fotosintéticos y de la asimilación del nitrógeno, así como de la actividad y proteína Rubisco y del contenido de aminoácidos y proteínas que pudo aliviar la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en la antesis.

Sexta.- En el inicio del llenado del grano, la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en plantas con nitrógeno supraóptimo se asoció con una pérdida de Rubisco y una restricción del transporte electrónico fotosintético junto a una inhibición de la asimilación del nitrógeno, como consecuencia posiblemente de una mayor exportación del nitrógeno a la espiga. Mientras que en plantas con nitrógeno subóptimo la aclimatación no tuvo lugar por la mejora del estado nitrogenado antes indicada.

Séptima.- Cuando se acentuó la deficiencia de nitrógeno en las plantas de trigo duro, tanto por la frecuencia de renovación como por la concentración en la solución nutritiva, el CO₂ elevado condujo a una pérdida de capacidad fotosintética, a un descenso de la eficiencia operativa del PSII y a una represión de genes involucrados en la asimilación del nitrógeno. Estos cambios se acompañaron de un descenso de energía y poder reductor, del contenido de ribulosa-1,5-bisfosfato y compuestos nitrogenados, además de la acumulación de carbohidratos, todo lo cual parece indicar una limitación de la fotosíntesis por la Rubisco y la regeneración de ribulosa-1,5-bisfosfato.

Octava.- En las plantas con un óptimo suministro de nitrógeno, a diferencia de aquellas con deficiencia en dicho nutriente, la aclimatación de la fotosíntesis no tuvo lugar muy posiblemente porque no se inhibió la asimilación del nitrógeno y no se redujo el contenido de nitrógeno orgánico

foliar, a la vez que se indujeron fuertemente los genes del metabolismo del nitrógeno en la raíz, lo cual pudo atenuar el efecto del CO₂ elevado.

Novena.- En trigo duro cultivado en el campo, la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado condujo a una pérdida de compuestos nitrogenados, en especial Rubisco, que se asoció con una represión de genes involucrados en la fotosíntesis y la asimilación del nitrógeno, que fue más acentuada en plantas deficientes en nitrógeno. Un patrón de cambios similar se observó con las temperaturas altas, aunque la fotosíntesis no se inhibió. En el futuro escenario de cambio climático, el grado de inhibición de la asimilación del carbono y del nitrógeno dependerá de la disponibilidad de nitrógeno.

Décima.- Tanto en trigo cultivado hidropónicamente como en el campo, el contenido de intermediarios de la glicólisis y del ciclo de los ácidos tricarbónicos y/o los niveles de transcritos de genes que codifican proteínas que participan en rutas respiratorias, mostraron que el CO₂ elevado no aumentó el catabolismo de carbohidratos y, por ende, la respiración, lo cual limitaría el flujo de energía y esqueletos carbonados para la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados, particularmente en las plantas deficientes en nitrógeno.

Undécima.- Las redes de correlación entre genes y parámetros bioquímicos y fisiológicos revelaron una estrecha coordinación entre el metabolismo del carbono y nitrógeno, tanto a nivel bioquímico como transcripcional, en las condiciones ambientales de simulación de Cambio Climático. Revelaron también una elevada coordinación de todos los procesos que intervienen en el metabolismo del nitrógeno, desde la absorción hasta la asimilación en compuestos orgánicos nitrogenados.

First.- The qRT-PCR platform developed for the expression analysis of carbon and nitrogen metabolism-related genes in durum wheat provides an overview of the abundance of transcripts of primary metabolism ordered by pathways. It is a pioneering tool for this plant species which can be used to study plant responses to other relevant abiotic stress factors.

Second.- The ADP-ribosylation factor had strong expression stability and was selected for the accurate normalization of the gene expression data, although other stably expressed genes as those encoding RNase L inhibitor-like protein and ubiquitin could also be used.

Third.- Despite the photosynthetic stimulation at elevated CO₂ when nitrogen was supplied in direct proportion to wheat growth, the plant biomass not only did not increase, but decreased with higher nitrogen abundance. When nutrient availability was more restricted, CO₂ enrichment increased the biomass accumulation in plants with deficiency, but not with abundance of nitrogen, probably associated with an increased root exudation.

Fourth.- Growth at elevated CO₂ did not affect the uptake of nitrate per unit root dry mass of wheat plants, irrespective of nitrogen availability in the nutrient solution, growth stage or incubation period, with the exception of the decline induced in plants with suboptimal nitrogen supply at early grain filling, which was not accompanied by a loss of photosynthetic capacity.

Fifth.- Increased nitrogen allocation to shoot, specially to flag leaves, by elevated CO₂ in plants with suboptimal nitrogen supply led to an improvement of leaf nitrogen status, which was accompanied by an increase of photosynthetic and nitrogen assimilation gene expression, Rubisco protein content and activity and amino acid and protein contents, which could alleviate photosynthetic acclimation to CO₂ enrichment at anthesis.

Sixth.- At early grain filling, photosynthetic acclimation to elevated CO₂ in plants with superoptimal nitrogen supply was associated with a loss of Rubisco protein and a limitation in photosynthetic electron transport, together with an inhibition of nitrogen assimilation, probably due to a higher nitrogen remobilization to the ear. While in plants with suboptimal nitrogen supply, photosynthetic acclimation was not observed because of the improved nitrogen status previously mentioned.

Seventh.- When nitrogen availability was more restricted in durum wheat plants by reducing frequency of renewal as well as concentration of the nutrient solution, elevated CO₂ reduced photosynthetic capacity, photosystem II operating efficiency and repressed genes for nitrogen assimilation with nitrogen deficiency. These changes were complemented with a decrease of energy and reducing power, and the content of ribulose-1,5-bisphosphate and nitrogen compounds, in addition to an accumulation of carbohydrates, indicating that photosynthesis was limited by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation and regeneration.

Eighth.- In plants with an optimum nitrogen supply, in contrast to those with a deficiency in this nutrient, the photosynthetic acclimation did not occur probably because nitrogen assimilation was not inhibited and leaf organic nitrogen content was not reduced, concurrently with a strong up-regulation of nitrogen metabolism genes in the root, which could have mitigated the effect of elevated CO₂.

Ninth.- In durum wheat plants grown in the field, photosynthetic acclimation to elevated CO₂ was driven by a reduction in the concentration of nitrogen compounds, particularly Rubisco, and the repression of genes for nitrogen assimilation and photosynthesis, which was significantly more pronounced in nitrogen deficient plants. A similar pattern of changes was observed with high temperatures, although photosynthesis was not inhibited. Under future Climate Change scenario, the extent to which carbon and nitrogen assimilation can be reduced depends upon nitrogen availability.

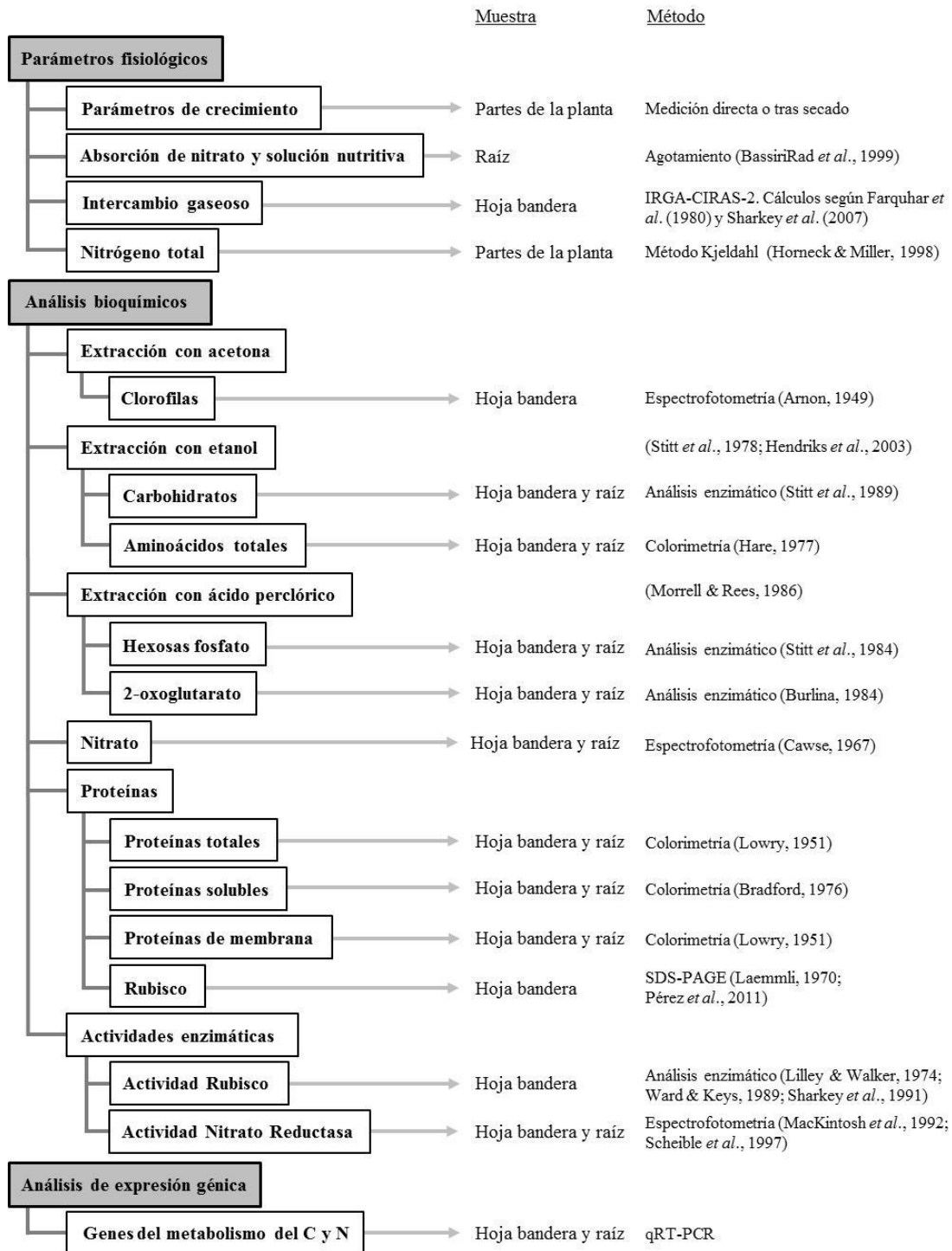
Tenth.- In wheat grown both in hydroponic cultures or in the field, the content of glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates and/or the levels of transcripts for genes encoding proteins involved in respiratory pathways, showed that elevated CO₂ did not increase carbohydrate catabolism and, therefore, respiration, which could have limited the provision of energy and carbon skeletons to the synthesis of organic nitrogen compounds, particularly in plants with nitrogen deficiency.

Eleventh.- The correlation network of genes and physiological and biochemical parameters revealed high co-regulation of carbon and nitrogen metabolisms, at both biochemical and transcriptional level, under the environmental conditions anticipated for Climate Change. Additionally, there was a tight coordination of all processes involved in N metabolism, from uptake to assimilation into organic nitrogen compounds.

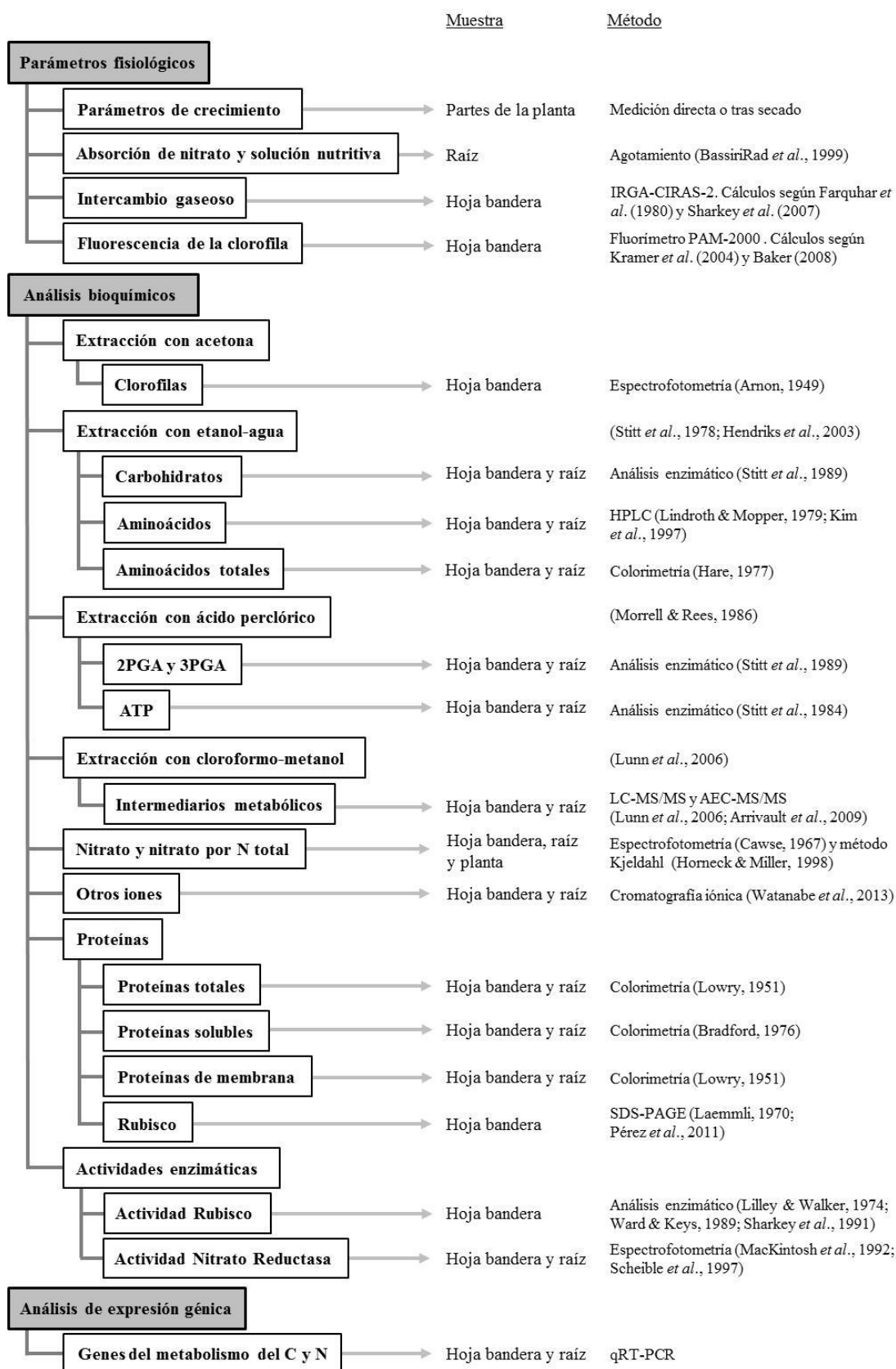
CAPÍTULO 8: Anexos



Anexo 1. Esquema de los parámetros analizados en el experimento 1.



Anexo 2. Esquema de los parámetros analizados en el experimento 2.



Anexo 3A. Primers diseñados y validados para los genes seleccionados del metabolismo del C y N en trigo duro.

Primer forward, F; primer reverse, R.

Nº acceso	Identificación	Secuencia 5'→3' (Forward, F; Reverse, R)	Producto (pb)
FJ797425	Probable proteína cosechadora de luz asociada a clorofilas del fotosistema I, LHCI	F CTTCGAGCGGTTCAAGGAGT R CTTCACCCAGTTGCCAGTC	106
AJ635207	Probable proteína cosechadora de luz asociada a clorofilas del fotosistema II, LHCI	F GCGCTTGGTTGTGTCTTCCCG R CTGAGAGCCAGCCATGAACCAGAC	84
TC432721	Probable apoproteína A1 de P700 del fotosistema I (87% similar a L36246 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PsaA	F AAGCCGTCCTCCAAATTGGCCT R TGAATTTGGTGCCCGCCCA	109
TC368668	Probable apoproteína A2 de P700 del fotosistema I (97% similar a DQ507383 de <i>Oryza sativa</i>), PsaB	F TGTGTGCTATCCCGCATCCAGGGG R TGACCCGTCAAAGGGGTCCCAA	99
M21352	Proteína D1 del fotosistema II (<i>psbA</i>)	F AGTACAAGCCTGTGGGGTCCGCT R AGGGGCAGCGATGAAGGGGATA	141
EU492899	Proteína D2 del fotosistema II (<i>psbD</i>)	F GGATGACTGGTTACGAAGGGACCGT R CCCTGTAAACCAACCCCTAAAGCG	100
AY123422	Proteína ferrosulfurada de Rieske del complejo citocromo b ₆ f	F AATAAGCGACGCAAGCTCCGGC R TGTAGCAGCGTCTTAGGACTGGCA	81
BE216924	Plastocianina, PC	F AACGACTTCAGCGTCAAGGCCG R AACACCACGTTGTGCGGGAACC	74
X75089	Ferredoxina (<i>petF</i>), Fd	F GCAAGTTGGTGTCCGGCGAGAT R ATGTCGGACTTGGGGTAGGCGT	109
AJ457980	Ferredoxina-NADP reductasa (<i>pfnrII</i>), FNR	F GATCCAGTCGATCCCGTCTTTGGC R GGAGGAGCTCTGGGAGATGCTCAA	127
M16843	Subunidad β de la ATP sintasa del cloroplasto, ATPasa	F CCCTGCCCTGCCACAACATTT R GTTGCCAACGATCCGAGGCTGT	139
X74545	Subunidad β de la ATP sintasa de la mitocondria, ATPasa	F AACAGCATCCGCCTCGTGCT R ACAGTGATGGGGGATCCGGTGT	131
EF105343	Subunidad B1 de la ATP sintasa de la vacuola, ATPasa	F ACATTGCTCCGCATCTTCCCTCG R AGAACGCGTCCAAGGTCCTTCGC	67
AB678199	Glutamyl-tARN reductasa (<i>hemA1</i>), GluTR	F CCATGGGCGGTGTTCGGCTTTT R ACTTCGGATAGACAGGCGCCGA	70
AY328025	Subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (<i>rbcL</i>), Rubisco	F GGCTGCAGTAGCTGCCAATCT R TCCCCAGCAACAGGCTCGATGT	117
AB020957	Subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (<i>rbcS</i>), Rubisco	F AGCCTCAGCAGCGTCAGCAAT R CGTGGATAGGGGTGGCAGGTAAGA	108
AJ635203	Rubisco activasa (<i>rba1</i>), RBA	F AAGCTTGTGAACCTCGGGGACG R CTCGACTGTACTTTGGCTGCTCA	60
X07851	Subunidad α de la chaperona de ensamblaje de las subunidades de Rubisco, cpn60	F TGCTGGATGAGTATGGCAACCCAA R TCAGAGCTGCACCCGCAATTTTC	102
BE213258	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	F CGACCGATGTGGATCCATTGCCA R ATCCCGCATCCAGTCGTGGAA	65
TC389217	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	F GGTGGCGGTCACTACGACTTC R AAACAACGAGTACGCACTCCCATG	173
TC393400	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	F GCAGAACCTCCTGACCTACCCGTT R GAAGTCGTAATGACCGCGACAG	82
TC442386	Probable anhidrasa carbónica, plastídica, CA	F TGGAGTAAAGTTGGACACAGCGAA R CTGGCCGCCATTTACGATTCTAG	126
DQ290746	Fosfoglicerato quinasa (<i>pgk1</i>), plastídica, PGK	F AACAGCCACAGAGCACATGCC R ATGGCAGCGAATGGGCGCTT	138
TC379293	Probable gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, plastídica (72% similar a M64114 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), GAPDH	F TACACCCACGCCGACACCATCA R TAGCCTCTGGTCGCCGGTGTAT	144
TC389847	Probable triosa fosfato isomerasa, plastídica (72% similar a AY087893 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), TPI	F TTGCGTATGAGCCTGTGTGGGC R AACCAATCACGGACAGCGGCA	91
FJ625793	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, plastídica, FBA	F AGGCGTGTCAAAGAAGAGGGTAGCA R TGAGGAGAGTAGCAGACGCCATTGT	72
X07780	Fructosa-1,6-bisfosfatasa, plastídica, FBPa	F TACATCGTGGTGTTCGACCCGC R CGTCACTTCGTCAAAGGGTTGCGT	135
TC370604	Probable transquetolasa, plastídica (77% similar a AY133860 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), TK	F ATCGGCATCGACAAGTTCCGGCG R TTGGCTGCGGGCATGACGTT	92
X65540	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, SBPa	F AGTACTCCATGTGTGCAAGTACGC R TTCCCACGGTGAAGTTGGTGTC	145
TC374908	Probable ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, plastídica (85% similar a AF047444 de <i>Oryza sativa</i>), RPE	F CAATCTGGTTTTGGTGGGCAGAGT R TCGATCCAGGGTTCACTCCCTTC	102
TC405712	Probable ribosa-5-fosfato isomerasa, plastídica (68% similar a AY045785 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), RPI	F CGGACGGACGCATGTTTCTGCT R TGCGTGAAGCCAAGGGCACA	105
X51608	Fosforribulokinasa/ribulosa-5-fosfato quinasa, plastídica, PRK	F CGGGCAAGGAGATTGACGCTTTGG R ACCTGACACCGTCTGATCCAGCAA	100
BE216942	Probable proteína CP12	F GGCAAGGAGATTGCGGCTTTGGA R CACCGACAACAGGTAGCTGACCCA	141
TC410105	Probable ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, citosólica (80% similar a AF189365 de <i>Oryza sativa</i>), RPE	F AAGGGGAGAAGAGCAGCTCCCAAG R TTGGGATGGTGGTGCATGGGGA	101
TC391593	Probable ribosa-5-fosfato isomerasa, citosólica (65% similar a AY054172 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), RPI	F GAACACTGCAAGGAGAACCCTC R CTATCCGCCGTCAGAACAAA	89
TC391192	Probable fosfoglicolato fosfatasa (75% similar a AY094446 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PGLP	F AGGCCAAAAGGGTTGGTGT R TCTTCTCGTTGACACTGAGC	101
BE216989	Probable glicolato oxidasa, GO	F CAACGCCCTAGAAGAAGCCGCA R GCCAAAGCAGCCCTAAAGCGT	94
D86327	Catalasa (<i>cat1</i>), CAT	F TGACCGTTCCCTCCGTTCCGCAT R TTGTCGTTGTCCAGACGGGCG	109

Nº acceso	Identificación		Secuencia 5'→3' (Forward, F; Reverse, R)	Producto (pb)
TC405186	Probable glutamato:glioxilato aminotransferasa (74% similar a AF479639 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), GGAT	F	TCGGCCAGAAGCCACTCACCTT	70
		R	TCATCGAGCAGGAAGGGAGCCT	
TC416357	Probable serina:glioxilato aminotransferasa (71% similar a AB048945 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), SGAT	F	TGGAAGCGGTACAACCTCAG	135
		R	CTTGAGCACCATCTCCACCC	
AJ635205	Probable subunidad P del complejo glicina descarboxilasa (<i>gly1</i>), gdcP	F	ACGTGTACGGGGATCGCAACCT	65
		R	AGCTTCTCTGCCACCTGGGAT	
AY123417	Probable subunidad H del complejo glicina descarboxilasa, gdcH	F	ACCGAGCCACATCCCCTACAA	149
		R	TGGCGCCGCTGCTTGAATCT	
DQ862827	Serina hidroximetiltransferasa, predicción mitocondrial, SHMT	F	GCCAGAAACGTGCTTTGGAGGC	90
		R	GGAAAGTTGGCAGGTGAACCCGA	
TC391765	Probable hidroxipiruvato reductasa, peroxisomal (74% similar a AY099552 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), HPR1	F	GCTCGCTGCTTGAACGTGCTT	148
		R	AGATGCGAGGCCGAGTTGCTTG	
TC394252	Probable glicerato quinasa (69% similar a AF360156 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), GLYK	F	ACCATGCGTATTTGCCACGCT	64
		R	AGCAGATGGTCTTCTTCGCGCC	
JQ673331	Pirofosfatasa inorgánica (<i>IPPI-1</i>)	F	CTATGGCTTCATCCACGCACACTC	65
		R	GCATCAGGACAAGGACATCCATCGG	
AJ319659	ADP-glucosa pirofosfatasa, AGPPasa	F	CATGGCCAACGCAATGTGTCTCC	65
		R	CCATGGCGGAGAAGGGCATGAT	
DQ406820	Subunidad grande de la ADP-glucosa pirofosforilasa, plastídica, AGPasa	F	GGTCCAACGTACACCTCAA	78
		R	CTGGTCGCCTCTTCCATGT	
AF492644	Subunidad pequeña de la ADP-glucosa pirofosforilasa, plastídica, AGPasa	F	CCGGAGATCACCTGTACCGA	109
		R	GTCGCACGTCTCCATCCAT	
AJ635204	Probable almidón sintasa, isoforma SSI	F	ACGAGCAGATCTCCGAATGGGC	86
		R	AAGGAGACTGCCGCTTCGACCT	
AF258608	Almidón sintasa, isoforma SSIII	F	AGCGGACTCGTCGAAAATGCT	61
		R	ATCCGCCACATCCACTTCCCA	
AY044844	Almidón sintasa, isoforma SSIV	F	GGCGCCGACCCCTTTATAACAA	66
		R	TTCAGCGGAAACCGACGCTT	
AJ301647	Isoamilasa 1 (<i>isol</i>), ISO1	F	CACCTACCGGCCGCTTGTGA	88
		R	AGTCGTATGGTGCTGGCTTG	
JN412069	Isoamilasa 3 (<i>iso3</i>), ISO3	F	GGTGGCTGAATGGAATGGA	83
		R	TGCCAACACCCCTTCATAC	
AF314182	Translocador de triosas fosfato/fosfato (<i>tpt1</i>), TPT	F	CGGCAATCACCACCGGCTTCTT	148
		R	AGGAGGCAGTACACAACCTCCACA	
AF548741	Translocador de glucosa-6-fosfato/fosfato, GPT	F	CCTCACACGGCTAGATGACC	113
		R	ACACCTCAGCCTTTGACTCC	
TC374000	Probable fructosa-1,6-bisfosfatasa, citosólica (83% similar a AB007193 de <i>Oryza sativa</i>), FBPasa	F	GCTAAGCGAACGAGAGGGAGGGTAG	69
		R	TGTCGCGCCGCTGATCCATCTT	
TC380863	Probable nucleósido bisfosfato quinasa 1, citosólica (76% similar a D16292 de <i>Oryza sativa</i>), NDK	F	CGCAGCAGCACTATGCCGATCT	126
		R	TCCTGCGGCCAGTCAAGACAAC	
BT009219	Probable UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (95% similar a X91347 de <i>Hordeum vulgare</i>), UGPasa	F	CGTGTGCATCTGTCTGGGGTGT	103
		R	TGGCACGCCCCAGGAAGAACAAG	
AF310160	Sacarosa-fosfato sintasa (<i>SPS1</i>), SPS	F	AGAAGGCTCTGCCTCCCATTTGGTC	70
		R	AGGATCATCGGCTTGTGCGGGTT	
AF321556	Sacarosa-fosfato fosfatasa (<i>SPP1</i>), SPP	F	GCGCACGGGAAGGAGTTTTTCTTCT	144
		R	GACCTCCGTAGACATCATCCAGCCC	
AJ001117	Sacarosa sintasa (<i>Sus1</i>), SUS	F	GTATGTTTACCAGGGCAAGGGCA	61
		R	GGCGTCAAACCTCAGCAAGCAGC	
AM295169	Invertasa alcalina, predicción citosólica (<i>AINV</i>)	F	CCCCCTTGTAATGAGGCATGGGA	70
		R	ACCCACAGGTTGGCCACGAAAATG	
EU981912	Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (<i>I-SST</i>), 1-SST	F	TACGCGTCCAAGTCTTCTACGACC	143
		R	CGTCAAGCTCCACTGTCTCGGAAT	
EU981911	Sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (<i>6-SFT</i>), 6-SFT	F	CCAAGCGGGCTGATGTGGTGAA	147
		R	ACTGAGTTCCGGTGGCGTTGAGG	
AB088409	Fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (<i>I-FFT-A</i>), 1-FFT	F	CCCTTCGGCATTCTGTCTCT	83
		R	CCATCCAGTCCCTTGGACAC	
AB088410	Fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (<i>I-FFT-B</i>), 1-FFT	F	AAGAACGACACGGACCACTC	78
		R	CCCCGGTATCAACTCGTAGC	
AJ564996	Fructano 1-exohidrolasa (<i>1-FEH w3</i>), 1-FEH	F	ACGTAACAGCCTCTTCTCCCA	75
		R	ACAAGGATCTGCCTCTCCATCGC	
AB089269	Fructano 6&1-exohidrolasa, 6&1-FEH	F	TAGCAGTTGGTGCTGAGGTG	93
		R	ACAGCGGGCGTTCAATTCTA	
AB089270	6-kestotriosa exohidrolasa, 6-KEH	F	CCCACCTCACCTACTACCTGTAGCC	127
		R	AGAAGATACACGCGAGGCCACCA	
JQ073560	Trehalosa-6-fosfato sintasa, TPS	F	CTTCTCTCTGGCTTGACACA	76
		R	CTACGAGTACGTTGCCTCCC	
AK331310	Probable trehalasa (85% similar a AK108163 de <i>Oryza sativa</i>), TRE	F	GGCCTTGTGAGGAGAGCATT	128
		R	CACATGGCCTGGTAACGACT	
AB158407	Probable celulosa sintasa (<i>CesA</i>), CESA	F	AGCAGACGTGCTCCCTTTCCCT	136
		R	TGGGAATTGCACCCTTGCTCTGC	
AF030421	Invertasa de pared celular (<i>IVR3</i>), cwINV	F	AGGGCCACATTTACGCTTT	95
		R	TCCACATTCACTTGTGCCTTCT	
AY974231	Hexoquinasa , HXK	F	CGGGGATGAGCATGGGCTGTTTT	85
		R	CTCCTTTCCTCAAGCTGAACCCG	
BQ606334	Probable fosfoglucomutasa, plastídica (70% similar a AJ242601 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PGM	F	AAGCTTGTTACGGTTGAGGACAT	119
		R	ATAGCCATCAGTTCCTTGGCAG	
AJ313311	Fosfoglucomutasa, citosólica, PGM	F	ACTGGTTGATCGGATGGGCTTGGG	63
		R	GCGGCACAAAATTCAGGGGGTT	
AK333308	Probable fosfoglucomutasa, plastídica, PGI	F	CCGACCTGTGGAATTGAT	111
		R	GACCATCCGGGTTTCAGGT	
DQ456872	Fosfoglucomutasa, citosólica, PGI	F	CGCCGTTAGGGTTCATGCAGAAAACA	84
		R	ACATTGCTATGCAAGCGGCGCA	

Nº acceso	Identificación	Secuencia 5'→3' (Forward, F; Reverse, R)	Producto (pb)
AY130765	Pirofosfato fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, PFP	F ATTGGCGGGGATGGAACAAT R AGTCTGAAACCCAAACGCCT	144
TC391986	Probable 6-fosfofructoquinasa (72% similar a NM_124155 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), PFK	F GATTCCCCGGACTGATGACC R TCCACCATCTACCCAGCTCA	104
AK333335	Probable fructosa-2,6-bisfosfatasa/6-fosfofructo-2-quinasa (91% similar a AF456329 de <i>Oryza sativa</i>), F2KP	F ACCCACTCATGCGACCGAGGAT R AGTTGGTGGTGCAGTTGGCGT	91
AJ420778	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, citosólica, FBA	F CACAGCTCTCCATCGACCAG R CGATCTCGGTGACGTAAGCA	147
AJ278243	Triosa fosfato isomerasa, citosólica, TPI	F TCGTCGCGGCAACTGAAA R TAGGGCGGGCTAACGACAACCT	121
FN429985	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica, GAPC	F TTGATGGTCCCTCGAGCAAGGACT R CCGGTAAGCTTGCCATTACAGCTCAG	127
AF521191	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica (no fosforilante), GAPN	F GATGCCTGCATTGTGCTGGAGGA R GTGTCGGCAACCGCTTCCATGA	134
X15232	Fosfoglicerato quinasa (<i>pgk2</i>), citosólica, PGK	F CCAAGCCCATCGCCACTCCAAT R CGCACGAAACACCTTCTTCCCT	143
AF475111	Fosfoglicerato mutasa, PGAM	F TGAGCAGGGTGTGATGCACGG R ATCCCACCCACGCTTGACCACA	103
AJ007705	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (<i>PEPC</i>), PEPC	F CGATGAGATGGCTGTGGTGGCAA R TTCTCTGGATGGCCTGCTCCCT	140
AK332778	Probable piruvato quinasa (86% similar a NM_001072281 de <i>Oryza sativa</i>), PK	F CCATGCTTGCCGATCCACGTCA R ACGACAACCGGGTCAATCGGA	124
GU563379	Probable subunidad E1- α del complejo piruvato deshidrogenasa, predicción mitocondrial, PDC	F ACCCCTGCTGAGCTCAAGGACA R TGACTCAACGCCAAAACCTTGACA	141
TC378665	Probable citrato sintasa (74% similar a AF387018 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), mitocondrial, CS	F GCCCTTGGCCTACCGTTGAAA R AGCCGCAACCTTCTTGCACTGG	78
AK331640	Probable isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD (87% similar a AB189169 de <i>Oryza sativa</i>), mitocondrial, IDH	F TTGCAGTTCCTCGTTCGCT R TGCCGCCAGATCCTTTGTCT	91
DR740472	Probable isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (88% similar a GQ848053 de <i>Oryza sativa</i>), citosólica, ICDH	F GGCAACCTGTTTCAGAGAGCCAA R TTTGCCAGTCCCTTGAGAACGG	141
TC392831	Probable sub. E1 del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (76% similar a AK229884 de <i>Arabidopsis thaliana</i>), OGDC	F AAGTGGCCAGGATGTTGAGAGAGGT R TGGTCATGAGATGACAGAATGGCGG	60
AY525637	Transportador de amonio (<i>AMT1;1</i>), AMT	F CTACACCGACGAGGACTCCA R CCGACTTGAGCATGAACCT	77
AY525638	Transportador de amonio (<i>AMT1;2</i>), AMT	F CGCGCTCTTCTACTACCTCTT R CGAAGAAGTGCTTCCCGATAAAC	80
AY428038	Transportador de amonio (<i>AMT2;1</i>), AMT	F GAGCCGAACCTCTGCAATCT R GTTCCACCCGATCACGAAGA	123
HF544985	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.1A</i>), NRT1	F CTTTCACTACATCGGCCAG R CTGACGAAGAATCCGAGCGA	112
HF544986	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.1B</i>), NRT1	F GCCTCACATCGTCCACTCA R CTTCATCCCTTTGGGCACT	140
AY587264	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.2</i>), NRT1	F ATACCTGGGGAAGTACCGGACAGC R AGGATCTGCCAAAGAGTCCAAGCA	133
HF544990	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.3A</i>), NRT1	F AGCCTCAACAATGACGGAAGT R CCAGAAGAGGATGCAGGTGG	82
HF544993	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.5B</i>), NRT1	F AGCAGTCAAAGCAAACACTGG R CCGAAGAAGGCGCATGTTAC	84
HF544995	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.7B</i>), NRT1	F ATCGTATGCTTCTGTCGCGT R CGGCAAGAATGCAGTTAGGG	147
HF544997	Transportador de nitrato de baja afinidad (<i>NRT1.8B</i>), NRT1	F TGCACCGCAAGGTGGCTGTT R AGCTTCGATGCCATCTGGAGATTC	138
AF332214	Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2.1</i>), NRT2	F TCAAGAAAGATGGAGGTGAGGCCG R TGTGGGGGTTGGCGAAGGAGAA	124
AF288688	Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2.2</i>), NRT2	F TCGTATGCTCTCAGCACCACT R ATGACACGAAGGTGGCGAGGGA	111
AY053452	Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2.3</i>), NRT2	F ATGCCGGTGTGGCATCTGTGTC R ATGCAGAAGACCGTTGGCGCT	130
AY763794	Componente del transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NAR2.1</i>), NAR2	F TCGCCTCCCTCGCATTCTTCTTCT R GACCGGCCAGAGAAAGCCAACA	103
AY763795	Componente del transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NAR2.2</i>), NAR2	F CGTCGCTCTCCCTCGCTTCTTCTT R AAGTCGCGCACGGACGAACA	98
AK333426	Nitrato reductasa dependiente de NADH (88% similar a X57845 de <i>Hordeum vulgare</i>), NR	F CTCAAGCGCAGCACGTCTA R CTCGGACATGGTGAACCTGCT	66
AK333382	Cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa (95% similar a AF268595 de <i>Hordeum vulgare</i>), MoCo	F AGCGGCGTGTGGGATAAGAGGA R ATGCACCTCCGCGACAGCGTT	75
FJ527909	Nitrito reductasa dependiente de ferredoxina (<i>nir</i>), NiR	F AACCTCTCTCTCTACATCA R CCTAGGAAGGTTGGTGTGGC	66
DQ124209	Glutamina sintetasa (<i>GS1a</i>), citosólica, GS1	F AGGTATCGTGGATGCCGTGGA R TTTGCGACGCCAGCTGAA	139
AY491968	Glutamina sintetasa (<i>GSr1</i>), citosólica, GS1	F AAGGGTACTTCGAGGACCGCA R ATGATCTGGCGGCGGTAGGCAT	129
DQ124212	Glutamina sintetasa (<i>GS2a</i>), plastídica, GS2	F CTCATGGTGTGTTGCGAACC R GGTCTCCAGGTATCCTTTGC	83
DQ124213	Glutamina sintetasa (<i>GS2b</i>), plastídica, GS2	F TGAAGGAACGAGCGGAGAC R CTCGCCACACGAATAGAG	104
TC387834	Probable glutamato sintasa dependiente de NADH (86% similar a AB008845 de <i>Oryza sativa</i>), NADH-GOGAT	F GCCATTGAATCAGTTCAGGGCCAC R GCCAGCACCTGAGCTTTCCTGATG	99
TC394038	Probable glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (86% similar a AB008845 de <i>Oryza sativa</i>), Fd-GOGAT	F CGGCAATGGAGGCTGAGCAACA R TGAGCTGCTCGATGGTCACTGT	80
HQ821868	Glutamato deshidrogenasa (<i>GDH1</i>), GDH	F AGCGTTTTGTAATCCAGGGGT R AGTGCTTCATCAGCTTGGCTA	150

Nº acceso	Identificación		Secuencia 5'→3' (Forward, F; Reverse, R)	Producto (pb)
EU346759	Aspartato aminotransferasa, citosólica, AAT	F	GCTATGTTTCGACGAATGGACCGTGG	82
		R	GCGCATCAAAAAGCTGCTCCCTCA	
EU885207	Aspartato aminotransferasa, plastídica, AAT	F	AAGCTCAACCTTGGTGTGGTGCCT	138
		R	TGCAGCGAAGCCTTCAATAGGCAGA	
AY621539	Asparagina sintetasa (ASN1), AS	F	GAACCAGCAAGAAGCCGAGGATGA	90
		R	AGAGATTGGCAAGCAGGACAGGACA	
HM998551	Canal de cloro (CLC1), CLC	F	TCGTGGCTGTTGTGGTGC GA	75
		R	AACCGCCAGCCCAAAATGACC	
GQ240772	Proteína de choque térmico (HSP90.1-A1), HSP	F	GAGGAGTTCGACGATGACAAGGACA	74
		R	TCGTGGCTCACCTCCTTCACCT	
GQ280382	Proteína de choque térmico (HSP70), HSP	F	TGCAGATGCGGGTTGCTCGT	96
		R	AGTTGGTGGTGCACAGGTCGAT	
JF288934	Factor de transcripción Myb (MYB13-1)	F	TACGACCACGTCCACGTCCATG	98
		R	GGCCGTGATGTGAGTTGTTGTCG	
AY955493	Factor de transcripción Dof (Dof1)	F	AACAAGCGCATAGCAGCGCAC	65
		R	GCATGGGCTGGTGTGGAGTTCA	
JF830784	Factor de transcripción NF-Y (NF-YB3)	F	TCAAGCACTACCTCCACAAGTTC	105
		R	CGGTGGCATTGTTGTGTTTCT	
DQ512330	Factor de transcripción MADS-box (AGL1)	F	GTTGAAGAAGCCGAGGAGGACGAGT	65
		R	ATGACCAGTCCGCTCCTCACTTCC'	
AM502900	Factor de transcripción MADS-box (WM30), similar a ANRI en <i>A. thaliana</i>	F	TTCCATCGCCTCTTGCTCTGC	81
		R	TTGCCGCGCCCATCTTCAA	

Anexo 3B. Primers diseñados y validados para los genes seleccionados de la ruta de síntesis de clorofilas en trigo duro.

Primer forward, F; primer reverse, R.

Nº acceso	Identificación		Secuencia 5'→3' (Forward, F; Reverse, R)	Producto (pb)
TC407277	Probable glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, GSA-AT (95% similar a M31545 de <i>Hordeum vulgare</i>)	F	GTGTGGAGGACACATCAGGG	143
		R	GTGCCAGATACACGCCTTCT	
TC400011	Probable magnesio quelatasa, MgCh (93% similar a U26545 de <i>Hordeum vulgare</i>)	F	GACATTGAGAAGGCGCTCAC	77
		R	AGTATCCCCCTGTTGGCCT	
TC429116	Probable magnesio protoporfirina IX metiltransferasa, MgMT (86% similar a XM_003561090 de <i>B. distachyon</i>)	F	CCTCCACTCGGAGAAGGACA	84
		R	AACGGGTGGAGATGAAGCC	
TC369906	Probable magnesio protoporfirina IX monometil ester ciclasa, MgCy (94% similar a AY887063 de <i>Hordeum vulgare</i>)	F	CTACGCCACATACCTGTCCG	134
		R	GGTTCTCGTCTGACACCAG	
X76532	Probable protoclorofilida oxidoreductasa A, PORA	F	ATACACTCACTCATCGCGGC	119
		R	AAGAAGGCCGAGTCTTTGGC	
TC389431	Probable clorofila sintasa, ChlS (90% similar a AJ27210 de <i>Avena sativa</i>)	F	TTCAACCAGCTGCTCGGAAT	88
		R	GCCATGTCACCGCTTAGT	
TC376386	Probable clorofilida a oxigenasa, CAO (94% similar a JQ627619 de <i>Hordeum vulgare</i>)	F	TAAAGCCTGGATGTGTCAGAA	64
		R	ACTGAACCAAGATCAAGAGGACA	

Anexo 4. Alineamientos entre las secuencias utilizadas para el diseño de primers y las secuencias obtenidas en la secuenciación de los productos de qRT-PCR.

T.aestivum PsaA AAGCCGCTCCCAAATGGCCCTGGTCCAAAGATGTAGAATCCATGTTGAATCACCACCTAGCGGGATTATAGGACTTGGGTCTCTTTCTTGGCGGGGCCACCAAATCA
T.durum 5'-3' AAGCCGCTCCCAAATGGCCCTGGTCCAAAGATGTAGAATCCATGTTGAATCACCACCT-----
T.durum 3'-5' -----ATCACCACCTAGCGGGATTATAGGACTTGGGTCTCTTTCTTGGCGGGGCCACCAAATCA

T.aestivum psbA AGTACAAGCCTGTGGGGTCGCTTCTGCAACTGGATAACTAGCACTGAAAATCGTCTTTACATCGGATGGTTCGGTGTGTTTATGATGATCCCTACCTTATTGACCGCAACTT
T.durum 5'-3' -----ATCGCTTTACATCGGATGGTTCGGTGTGTTTATGATGATCCCTACCTTATTGACCGCAACTT
T.durum 3'-5' AGTACAAGCCTGTGGGGTCGCTTCTGCAACTGGATAACTAGCACTGAAAATCGTCTTTACATCGGATGGTTCGGTGTGTTTATGATGATCCCTACCTA-----
T.aestivum psbA CTGTATTTATTATCGCCCTTCATCGCTGCCCT
T.durum 5'-3' CTGTATTTATTATCGCCCTTCATCGCTGCCCT
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum rbcS TCAGCAATGGCGGAAGGATCAGGTGCATGCAGGTGTGGCCGATTGAGGGCATCAAGAAGTTCGAGACCCTGTCTTACTTGCCACCCCTcTCCACG
T.durum 5'-3' -----GTGGCCGATTGAGGGCATCAAGAAGTTCGAGACCCTGTCTTACTTGCCACCCCTaTCCACG
T.durum 3'-5' TCAGCAATGGCGGAAGGATCAGGTGCATGCAGGTGTGGCCGAT-----

T.turgidum pgk1 AACAGCCACAGAGCACATGCCTCGACTGAGGGAGTTACCAAGTCTTTGAAGCCTTCTGTGCTGGATTCCTTTTGAGAAGGAACCTGACTACCTGGATGGAGCTGTT
T.durum 5'-3' -----AGCCTTCTGTTGCTGGATTCCTTTTGAGAAGGAACCTGACTACCTGGATGGAGCTGTT
T.durum 3'-5' AACAGCCACAGAGCACATGCCTCGACTGAGGGAGTTACCAAGTCTTTGAAGCCTTCTGTGCTGGATTCCTTTTGAGAAGGAACCTGACTACCTGGATGGAGCTGTT
T.turgidum pgk1 TCAAACCCTAAGCGCCCATTCGCTGCCAT
T.durum 5'-3' TCAAACCCTAAGCGCCCATTCGCTGCCAT
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum GAPDH CACCCACGCCGACACCATCATCAGCAACGCCCTCTGCACCACCACTGCCTCGCCCTTCGTCAGGTGCTCGATACCAAAGTTGCGCATCATCAAGGGAACCATG
T.durum 5'-3' -----ACTGCCTCGCCCTTCGTCAGGTGCTCGATACCAAAGTTGCGCATCATCAAGGGAACCATG
T.durum 3'-5' CACCCACGCCGACACCATCATCAGCAACGCCCTCTGCACCACCACTGCCTCGCCCTTCGTCAGGTGCTCGATACCAAAGTTGCGCATCATCA-----
T.aestivum GAPDH ACCACCACCCACTCATACCCGGCGACAGAGGCTA
T.durum 5'-3' ACCACCACCCACTCATACCCGGCGACAGAGGCTA
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum RPI GGC AAGGAGATTCGGCCTTTGGAAGGAGTTGTTGAGCATGGCTTGTTTTGAAACATGGCAACTTCAGTGATCATTGCCGGATCGGACGGCGTCAGTGTCAAACAAGT
T.durum 5'-3' -----ACATGGCAACTTCAGTGATCATTGCCGGATCGGACGGCGTCAGTGTCAAACAAGT
T.durum 3'-5' GGC AAGGAGATTCGGCCTTTGGAAGGAGTTGTTGAGCATGGCTTGTTTTGAAACATGGCAACTTCAGTGATCATTGCCGGATCGGACGGCGTCA-----
T.aestivum RPI GAGTGTGTTGGGTGAGCTACCTGTTGTCGGTG
T.durum 5'-3' GAGTGTGTTGGGTGAGCTACCTGTTGTCGGTG
T.durum 3'-5' -----

T.durum 1-SST TACCGTCCAAGTCTTCTACGACCCCGTGAAGAAGCGCGCTCGTGTGGCGTACGTCGGCGAGACCAGCTCGGAGCGCCGACATCACAAGGGTGGGCCAAC
T.durum 3'-5' -----GTGCTGTGGCGTACGTCGGCGAGACCAGCTCGGAGCGCCGACATCACAAGGGTGGGCCAAC
T.durum 3'-5' TACCGTCCAAGTCTTCTACGACCCCGTGAAGAAGCGCGCTCGTGTGGCGTACGTCGGCGAGACCAGCTCGGAGCGCCGACATCACC-----
T.durum 1-SST TCCAGTCGATTCGAGGACAGTGGAGCTTGACC
T.durum 3'-5' TCCAGTCGATTCGAGGACAGTGGAGCTTGACC
T.durum 3'-5' -----

T.durum 6-SFT CCAAGCGGCTGATGTGGTGAAGGATGGCCCTCAATTCAGTCAGTTCGAAGCAATTCGCTCTCGAGAGAAGACCCGGACGAACTCCTCCTCTGGCCGTGGAGGA
T.durum 5'-3' -----AGGAGTCTCTCGAGAGAAGACCCGGACGAACTCCTCCTCTGGCCGTGGAGGA
T.durum 3'-5' CCAAGCGGCTGATGTGGTGAAGGATGGCCCTCAATTCAGTCAGTTCGAAGCAATTCGCTCTCGAGAGAAGACCCGGACGAACTCCTCCTCTGGCCGTG-----
T.durum 6-SFT GATTGAGACCCCTCCGCTCAACGCCACCGAACTCAGT
T.durum 5'-3' GATTGAGACCCCTCCGCTCAACGCCACCGAACTCAGT
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum Cesa1 AGCAGACGTCCTCCCTTTCCCTATGTGAATCATTCACCAAATCCGTCAGGGAGTCTCTGGCAGTATGGGAATGTTGCCTGGAAAGAGAGAGTTCGATGGTGGAAAA
T.durum 5'-3' -----AGGAGTCTCTCGAGAGAAGACCCGGACGAACTCCTCCTCTGGCCGTGGAGGA
T.durum 3'-5' AGCAGACGTCCTCCCTTTCCCTATGTGAATCATTCACCAAATCCGTCAGGGAGTCTCTGGCAGTATGGGAATGTTGCCTGGAAAGAGAGAGTTCGATGGTGGAAAA
T.aestivum Cesa1 TGAAGCAGGACAAGGTGCAATTCCCA
T.durum 5'-3' TGAAGCAGGACAAGGTGCAATTCCCA
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum PDC ACCCTGCTGAGCTCAAGGACATGGAGAAGAAATAGGAAAGAGTTCGACGCTGCCATGCTAAAGCCAAGGAAAGTCCCTATGCCTGATGCTTCTGAGCTCTTTACAA
T.durum 5'-3' -----AGTGCAGCTGCCATGCTAAAGCCAAGGAAAGTCCCTATGCCTGATGCTTCTGAGCTCTTTACAA
T.durum 3'-5' ACCCTGCTGAGCTCAAGGACATGGAGAAGAAATAGGAAAGAGTTCGACGCTGCCATGCTAAAGCCAAGGAAAGTCCCTATGCCTGATGCTTCTGAGCTCT-----
T.aestivum PDC ATGCTATGTCGAAGGTTTGGCGTTGAGTCA
T.durum 5'-3' ATGCTATGTCGAAGGTTTGGCGTTGAGTCA
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum GS1a AGTGCATCGTGGATGCCGTGGAGAAGCTCAAGCTCAAGCACAAGGAGACATCGCCGCTACGGCGAGGGCAACGAGCGCCGCTCACCAGGCAAGCAGACGCCGCA
T.durum 5'-3' -----AAGGACACATCGCCGCTACGGCGAGGGCAACGAGCGCCGCTCACCAGGCAAGCAGACGCCGCA
T.durum 3'-5' AGTGCATCGTGGATGCCGTGGAGAAGCTCAAGCTCAAGCACAAGGAGACATCGCCGCTACGGCGAGGGCAACGAGCGCCGCTCACCAGGCAAGCAG-----
T.aestivum GS1a CATCAACACCTTCAGCTGGGCGTCGCAAA
T.durum 5'-3' CATCAACACCTTCAGCTGGGCGTCGCAAA
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum PFP ATTGGCGGGATGGAACAATGAGAGGAGCAGTGGcGATATTCGAAGGTTTAAACGGTGTcGTTGAGGATATCCATTACAGGGATCCCAAAAACTTGGACAAtGACA
T.durum 5'-3' -----AGAGTTTAAACGGTGTgGTTGAGGATATCCATTACAGGGATCCCAAAAACTTGGACAAGcGACA
T.durum 3'-5' ATTGGCGGGATGGAACAATGAGAGGAGCAGTGGcGATATTCGAAGGTTTAAACGGTGTcGTTGAGGATATCCATTACAGGGATCCCAAAAACT-----
T.aestivum PFP TCGAaATcATAGACAAGGCTTTGGTTCAGACT
T.durum 5'-3' TCGAaATcATAGACAAGGCTTTGGTTCAGACT
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum GDH1 AGCGTTTTGTAATCCAGGGTTtGGTAATGTTGGCTCCTGGGCTGCTCAACTGATCACTGAAGTGGaGGCAAGGTGATCGCCATCAGCGATGTCACAGGGGcGTCAA
T.durum 5'-3' -----ACTGATCACTGAAGTGGcGGCAAGGTGATCGCCATCAGCGATGTCACAGGGGcGTCAA
T.durum 3'-5' AGCGTTTTGTAATCCAGGGTTtGGTAATGTTGGCTCCTGGGCTGCTCAACTGATCACTGAAGTGGaGGCAAGGTGATCGCCATCAGCGATGTCACAGGGGcGT---
T.aestivum GDH1 GAACTCCAATGGCATTGACATAGCCAAGCTGATGAAGCATT
T.durum 5'-3' GAACTCCAATGGCATTGACATAGCCAAGCTGATGAAGCATT
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum NRT1.1A CCTTCACCTACATCGCCAGCTCGACTTCTCTCTGCGGAGTGCCTCAAGGGGATGAAGACCATGAGCAGGGGCTCTTCTCAGCAGCTCTCGCTCGGATCTT
T.durum 5'-3' -----AGGGATGAAGACCATGAGCAGGGGCTCTCTCAGCAGCTCTCGCTCGGATCTT
T.durum 3'-5' CCTTCACCTACATCGCCAGCTCGACTTCTCTCTGCGGAGTGCCTCAAGGGGATGAAGACCATGAGCAGGGGCTCTTCTCAGCAGCTCTCGCTCGGATCTT
T.aestivum NRT1.1A CGTCAG
T.durum 5'-3' CGTCAG
T.durum 3'-5' -----

T.aestivum NRT1.8B TGCACCGCAAGGTGGCTGTTCCGATGAGCATTcTGTGGCAAGGACCCAGTACTTCTGCTAGGCGTCGCCgaGGTGTCTCCAATATTGGCTAACTGAGGcTTT
T.durum 5'-3' -----GACCCAGTACTTCTGCTAGGCGTCGCCttGGTGTCTCCAATATTGGCTAACTGAGGcTTT
T.durum 3'-5' TGCACCGCAAGGTGGCTGTTCCGATGAGCATTcTGTGGCAAGGACCCAGTACTTCTGCTAGGCGTCGCCgaGGTGTCTCCAATATTGGCTAACTGAGGcTTT
T.aestivum NRT1.8B CTATGATGAATCTCCAGATGGCATGCGAAGCT
T.durum 5'-3' CTATGATGAATCTCCAGATGGCATGCGAAGCT
T.durum 3'-5' -----

CAPÍTULO 9: Bibliografía



- Aben SK, Seneweera SP, Ghannoum O, Conroy JP** (1999) Nitrogen requirements for maximum growth and photosynthesis of rice, *Oryza sativa* L. cv. Jarrah grown at 36 And 70 Pa CO₂. *Aust J Plant Physiol* 26:759-766
- Ahmad P, Prasad MNV, SpringerLink** (2012) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. *Springer New York*, New York, NY
- Ainsworth C, Hosein F, Tarvis M, Weir F, Burrell M, Devos KM et al.** (1995) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase genes in wheat: differential expression and gene mapping. *Planta* 197:1-10
- Ainsworth E, 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* 165:351-371
- Ainsworth E, 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, Davey PA, Hymus GJ, Osborne CP, Rogers A** (2003) Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilization levels under Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant Cell Environ* 26:705-714
- Ainsworth EA, Ort DR** (2010) How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiol* 154:526-530
- 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
- Albrizio R, Todorovic M, Matic T, Stellacci AM** (2010) Comparing the interactive effects of water and nitrogen on durum wheat and barley grown in a Mediterranean environment. *Field Crop Res* 115:179-190
- Alonso A, Pérez P, Martínez-Carrasco R** (2009) Growth in elevated CO₂ enhances temperature response of photosynthesis in wheat. *Physiol Plantarum* 135:109-120
- Alonso A, Pérez P, Morcuende R, Martínez-Carrasco R** (2008a) Future CO₂ concentrations, though not warmer temperatures, enhance wheat photosynthesis temperature responses. *Physiol Plantarum* 132:102-112
- Alonso A, Pérez P, Morcuende R, Verdejo A, Martínez-Carrasco R** (2008b) Modification of photosynthesis temperature response by long-term growth in elevated CO₂ and temperature in wheat field crops. In: JF Allen, E Gantt, JH Golbeck, B Osmond, eds. Photosynthesis. Energy from the Sun. *Springer Netherlands*, pp 1383-1386
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Allard V, Newton PCD, Liewfering M, Soussana JF, Carran RA, Matthew C** (2005) Increased quantity and quality of coarse soil organic matter fraction at elevated CO₂ in a grazed grassland are a consequence of enhanced root growth rate and turnover. *Plant Soil Environ* 276:49-60
- Ambasht PK, Kayastha A** (2002) Plant pyruvate kinase. *Biol Plantarum* 45:1-10
- Andersson I** (2008) Catalysis and regulation in Rubisco. *J Exp Bot* 59:1555-1568
- Andersson I, Backlund A** (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Bioch* 46:275-291
- Andrews M, Raven JA, Lea PJ** (2013) Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Ann Appl Biol* 163:174-199
- Ap Rees T, Wright BW, Fuller WA** (1977) Measurements of starch breakdown as estimates of glycolysis during thermogenesis by the spadix of *Arum maculatum* L. *Planta* 134:53-56
- Aranjuelo I, Cabrera-Bosquet L, Morcuende R, Avice JC, Nogués S, Araus JL et al.** (2011a) 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, Erice G, Nogués S, Morales F, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M** (2008a) The mechanism(s) involved in the photoprotection of PSII at elevated CO₂ in nodulated alfalfa plants. *Environ Exp Bot* 64:295-306
- Aranjuelo I, Irigoyen JJ, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M** (2006) Response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: productivity and water relations. *Environ Exp Bot* 55:130
- Aranjuelo I, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Nogués S** (2008b) Carbon partitioning in N₂ fixing *Medicago sativa* plants exposed to different CO₂ and temperature conditions. *Funct Plant Biol* 35:306-317
- Aranjuelo I, Pintó-Marijuan M, Avice JC, Fleck I** (2011b) Effect of elevated CO₂ on carbon partitioning in young *Quercus ilex* L. during resprouting. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25:1527-1535
- Aranjuelo I, Sanz-Sáez Á, Jauregui I, Irigoyen JJ, Araus JL, Sánchez-Díaz M et al.** (2013) Harvest index, a parameter conditioning responsiveness of wheat plants to elevated CO₂. *J Exp Bot* 64:1879-1892

- Araus JL, Slafer GA** (2011) Crop stress management and global climate change. *CABI*, Wallingford, UK
- Araya T, Noguchi K, Terashima I** (2010) Effect of nitrogen nutrition on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *J Plant Res* 123:371-379
- Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24:1-15
- Arrivault S, Guenther M, Ivakov A, Feil R, Vosloh D, van Dongen JT et al.** (2009) Use of reverse-phase liquid chromatography, linked to tandem mass spectrometry, to profile the Calvin cycle and other metabolic intermediates in Arabidopsis rosettes at different carbon dioxide concentrations. *Plant J* 59:826-839
- Arsova B, Kierszniowska S, Schulze WX** (2012) The use of heavy nitrogen in quantitative proteomics experiments in plants. *Trends Plant Sci* 17:102-112
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ** (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plantarum* 104:280-292
- Backlund P, Janetos A, Schimel D** (2008) The effects of climate change on agriculture, land resources, water resources, and biodiversity. *Environmental Protection Agency, Climate Change Science Program*, Washington, DC
- Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59:89-113
- Baker NR, Harbinson J, Kramer DM** (2007) Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant Cell Environ* 30:1107-1125
- 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
- Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R** (2005) Fisiología vegetal. *Pirámide*, Madrid
- BassiriRad H, Griffin KL, Reynolds JF, Strain BR** (1997) Changes in root NH_4^+ and NO_3^- absorption rates of loblolly and ponderosa pine in response to CO_2 enrichment. *Plant Soil Environ* 190:1-9
- BassiriRad H, Gutschick VP, Lussenhop J** (2001) Root system adjustments: regulation of plant nutrient uptake and growth responses to elevated CO_2 . *Oecologia* 126:305-320
- BassiriRad H, Prior SA, Norby RJ, Rogers HH** (1999) A field method of determining NH_4^+ and NO_3^- uptake kinetics in intact roots: effects of CO_2 enrichment on trees and crop species. *Plant Soil Environ* 217:195-204
- BassiriRad H, Reynolds JF, Virginia RA, Brunelle MH** (1998) Growth and root NO_3^- and PO_4^{3-} uptake capacity of three desert species in response to atmospheric CO_2 enrichment. *Aust J Plant Physiol* 24:353-358
- BassiriRad H, Thomas RB, Reynolds JF, Strain BR** (1996) Differential responses of root uptake kinetics of NH_4^+ and NO_3^- to enriched atmospheric CO_2 concentration in field-grown loblolly pine. *Plant Cell Environ* 19:367-371
- Benlloch-Gonzalez M, Bochicchio R, Berger J, Bramley H, Palta JA** (2014) High temperature reduces the positive effect of elevated CO_2 on wheat root system growth. *Field Crop Res* 165:71-79
- Bennett MD, Leitch IJ** (2012) Plant DNA C-values database 6.0, <http://data.kew.org/cvalues>.
- Bernard S, Møller A, Dionisio G, Kichey T, Jahn T, Dubois F et al.** (2008) Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol* 67:89-105
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D et al.** (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 17:3257-3281
- Bloom AJ** (2015) Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynth Res* 123:117-128
- Bloom AJ, Asensio JS, Randall L, Rachmilevitch S, Cousins AB, Carlisle EA** (2012) CO_2 enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C_3 but not C_4 plants and slows growth under nitrate in C_3 plants. *Ecology* 93:355-367
- Bloom AJ, Burger M, Asensio JSR, Cousins A** (2010) Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science* 328:899-903
- Bloom AJ, Burger M, Kimball BA, Pinter Jr PJ** (2014) Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO_2 in field-grown wheat. *Nat Clim Change* 4:477-480
- Bloom AJ, Smart DR, Nguyen DT, Searles PS, Smart D, Nguyen D et al.** (2002) Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *P Natl Acad Sci USA* 99:1730-1735
- Bogdanova N, Hell R** (1997) Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:251-262
- Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM** (1993) dbEST - database for "expressed sequence tags". *Nat Genet* 4:332-333
- Bokhari SA, Wan XY, Yang YW, Zhou L, Tang WL, Liu JY** (2007) Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO_2 levels. *J Proteome Res* 6:4624-4633

- Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu Ü, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S et al.** (2005) D-glycerate 3-kinase, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in Arabidopsis, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* 17:2413-2420
- Bonshtien A, Parnas A, Sharkia R, Niv A, Mizrahi I, Azem A et al.** (2009) Differential effects of co-chaperonin homologs on cpn60 oligomers. *Cell Stress Chaperon* 14:509-519
- Bowden P, Edwards J, Ferguson N, McNee T, Manning B, Roberts K et al.** (2008) Wheat growth and development. *NSW Department of Primary Industries*, State of New South Wales, Australia
- Bowes G** (1991) Growth at elevated CO₂ - photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant Cell Environ* 14:795-806
- Bowes G** (1993) Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:309-332
- 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
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GLA, D'Amore R, Allen AM et al.** (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491:705-710
- Buchanan BB** (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu Rev Plant Physiol* 31:341-374
- Bunce JA** (2001) Direct and acclimatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field. *Global Change Biol* 7:323-331
- Burlina A** (1984) 2-Oxoglutarate. In: HU Bergmeyer, ed. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edition, Vol VII. *Academic Press*, New York, pp 20-24
- Burton RA, Johnson PE, Beckles DM, Fincher GB, Jenner HL, Naldrett MJ et al.** (2002) Characterization of the genes encoding the cytosolic and plastidial forms of ADP-glucose pyrophosphorylase in wheat endosperm. *Plant Physiol* 130:1464-1475
- Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al.** (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611
- Bustos DM, Iglesias AA** (2002) Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*). *FEBS Lett* 530:169-173
- Bustos DM, Iglesias AA** (2003) Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* 133:2081-2088
- Butler WL** (1978) Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 29
- Campbell WH** (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:277-303
- Cañas RA, Canales J, Muñoz-Hernández C, Granados JM, Ávila C, García-Martín ML et al.** (2015) Understanding developmental and adaptive cues in pine through metabolite profiling and co-expression network analysis. *J Exp Bot* (in press)
- Carillo P, Mastrolonardo G, Nacca F, Fuggi A** (2005) Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. *Funct Plant Biol* 32:209-219
- Carlisle E, Myers S, Raboy V, Bloom A** (2012) The effects of inorganic nitrogen form and CO₂ concentration on wheat yield and nutrient accumulation and distribution. *Front Plant Sci* 3:195
- Castangs L, Marchive C, Meyer C, Krapp A** (2011) Nitrogen signalling in Arabidopsis: how to obtain insights into a complex signalling network. *J Exp Bot* 62:1391-1397
- Cawse PA** (1967) Determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 92:311
- Cen Y-P, Sage RF** (2005) The regulation of Rubisco activity in response to variation in temperature and atmospheric CO₂ partial pressure in sweet potato. *Plant Physiol* 139:979-990
- Chen GY, Yong ZH, Liao Y, Zhang DY, Chen Y, Zhang HB et al.** (2005a) Photosynthetic acclimation in rice leaves to free-air CO₂ enrichment related to both ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation limitation and ribulose-1,5-bisphosphate regeneration limitation. *Plant Cell Physiol* 46:1036-1045
- Chen R, Ni Z, Qin Y, Nie X, Lin Z, Dong G et al.** (2005b) Isolation and characterization of *TaDof1* transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *DNA Seq* 16:358-363
- Chen X, Yu T, Xiong J, Zhang Y, Hua Y, Li Y et al.** (2004) Molecular cloning and expression analysis of rice phosphoribulokinase gene that is regulated by environmental stresses. *Mol Biol Rep* 31:249-255
- Chen Y-R, Hartman FC, Lu T-YS, Larimer FW** (1998) D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase: cloning and heterologous expression of the spinach gene, and purification and characterization of the recombinant enzyme. *Plant Physiol* 118:199-207
- Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA** (1992) Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. *P Natl Acad Sci USA* 89:1861-1864

- 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
- Childs KL, Hamilton JP, Zhu W, Ly E, Cheung F, Wu H et al.** (2007) The TIGR plant transcript assemblies database. *Nucleic Acids Res* 35:D846-D851
- Chueca A, Sahrawy M, Pagano E, López Gorgé J** (2002) Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: structure and function. *Photosynth Res* 74:235-249
- Churin Y, Adam E, Kozma-Bognar L, Nagy F, Börner T** (2003) Characterization of two Myb-like transcription factors binding to *CAB* promoters in wheat and barley. *Plant Mol Biol* 52:447-462
- Coleman JS, McConnaughay KDM, Bazzaz FA** (1993) Elevated CO₂ and plant nitrogen-use: is reduced tissue nitrogen concentration size-dependent? *Oecologia* 93:195-200
- Conley MM, Kimball BA, Brooks TJ, Pinter PJ, Jr., Hunsaker DJ, Wall GW et al.** (2001) CO₂ enrichment increases water-use efficiency in sorghum. *New Phytol* 151:407-412
- Conroy J, Hocking P** (1993) Nitrogen nutrition of C₃ plants at elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Physiol Plantarum* 89:570-576
- Conroy JP** (1992) Influence of elevated atmospheric CO₂ concentrations on plant nutrition. *Aust J Bot* 40:445-456
- Cotrufo MF, Ineson P, Scott A** (1998) Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biol* 4:43-54
- Crawford N, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci* 3:389-395
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7:859
- Curtis PS, Wang X** (1998) A meta-analysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113:299-313
- Czechowski T, Bari R, Stitt M, Scheible W-R, Udvardi M** (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J* 38:366
- 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
- Davey PA, Hunt S, Hymus GJ, DeLucia EH, Drake BG, Karnosky DF et al.** (2004) Respiratory oxygen uptake is not decreased by an instantaneous elevation of [CO₂], but is increased with long-term growth in the field at elevated [CO₂]. *Plant Physiol* 134:520-527
- Davey PA, Parsons AJ, Atkinson L, Wadge K, Long SP** (1999) Does photosynthetic acclimation to elevated CO₂ increase photosynthetic nitrogen-use efficiency? A study of three native UK grassland species in open-top chambers. *Funct Ecol* 13:21-28
- de Angeli A, Thomine S, Frachisse J-M, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett* 581:2367-2374
- de Graaff M-A, van Groenigen K-J, Six J, Hungate B, van Kessel C** (2006) Interactions between plant growth and soil nutrient cycling under elevated CO₂: a meta-analysis. *Global Change Biol* 12:2077-2091
- de Jong F, Thodey K, Lejay LV, Bevan MW** (2014) Glucose elevates NITRATE TRANSPORTER2.1 protein levels and nitrate transport activity independently of its HEXOKINASE1-mediated stimulation of NITRATE TRANSPORTER2.1 expression. *Plant Physiol* 164:308-320
- de Souza AP, Gaspar M, da Silva EA, Ulian EC, Waclawovsky AJ, Nishiyama Jr MY et al.** (2008) Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant Cell Environ* 31:1116-1127
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S et al.** (2011) From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot* 62:1349-1359
- 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
- Del Pozo A, Pérez P, Morcuende R, Alonso A, Martínez-Carrasco R** (2005) Acclimatory responses of stomatal conductance and photosynthesis to elevated CO₂ and temperature in wheat crops grown at varying levels of N supply in a Mediterranean environment. *Plant Sci* 169:908-916
- Díaz S, Grime JP, Harris J, McPherson E** (1993) Evidence of a feedback mechanism limiting plant response to elevated carbon dioxide. *Nature* 364:616-617
- Diebold R, Schuster J, Däschner K, Binder S** (2002) The branched-chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiol* 129:540-550
- Dinç E, Ceppi MG, Tóth SZ, Bottka S, Schansker G** (2012) The chl a fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl a/b ratio remains unaffected. *Biochim Biophys Acta* 1817:770-779
- Douce R, Neuburger M** (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* 2:214-222

- Drake BG, Azcon-Bieto J, Berry J, Bunce J, Dijkstra P, Farrar J et al.** (1999) Does elevated atmospheric CO₂ concentration inhibit mitochondrial respiration in green plants? *Plant Cell Environ* 22:649-657
- Drake BG, González-Meler MA, Long SP** (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:609-639
- Druart N, Rodriguez Buey M, Barron Gafford G, Sjodin A, Bhalerao R, Hurry V** (2006) Molecular targets of elevated [CO₂] in leaves and stems of *Populus deltoides*: implications for future tree growth and carbon sequestration. *Funct Plant Biol* 33:121-131
- Duan YH, Guo J, Ding K, Wang SJ, Zhang HB, Dai XW et al.** (2011) Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Mol Biol Rep* 38:301-307
- Dvorak J, Akhunov ED, Akhunov AR, Deal KR, Luo MC** (2006) Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Mol Biol Evol* 23:1386-1396
- Edelman J, Jefford TG** (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol* 67:517-531
- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792-1797
- Ehtemam MH, Rahiminejad MR, Saeidi H, Tabatabaei BES, Krattinger SG, Keller B** (2010) Relationships among the A genomes of *Triticum* L. species as evidenced by SSR markers, in Iran. *Int J Mol Sci* 11:4309-4325
- Eimert K, Villand P, Kilian A, Kleczkowski LA** (1996) Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues. *Gene* 170:227-232
- El-Bashiti T, Hamamci H, Öktem HA, Yücel M** (2005) Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Sci* 169:47-54
- Ellis RJ** (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem Sci* 4:241
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016
- Endler A, Persson S** (2011) Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis. *Mol Plant* 4:199-211
- Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu Ü, Morgenthal K, Weckwerth W, Pärnik T et al.** (2007) Deletion of glycine decarboxylase in Arabidopsis is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiol* 144:1328-1335
- Epstein E, Bloom AJ** (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. *Sinauer Associates, Inc. Publishers*, Sunderland, Massachusetts
- Erice G, Irigoyen JJ, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M** (2006) Effect of elevated CO₂, temperature and drought on dry matter partitioning and photosynthesis before and after cutting of nodulated alfalfa. *Plant Sci* 170:1059-1067
- Erice G, Sanz-Sáez A, Urdiain A, Araus JL, Irigoyen JJ, Aranjuelo I** (2014) Harvest index combined with impaired N availability constrains the responsiveness of durum wheat to elevated CO₂ concentration and terminal water stress. *Funct Plant Biol* 41:1138-1147
- Evans JR** (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* 72:297-302
- Evans JR** (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78:9-19
- Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I** (2009) Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *J Exp Bot* 60:2235-2248
- Eversole K, Feuillet C, Mayer KFX, Rogers J** (2014) Slicing the wheat genome. *Science* 345:285-287
- Fangmeier A, Chrost B, Högy P, Krupinska K** (2000) CO₂ enrichment enhances flag leaf senescence in barley due to greater grain nitrogen sink capacity. *Environ Exp Bot* 44:151-164
- Fangmeier A, De Temmerman L, Mortensen L, Kemp K, Burke J, Mitchell R et al.** (1999) Effects on nutrients and on grain quality in spring wheat crops grown under elevated CO₂ concentrations and stress conditions in the European, multiple-site experiment 'SPACE-wheat'. *Eur J Agron* 10:215-229
- Fangmeier A, Grütters U, Högy P, Vermehren B, Jäger HJ** (1997) Effects of elevated CO₂, nitrogen supply and tropospheric ozone on spring wheat - II. Nutrients (N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn). *Environ Pollut* 96:43-59
- FAO** (2009) High Level Expert Forum - how to feed the World in 2050. *In*, Rome
- 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 GD, von Caemmerer SV, Berry JA** (1980) A biochemical-model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149:78-90
- Feldman M, Levy A** (2009) Genome evolution in allopolyploid wheat - a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *J Genet Genomics* 36:511-518
- Felsenstein J** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791

- Feng H, Huang X, Zhang Q, Wei G, Wang X, Kang Z** (2012) Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat. *Plant Physiol Bioch* 51:116-122
- Feng H, Yan M, Fan X, Li B, Shen Q, Miller A et al.** (2011) Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *J Exp Bot* 62:2319-2332
- Fermani S, Sparla F, Falini G, Martelli PL, Casadio R, Pupillo P et al.** (2007) Molecular mechanism of thioredoxin regulation in photosynthetic A₂B₂-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *P Natl Acad Sci USA* 104:11109-11114
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ** (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* 7:254-261
- Fernie AR, Stitt M** (2012) On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: coping with increasing complexity in logic, chemistry, and network interactions scientific correspondence. *Plant Physiol* 158:1139-1145
- Ferrario-Méry S, Thibaud MC, Betsche T, Valadier MH, 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
- Feuillet C, Langridge P, Waugh R** (2008) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet* 24:24-32
- Flechner A, Dressen U, Westhoff P, Henze K, Schnarrenberger C, Martin W** (1996) Molecular characterization of transketolase (EC 2.2.1.1) active in the Calvin cycle of spinach chloroplasts. *Plant Mol Biol* 32:475-484
- Flexas J, Barbour MM, Brendel O, Cabrera HM, Carriqui M, Díaz-Espejo A et al.** (2012) Mesophyll diffusion conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci* 193-194:70-84
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H** (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 31:602-621
- Fonseca F, Bowsher CG, Stulen I** (1997) Impact of elevated atmospheric CO₂ on nitrate reductase transcription and activity in leaves and roots of *Plantago major*. *Physiol Plantarum* 100:940-948
- Fontaine J-X, Tercé-Laforgue T, Armengaud P, Clément G, Renou J-P, Pelletier S et al.** (2012) Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. *Plant Cell* 24:4044-4065
- Ford MA, Pearman I, Thorne GN** (1976) Effects of variation in ear temperature on growth and yield of spring wheat. *Ann Appl Biol* 82:317-333
- Forde B, Lea P** (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J Exp Bot* 58:2339-2358
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:219
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60:455-484
- Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J** (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 63:1637
- Fredslund J, Lange M** (2007) Primique: automatic design of specific PCR primers for each sequence in a family. *BMC Bioinformatics* 8:369
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M** (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* 46:533-548
- Fukayama H, Fukuda T, Masumoto C, Taniguchi Y, Sakai H, Cheng W et al.** (2009) Rice plant response to long term CO₂ enrichment: gene expression profiling. *Plant Sci* 177:203-210
- Fukayama H, Sugino M, Fukuda T, Masumoto C, Taniguchi Y, Okada M et al.** (2011) Gene expression profiling of rice grown in free air CO₂ enrichment (FACE) and elevated soil temperature. *Field Crop Res* 121:195-199
- Galili S, Amir R, Galili G** (2008) Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. In: HN Hans J. Bohnert, GL Norman, eds. *Advances in plant biochemistry and molecular biology*, Vol Volume 1. *Pergamon*, pp 49-80
- Gao X, She M-Y, Yin G-X, Yu Y, Qiao W-H, Du L-P et al.** (2010) Cloning and characterization of genes coding for fructan biosynthesis enzymes (FBEs) in Triticeae plants. *Agric Sci China* 9:313-324
- Geigenberger P** (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol* 155:1566-1577
- Geiger DR, Servaites JC** (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C₃ plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:235-256
- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnwald 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

- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F et al.** (1998) Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ* 21:253-268
- Genschel U, Abel G, Lörz H, Lütticke S** (2002) The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localisation. *Planta* 214:813-820
- Gerhardt S, Echt S, Busch M, Freigang J, Auerbach G, Bader G et al.** (2003) Structure and properties of an engineered transketolase from maize. *Plant Physiol* 132:1941-1949
- Gesch RW, Boote KJ, Vu JCV, Allen LH, Bowes G** (1998) Changes in growth CO₂ result in rapid adjustments of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene expression in expanding and mature leaves of rice. *Plant Physiol* 118:521-529
- Ghannoum O, Evans J, von Caemmerer S** (2011) Nitrogen and water use efficiency of C₄ plants. In: AS Raghavendra, RF Sage, eds. C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms, Vol 32. *Springer Netherlands*, pp 129-146
- Gibon Y, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM, Fisahn J et al.** (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J* 39:847-862
- Gifford R, Barrett D, Lutze J** (2000) The effects of elevated [CO₂] on the C:N and C:P mass ratios of plant tissues. *Plant Soil* 224:1-14
- Giménez MJ, Pistón F, Atienza SG** (2011) Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta* 233:163-173
- Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A et al.** (2002) The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot* 53:855-864
- Goggin DE, Setter TL** (2004) Fructosyltransferase activity and fructan accumulation during development in wheat exposed to terminal drought. *Funct Plant Biol* 31:11-21
- González-Meler MA, Siedow JN** (1999) Direct inhibition of mitochondrial respiratory enzymes by elevated CO₂: does it matter at the tissue or whole-plant level? *Tree Physiol* 19:253-259
- González-Meler MA, Taneva L, Trueman RJ** (2004) Plant respiration and elevated atmospheric CO₂ concentration: cellular responses and global significance. *Ann Bot* 94:647-656
- González M-C, Echevarría C, Vidal J, Cejudo FJ** (2002) Isolation and characterisation of a wheat phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Modelling of the encoded protein. *Plant Sci* 162:233-238
- Grabowska A, Nowicki M, Kwinta J** (2011) Glutamate dehydrogenase of the germinating triticale seeds: gene expression, activity distribution and kinetic characteristics. *Acta Physiol Plant* 33:1981-1990
- Grennan AK** (2006) Regulation of starch metabolism in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 142:1343-1345
- Guo H, Sun Y, Li Y, Liu X, Ren Q, Zhu-Salzman K et al.** (2013) Elevated CO₂ modifies N acquisition of *Medicago truncatula* by enhancing N fixation and reducing nitrate uptake from soil. *PLoS One* 8:e81373
- Guo S, Zhou Y, Shen Q, Zhang F** (2007) Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants - growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. *Plant Biology* 9:21-29
- Gupta P, Duplessis S, White H, Karnosky DF, Martin F, Podila GK** (2005) Gene expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO₂ and tropospheric O₃. *New Phytol* 167:129-142
- Gutiérrez D, Gutiérrez E, Pérez P, Morcuende R, Verdejo AL, Martínez-Carrasco R** (2009a) Acclimation to future atmospheric CO₂ levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiol Plantarum* 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 CO₂ of spring wheat. *J Plant Physiol* 170:1337-1343
- Gutiérrez E, Gutiérrez D, Morcuende R, Verdejo A, Kostadinova S, Martínez-Carrasco R et al.** (2009b) Changes in leaf morphology and composition with future increases in CO₂ and temperature revisited: wheat in field chambers. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:349-357
- Gutierrez L, Mauriat M, Guenin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R et al.** (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
- Gutteridge S, Gatenby AA** (1995) Rubisco synthesis, assembly, mechanism, and regulation. *Plant Cell* 7:809
- 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

- Haase S, Neumann G, Kania A, Kuzyakov Y, Römheld V, Kandeler E** (2007) Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biol Biochem* 39:2208-2221
- Hachiya T, Sugiura D, Kojima M, Sato S, Yanagisawa S, Sakakibara H et al.** (2014) High CO₂ triggers preferential root growth of *Arabidopsis thaliana* via two distinct systems under low pH and low N stresses. *Plant Cell Physiol* 55:269-280
- Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M et al.** (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* 54:467-475
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98
- Han Y, Zhang W, Zhang B, Zhang S, Wang W, Ming F** (2009) One novel mitochondrial citrate synthase from *Oryza sativa* L. can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco. *Mol Biotechnol* 42:299-305
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks M, Smeekens S** (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant J* 53:935-949
- Hare PE** (1977) Subnanomole-range amino acid analysis. *Methods Enzymol* 47:3-18
- Harmens H, Stirling CM, Marshall C, Farrar JF** (2000) Is partitioning of dry weight and leaf area within *Dactylis glomerata* affected by N and CO₂ enrichment? *Ann Bot* 86:833-839
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T et al.** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113
- 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
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IS et al.** (2012) Functions of macronutrients. In: P Marschner, ed. Marschner's mineral nutrition of higher plants, 3rd edition. *Academic Press*, San Diego, pp 135-189
- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P** (2003) ADP-Glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiol* 133:838-849
- Hendry GAF** (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol* 123:3-14
- 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
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A** (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot* 58:2369-2387
- Ho C-L, Noji M, Saito M, Saito K** (1999) Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*: crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. *J Biol Chem* 274:397-402
- Ho QT, Verboven P, Yin X, Struik PC, Nicolai BM** (2012) A microscale model for combined CO₂ diffusion and photosynthesis in leaves. *PLoS One* 7:e48376
- Högy P, Wieser H, Köhler P, Schwadorf K, Breuer J, Erbs M et al.** (2009a) Does elevated atmospheric CO₂ allow for sufficient wheat grain quality in the future? *J Appl Bot Food Qual* 82:8
- Högy P, Wieser H, Köhler P, Schwadorf K, Breuer J, Franzaring J et al.** (2009b) Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment. *Plant Biology* 11 Suppl 1:60-69
- Horneck DA, Miller RO** (1998) Determination of total nitrogen in plant tissue. In: YP Karla, ed. Handbook of reference methods for plant analysis. *CRC Press*, Boca Raton, USA, pp 75-83
- Howard TP, Lloyd JC, Raines CA** (2011) Inter-species variation in the oligomeric states of the higher plant Calvin cycle enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase. *J Exp Bot* 62:3799-3805
- Howles PA, Birch RJ, Collings DA, Gebbie LK, Hurley UA, Hocart CH et al.** (2006) A mutation in an Arabidopsis ribose 5-phosphate isomerase reduces cellulose synthesis and is rescued by exogenous uridine. *Plant J* 48:606-618
- Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl M, Masanetz S, Borghi L et al.** (2011) RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12:156
- Huang S, Sirikhachornkit A, Faris JD, Su X, Gill BS, R. H et al.** (2002) Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. *Plant Mol Biol* 48:805-820

- Huang XQ, Brûlé-Babel A** (2010) Development of genome-specific primers for homoeologous genes in allopolyploid species: the waxy and starch synthase II genes in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) as examples. *BMC Res Notes* 3:140
- Hungate BA, Dukes JS, Shaw MR, Luo Y, Field CB** (2003) Nitrogen and climate change. *Science* 302:1512-1513
- Ifuku K, Endo T, Shikanai T, Aro E-M** (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol* 52:1560-1568
- Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S et al.** (2003) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. *Plant J* 33:975-987
- Igarashi D, Tsuchida H, Miyao M, Ohsumi C** (2006) Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiol* 142:901-910
- 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* 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
- 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. *Cambridge University Press*, New York, USA
- Irving LJ, Robinson D** (2006) A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. *New Phytol* 169:493-504
- IWGSC** (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345
- Jablonski LM, Wang X, Curtis PS** (2002) Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytol* 156:9-26
- Jackson RB, Reynolds HL** (1996) Nitrate and ammonium uptake for single- and mixed-species communities grown at elevated CO₂. *Oecologia* 105:74-80
- Jain V, Khetarpal S, Das R, Abrol Y** (2011) Nitrate assimilation in contrasting wheat genotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17:137-144
- Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR** (2009) Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Cell* 21:595-606
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5-19
- Jang JC, Sheen J** (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6:1665-1679
- Jensen RG** (2000) Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO₂. *P Natl Acad Sci USA* 97:12937-12938
- Jiang Q, Hou J, Hao C, Wang L, Ge H, Dong Y et al.** (2011) The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits. *Funct Integr Genomics* 11:49-61
- Jifon JL, Wolfe DW** (2002) Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. is altered by growth response to nitrogen supply. *Global Change Biol* 8:1018-1027
- Johansson EM, Fransson PMA, Finlay RD, van Hees PAW** (2009) Quantitative analysis of soluble exudates produced by ectomycorrhizal roots as a response to ambient and elevated CO₂. *Soil Biol Biochem* 41:1111-1116
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM** (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275-282
- 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
- Jones PG, Raines CA, Lloyd JC** (1995) Nucleotide sequence of a wheat chloroplastic phosphoglycerate kinase gene. *Plant Physiol* 107:1483-1484
- Joye IJ, Beliën T, Brijs K, Proost P, Soetaert W, Delcour JA** (2010) Characterisation of the first wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase resembling mammalian counterparts. *J Cereal Sci* 51:326-336
- Kaiser WM, Huber SC** (1994) Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol* 106:817-821
- Kaiser WM, Huber SC** (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52:1981-1989
- 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

- Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai CB, Rockel P, Sonoda M et al.** (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J Exp Bot* 53:875-882
- Kamber L, Feller U** (1998) Influence of the activation status and of ATP on phosphoribulokinase degradation. *J Exp Bot* 49:139-144
- Kamiji Y, Pang J, Milroy SP, Palta JA** (2014) Shoot biomass in wheat is the driver for nitrogen uptake under low nitrogen supply, but not under high nitrogen supply. *Field Crop Res* 165:92-98
- Kaplan F, Zhao W, Richards JT, Wheeler RM, Guy CL, Levine LH** (2012) Transcriptional and metabolic insights into the differential physiological responses of Arabidopsis to optimal and supraoptimal atmospheric CO₂. *PLoS One* 7:e43583
- Kawakami A, Yoshida M** (2002) Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:2297-2305
- Kawakami A, Yoshida M** (2005) Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta* 223:90-104
- Kawakami A, Yoshida M** (2012) Graminan breakdown by fructan exohydrolase induced in winter wheat inoculated with snow mold. *J Plant Physiol* 169:294-302
- Kawakami A, Yoshida M, van den Ende W** (2005) Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358:93
- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ** (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275:741-743
- Khan S, Andralojc PJ, Lea PJ, Parry MAJ** (1999) 2'-carboxy-D-arabitol 1-phosphate protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *Eur J Biochem* 266:840
- Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H** (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J Exp Bot* 62:1399-1409
- Kilian A, Kleinhofs A, Warner RL** (1992) Localization of NAD(P)H-bispecific nitrate reductase genes to chromosomes of barley, rye, wheat and *Aegilops umbellulata*. *Theor Appl Genet* 85:274-275
- Kim H-Y, Lieffering M, Kobayashi K, Okada M, Miura SHU** (2003) Seasonal changes in the effects of elevated CO₂ on rice at three levels of nitrogen supply: a free air CO₂ enrichment (FACE) experiment. *Global Change Biol* 9:826-837
- Kim S-H, Gitz DC, Sicher RC, Baker JT, Timlin DJ, Reddy VR** (2007) Temperature dependence of growth, development, and photosynthesis in maize under elevated CO₂. *Environ Exp Bot* 61:224-236
- Kim SH, Sicher RC, Bae H, Gitz DC, Baker JT, Timlin DJ et al.** (2006) Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. *Global Change Biol* 12:588-600
- Kimball BA, Kobayashi K, Bindi M** (2002) Responses of agricultural crops to free-air CO₂ enrichment. *Adv Agron* 77:293-368
- Kirschbaum MU** (2011) Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiol* 155:117-124
- Kitajima K, Hogan KP** (2003) Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell Environ* 26:857-865
- Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H** (2004) UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol* 134:912-918
- 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
- Koch KE** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:509-540
- Kooiker M, Drenth J, Glassop D, McIntyre CL, Xue G-P** (2013) TaMYB13-1, a R2R3 MYB transcription factor, regulates the fructan synthetic pathway and contributes to enhanced fructan accumulation in bread wheat. *J Exp Bot* 64:3681-3696
- Kopriva S, Koprivova A, Süß K-H** (2000) Identification, cloning, and properties of cytosolic d-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from higher plants. *J Biol Chem* 275:1294-1299
- Kozaki A, Takeba G** (1996) Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature* 384:557-560
- 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
- Krapp A, Fraiser V, Scheible W-R, Quesada A, Gojon A, Stitt M et al.** (1998) Expression studies of *Nrt2:INp*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *Plant J* 14:723-731

- Krapp A, Hofmann B, Schafer C, Stitt M** (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink' regulation of photosynthesis. *Plant J* 3:817-828
- Krapp A, Quick WP, Stitt M** (1991) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta* 186:58-69
- Krapp A, Stitt M** (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the "sink-regulation" of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195:313-323
- Krasileva K, Buffalo V, Bailey P, Pearce S, Ayling S, Tabbita F et al.** (2013) Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biol* 14:R66
- Kruger NJ, von Schaewen A** (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol* 6:236-246
- Kruse J, Hetzger I, Hänsch R, Mendel RR, Walch- Liu P, Engels C et al.** (2002) Elevated $p\text{CO}_2$ favours nitrate reduction in the roots of wild-type tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Gat.) and significantly alters N-metabolism in transformants lacking functional nitrate reductase in the roots. *J Exp Bot* 53:2351-2367
- Kuehny JS, Peet MM, Nelson PV, Willits DH** (1991) Nutrient dilution by starch in CO_2 -enriched *Chrysanthemum*. *J Exp Bot* 42:711-716
- Kumar R, Taware R, Gaur V, Guru S, Kumar A** (2009) Influence of nitrogen on the expression of TaDof1 transcription factor in wheat and its relationship with photosynthetic and ammonium assimilating efficiency. *Mol Biol Rep* 36:2209-2220
- Kutscherra M, Jost W, Schlee D** (1987) Isoenzymes of nitrite reductase in higher plants - occurrence, purification, properties, and alteration during ontogenesis. *J Plant Physiol* 129:383-393
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I et al.** (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7:887-898
- Lambeck IC, Fischer-Schrader K, Niks D, Roesper J, Chi J-C, Hille R et al.** (2012) Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *J Biol Chem* 287:4562-4571
- Lancashire PD, Bleiholder H, van den Boom T, Langelüddeke P, Stauss R, Weber E et al.** (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann Appl Biol* 119:561-601
- Lancien M, Ferrario-Méry S, Roux Y, Bismuth E, Masclaux C, Hirel B et al.** (1999) Simultaneous expression of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and other Krebs cycle genes after nitrate resupply to short-term nitrogen-starved tobacco. *Plant Physiol* 120:717-726
- Lancien M, Gadal P, Hodges M** (2000) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol* 123:817-824
- Lancien M, Lea PJ, Azevedo RA** (2006) Amino acid synthesis in plastids. In: R Wise, JK Hooper, eds. The structure and function of plastids, Vol 23. *Springer Netherlands*, pp 355-385
- Larios B, Agüera E, de la Haba P, Pérez-Vicente R, Maldonado JM** (2001) A short-term exposure of cucumber plants to rising atmospheric CO_2 increases leaf carbohydrate content and enhances nitrate reductase expression and activity. *Planta* 212:305-312
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
- Law RD, Crafts Brandner SJ** (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* 120:173-181
- Lea US, Leydecker M-T, Quilleré I, Meyer C, Lillo C** (2006) Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiol* 140:1085-1094
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR** (2009a) Elevated CO_2 effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *J Exp Bot* 60:2859-2876
- Leakey ADB, Xu F, Gillespie KM, McGrath JM, Ainsworth EA, Ort DR** (2009b) Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *P Natl Acad Sci USA* 106:3597-3602
- Lee S-K, Jeon J-S, Börnke F, Voll L, Cho J-I, Goh C-H et al.** (2008) Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Environ* 31:1851-1863
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel Vedele F et al.** (1999) Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J* 18:509-519
- Lekshmy S, Jain V, Khetarpal S, Pandey R** (2013) Inhibition of nitrate uptake and assimilation in wheat seedlings grown under elevated CO_2 . *Ind J Plant Physiol* 18:23-29

- Lekshmy S, Vanita J, Sangeeta K, Pandey R, Rajendra S** (2009) Effect of elevated carbon dioxide on kinetics of nitrate uptake in wheat roots. *Ind J Plant Physiol* 14:16-22
- Lemaître T, Urbanczyk Wochniak E, Flesch V, Bismuth E, Fernie AR, Hodges M** (2007) NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiol* 144:1546-1558
- Leterrier M, Holappa L, Broglie K, Beckles D** (2008) Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol* 8:98
- Li F, Kang S, Zhang J** (2003) CO₂ enrichment on biomass accumulation and nitrogen nutrition of spring wheat under different soil nitrogen and water status. *J Plant Nutr* 26:769-788
- Li J, Zhou J-M, Duan Z-Q** (2007a) Effects of elevated CO₂ concentration on growth and water usage of tomato seedlings under different ammonium/nitrate ratios. *J Environ Sci* 19:1100-1107
- Li P, Ainsworth EA, Leakey ADB, Ulanov A, Lozovaya V, Ort DR et al.** (2008) *Arabidopsis* transcript and metabolite profiles: ecotype-specific responses to open-air elevated CO₂. *Plant Cell Environ* 31:1673-1687
- Li P, Sioson A, Mane S, Ulanov A, Grothaus G, Heath L et al.** (2006) Response diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes in elevated [CO₂] in the field. *Plant Mol Biol* 62:593-609
- Li WB, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM** (2007b) Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol* 143:425-433
- Li X, Zhang G, Sun B, Zhang S, Zhang Y, Liao Y et al.** (2013) Stimulated leaf dark respiration in tomato in an elevated carbon dioxide atmosphere. *Sci Rep* 3:3433
- Lidon F, Almeida A, Leitão A, Silva M, Pinheiro N, Maças B et al.** (2014) A synoptic overview of durum wheat production in the Mediterranean region and processing following the European Union requirements. *Emir J Food Agric* 26:693-705
- Lilley RM, Walker DA** (1974) An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase. *Biochim Biophys Acta* 358:226-229
- Lindroth P, Mopper K** (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal Chem* 51:1667-1674
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method. *Methods* 25:402-408
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the preparation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 163:16-20
- Loladze I** (2002) Rising atmospheric CO₂ and human nutrition: toward globally imbalanced plant stoichiometry? *Trends Ecol Evol* 17:457-461
- Long SP** (1991) Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: has its importance been underestimated? *Plant Cell Environ* 14:729-739
- 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 X-Y, Wang J-R, Ouellet T, Rocheleau H, Wei Y-M, Pu Z-E et al.** (2010) Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat. *Plant Mol Biol* 74:307-311
- Loqué D, von Wirén N** (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* 55:1293-1305
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem* 193:265-275
- Ludewig F, Sonnewald U** (2000) High CO₂-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Lett* 479:19-24
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH** (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and *CAT* gene expression in wheat. *J Exp Bot* 56:417-423
- Lunn JE** (2003) Sucrose-phosphatase gene families in plants. *Gene* 303:187-196
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D et al.** (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 397:139-148
- Luo J, Li H, Liu T, Polle A, Peng C, Luo Z-B** (2013) Nitrogen metabolism of two contrasting poplar species during acclimation to limiting nitrogen availability. *J Exp Bot* 64:4207-4224
- Luo Y, Su BO, Currie W, Dukes J** (2004) Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *Bioscience* 54:731
- Lloyd JC, Horsnell PR, Dyer TA, Raines CA** (1991) Structure and sequence of a wheat phosphoribulokinase gene. *Plant Mol Biol* 17:167-168

- MacFarling Meure C, Etheridge D, Trudinger C, Steele P, Langenfelds R, van Ommen T et al.** (2006) Law Dome CO₂, CH₄ and N₂O ice core records extended to 2000 years BP. *Geophys Res Lett* 33:L14810
- Maciaga M, Paszkowski A** (2004) Genetic control of aspartate aminotransferase isoenzymes in *Aegilops* and *Triticum* species. *J Appl Genet* 45:411-417
- MacKintosh C** (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1137:121-126
- Maeda H, Dudareva N** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63:73-105
- Majeau N, Coleman JR** (1994) Correlation of carbonic anhydrase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiol* 104:1393-1399
- Makino A, Harada M, Sato T, Nakano H, Mae T** (1997a) Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiol* 115:199-203
- Makino A, Mae T** (1999) Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant Cell Physiol* 40:999-1006
- Makino A, Mae T, Ohira K** (1984) Relation between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant Cell Physiol* 25:429-437
- Makino A, Osmond B** (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol* 96:355-362
- Makino A, Shimada T, Takumi S, Kaneko K, Matsuoka M, Shimamoto K et al.** (1997b) 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
- Manderscheid R, Bender J, Jäger HJ, Weigel HJ** (1995) Effects of season long CO₂ enrichment on cereals. II. Nutrient concentrations and grain quality. *Agric Ecosyst Environ* 54:175-185
- Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M, The International Wheat Genome Sequencing Consortium et al.** (2014) Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* 345
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C et al.** (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39:D225-D229
- Marillia EF, Micallef BJ, Micallef M, Weninger A, Pedersen KK, Zou J et al.** (2003) Biochemical and physiological studies of *Arabidopsis thaliana* transgenic lines with repressed expression of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase1. *J Exp Bot* 54:259-270
- Markelz RJC, Lai LX, Vosseler LN, Leakey ADB** (2014a) Transcriptional reprogramming and stimulation of leaf respiration by elevated CO₂ concentration is diminished, but not eliminated, under limiting nitrogen supply. *Plant Cell Environ* 37:886-898
- Markelz RJC, Vosseler LN, Leakey ADB** (2014b) Developmental stage specificity of transcriptional, biochemical and CO₂ efflux responses of leaf dark respiration to growth of *Arabidopsis thaliana* at elevated [CO₂]. *Plant Cell Environ* 37:2542-2552
- Maroco JP, Edwards GE, Ku MS** (1999) Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. *Planta* 210:115-125
- Marri L, Pesaresi A, Valerio C, Lamba D, Pupillo P, Trost P et al.** (2010) *In vitro* characterization of *Arabidopsis* CP12 isoforms reveals common biochemical and molecular properties. *J Plant Physiol* 167:939-950
- Martin W, Scheibe R, Schnarrenberger C** (2000) The Calvin cycle and its regulation. In: RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer, eds. Photosynthesis: physiology and metabolism, Vol 9. *Kluwer Academic Publishers*, pp 133-146
- 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
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gauffichon L, Suzuki A** (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* 105:1141-1157
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J et al.** (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol* 140:444-456
- Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stütt M** (2001) Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant Cell Environ* 24:1119-1137
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-668
- McCleary BV, Blakeney AB** (1999) Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Foods World* 44:398-406

- McDonald EP, Erickson JE, Kruger EL** (2002) Can decreased transpiration limit plant nitrogen acquisition in elevated CO₂? *Funct Plant Biol* 29:1115-1120
- McGuire AD, Melillo JM, Joyce LA** (1995) The role of nitrogen in the response of forest net primary production to elevated atmospheric carbon dioxide. *Annu Rev Ecol Syst* 26:473-503
- McMaster GS, LeCain DR, Morgan JA, Aiguo L, Hendrix DL** (1999) Elevated CO₂ increases wheat CER, leaf and tiller development, and shoot and root growth. *J Agron Crop Sci* 183:119-128
- Mehta P, Allakhverdiev S, Jajoo A** (2010) Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynth Res* 105:249-255
- Méndez AM, Castillo D, Del Pozo A, Matus I, Morcuende R** (2011) Differences in stem soluble carbohydrate contents among recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) of barley under drought in a Mediterranean-type environment. *Agron Res* 9:433-438
- Mi G, Chen F, Zhang F** (2008) Multiple signaling pathways control nitrogen-mediated root elongation in maize. *Plant Signaling Behav* 3:1030-1032
- Millar AH, Hill SA, Leaver CJ** (1999) Plant mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex: purification and characterization in potato. *Biochem J* 343:327-334
- Millar AH, Knorpp C, Leaver CJ, Hill SA** (1998) Plant mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex: purification and identification of catalytic components in potato. *Biochem J* 334:571-576
- Miller A, Tsai CH, Hemphill D, Endres M, Rodermel S** (1997) Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny - a new perspective on acclimation. *Plant Physiol* 115:1195-1200
- Miyazaki S, Fredricksen M, Hollis KC, Poroyko V, Shepley D, Galbraith DW et al.** (2004) Transcript expression profiles of *Arabidopsis thaliana* grown under controlled conditions and open-air elevated concentrations of CO₂ and of O₃. *Field Crop Res* 90:47-59
- Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP** (2011) *In silico* analysis of transcription factor repertoires and prediction of stress-responsive transcription factors from six major gramineae plants. *DNA Res* 18:321-332
- Moolna A, Bowsher CG** (2010) The physiological importance of photosynthetic ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase (FNR) isoforms in wheat. *J Exp Bot* 61:2669-2681
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX et al.** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300:332-336
- Moore BD, Cheng SH, Sims D, Seemann JR** (1999) The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ* 22:567-582
- Morcuende R, Kostadinova S, Pérez P, Martín del Molino IM, 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, Kostadinova S, Pérez P, Martínez-Carrasco R** (2005) Fructan synthesis is inhibited by phosphate in warm-grown, but not in cold-treated, excised barley leaves. *New Phytol* 168:567-574
- Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M** (1998) Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of alpha-oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* 206:394-409
- Morcuende R, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Gutiérrez E** (2011) Nitrogen modulates the diurnal regulation of nitrate reductase in wheat plants - projections towards climate change. *Agron Res* 9 443-450
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G** (2001) Carbonic anhydrase in plants and algae. *Plant Cell Environ* 24:141-153
- Morrell S, Rees TA** (1986) Control of the hexose content of potato tubers. *Phytochemistry* 25:1073-1076
- Mott KA** (1988) Do stomata respond to CO₂ concentrations other than intercellular? *Plant Physiol* 86:200-203
- Moyano TC, Vidal EA, Contreras-López O, Gutiérrez RA** (2015) Constructing simple biological networks for understanding complex high-throughput data in plants. In: JM Alonso, AN Stepanova, eds. Plant functional genomics: methods and protocols, 2nd edition, Vol 1284. *Humana Press*, New York, pp 503-526
- Mulo P** (2011) Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): structure, function and location. *Biochim Biophys Acta* 1807:927-934
- Müller J, Aeschbacher RA, Sprenger N, Boller T, Wiemken A** (2000) Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiol* 123:265-274
- Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Morán-Zorzano MT, Viale AM, Etxeberria E, Alonso-Casajús N et al.** (2005) Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant Cell Physiol* 46:1366-1376
- Mustroph A, Sonnewald U, Biemelt S** (2007) Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 581:2401-2410
- Mutwil M, Usadel B, Schütte M, Loraine A, Ebenhöf O, Persson S** (2010) Assembly of an interactive correlation network for the Arabidopsis genome using a novel heuristic clustering algorithm. *Plant Physiol* 152:29-43

- Myers SS, Zanobetti A, Kloog I, Huybers P, Leakey ADB, Bloom AJ *et al.* (2014) Increasing CO₂ threatens human nutrition. *Nature* 510:139-142
- 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
- Née G, Zaffagnini M, Trost P, Issakidis-Bourguet E (2009) Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS Lett* 583:2827-2832
- Negi J, Hashimoto-Sugimoto M, Kusumi K, Iba K (2014) New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol* 55:241-250
- Neuhäuser B, Dynowski M, Ludewig U (2009) Channel-like NH₃ flux by ammonium transporter AtAMT2. *FEBS Lett* 583:2833-2838
- Nie GY, 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, García RL, Kimball BA, Lamorte RL, Pinter PJ *et al.* (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
- Nielsen T, Rung J, Villadsen D (2004) Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci* 9:556
- Niewiadomski P, Knappe S, Geimer S, Fischer K, Schulz B, Unte US *et al.* (2005) The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* 17:760-775
- Noguchi K, Yoshida K (2008) Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* 8:87-99
- Novriyanti E, Watanabe M, Kitao M, Utsugi H, Uemura A, Koike T (2012) High nitrogen and elevated [CO₂] effects on the growth, defense and photosynthetic performance of two eucalypt species. *Environ Pollut* 170:124-130
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol Plant* 3:973-996
- Okamoto M, Kumar A, Li WB, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM *et al.* (2006) High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol* 140:1036-1046
- Onoda Y, Hikosaka K, Hirose T (2005) Seasonal change in the balance between capacities of RuBP carboxylation and RuBP regeneration affects CO₂ response of photosynthesis in *Polygonum cuspidatum*. *J Exp Bot* 56:755-763
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F *et al.* (2006) Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol* 142:1304-1317
- Orzechowski S (2008) Starch metabolism in leaves. *Acta Biochim Pol* 55:435-445
- Oscarson P (2000) The strategy of the wheat plant in acclimating growth and grain production to nitrogen availability. *J Exp Bot* 51:1921-1929
- Osuna D, Usadel B, Morcuende R, Gibon Y, Bläsing OE, Höhne M *et al.* (2007) Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. *Plant J* 49:463-491
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG *et al.* (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res* 36:W163-W169
- Pal M, Rao LS, Jain V, Srivastava AC, Pandey R, Raj A *et al.* (2005) Effects of elevated CO₂ and nitrogen on wheat growth and photosynthesis. *Biol Plantarum* 49:467-470
- Pallardy SG (2008) Nitrogen metabolism. In: SG Pallardy, ed. Physiology of woody plants, 3rd edition. Academic Press, San Diego, pp 233-254
- Pang J, Zhu J-G, Xie Z-B, Liu G, Zhang Y-L, Chen G-P *et al.* (2006) A new explanation of the N concentration decrease in tissues of rice (*Oryza sativa* L.) exposed to elevated atmospheric pCO₂. *Environ Exp Bot* 57:98-105
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol* 10:11
- 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, Reynolds M, Salvucci ME, Raines C, Andralojc PJ, Zhu XG *et al.* (2011) Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *J Exp Bot* 62:453-467
- Parry MAJ, Keys AJ, Madgwick PJ, Carmo-Silva AE, Andralojc PJ (2007) Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J Exp Bot* 59:1569-1580
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annu Rev Plant Biol* 59:417-441

- Pavlopoulou A, Michalopoulos I** (2011) State-of-the-art bioinformatics protein structure prediction tools. *Int J Mol Med* 28:295-310
- Pearman I, Thomas SM, Thorne GN** (1978) Effect of nitrogen fertilizer on growth and yield of semi-dwarf and tall varieties of winter wheat. *J Agr Sci* 91:31-45
- Peleg Z, Fahima T, Korol A, Abbo S, Saranga Y** (2011) Genetic analysis of wheat domestication and evolution under domestication. *J Exp Bot* 62:5051-5061
- Peng J, Sun H, Nevo E** (2011) Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol Breeding* 28:281-301
- 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 k_{cat} in wheat. *Plant Growth Regul* 65:439-447
- Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez de la Puente L** (1983) Uptake and distribution of nitrogen in wheat plants supplied with different amounts of nitrogen after stem elongation. *Ann Appl Biol* 102:399-406
- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino IM, 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, Morcuende R, Martín del Molino IM, Sánchez de la Puente L, Martínez-Carrasco R** (2001) Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. *Physiol Plantarum* 112:478-486
- 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 scabrida* leaves. *J Exp Bot* 62:895
- Pérez P, Zita G, Morcuende R, Martínez Carrasco R** (2007) Elevated CO₂ and temperature differentially affect photosynthesis and resource allocation in flag and penultimate leaves of wheat. *Photosynthetica* 45:9-17
- Peterson AG, Ball JT, Luo Y, Field CB, Reich PB, Curtis PS et al.** (1999) The photosynthesis – leaf nitrogen relationship at ambient and elevated atmospheric carbon dioxide: a meta-analysis. *Global Change Biol* 5:331-346
- Peterson GL** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356
- Pettersson R, McDonald AJS** (1994) Effects of nitrogen supply on the acclimation of photosynthesis to elevated CO₂. *Photosynth Res* 39:389-400
- Phillips DA, Fox TC, Six J** (2006) Root exudation (net efflux of amino acids) may increase rhizodeposition under elevated CO₂. *Global Change Biol* 12:561-567
- Plaxton WC** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:185-214
- Polley HW, Johnson HB, Tischler CR, Torbert HA** (1999) Links between transpiration and plant nitrogen: variation with atmospheric CO₂ concentration and nitrogen availability. *Int J Plant Sci* 160:535-542
- 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
- Pont C, Murat F, Confolent C, Balergue S, Salse J** (2011) RNA-seq in grain unveils fate of neo- and paleopolyploidization events in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome Biol* 12:R119
- Poorter H, Roumet C, Campbell BD** (1996) Interspecific variation in the growth response of plants to elevated CO₂: a search for functional types. In: CKA Bazzaz, ed. Carbon dioxide, populations, and communities. *Academic Press*, San Diego, pp 375-412
- Poorter H, van Berkel Y, Baxter R, den Hertog J, Dijkstra P, Gifford RM et al.** (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** (2003) Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res* 75:11
- Portis AR, Li CS, Wang DF, Salvucci ME** (2007) Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J Exp Bot* 59:1597-1604
- Portis AR, Parry MAJ** (2007) Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth Res* 94:121-143
- Prentice IC, G.D. Farquhar GD, Fasham MJR, Goulden ML, Heimann M, Jaramillo VJ et al.** (2001) The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. In: J Houghton, Y Ding, D Griggs, M Noguer, PJ van der Linden, X Dai, K Maskell, CA Johnson, eds. Climate Change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Cambridge University Press*, New York, pp 185-237
- Price GD, Badger MR, von Caemmerer S** (2011) The prospect of using cyanobacterial bicarbonate transporters to improve leaf photosynthesis in C₃ crop plants. *Plant Physiol* 155:20-26

- Prins A, Mukubi JM, Pellny TK, Verrier PJ, Beyene G, Lopes MS et al.** (2011) Acclimation to high CO₂ in maize is related to water status and dependent on leaf rank. *Plant Cell Environ* 34:314-331
- Pritchard SG, Rogers HH** (2000) Spatial and temporal deployment of crop roots in CO₂-enriched environments. *New Phytol* 147:55-71
- Quackenbush J, Cho J, Lee D, Liang F, Holt I, Karamycheva S et al.** (2001) The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Res* 29:159-164
- Quick WP, Fichtner K, Schulze ED, Wendler R, Leegood RC, Mooney H et al.** (1992) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" rbcS . IV. Impact on photosynthesis in conditions of altered nitrogen supply. *Planta* 188:522-531
- R Development Core Team** (2008) R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria
- Rachmilevitch S, Cousins AB, Bloom AJ** (2004) Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *P Natl Acad Sci USA* 101:11506-11510
- Raines CA, Lloyd JC, Dyer TA** (1999) New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; an important but neglected Calvin cycle enzyme. *J Exp Bot* 50:1-8
- Raines CA, Lloyd JC, Willingham NM, Potts S, Dyer TA** (1992) cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *Eur J Biochem* 205:1053-1059
- Rajinikanth M, Harding SA, Tsai C-J** (2007) The glycine decarboxylase complex multienzyme family in *Populus*. *J Exp Bot* 58:1761-1770
- Rawson HM, Gifford RM, Condon BN** (1995) Temperature gradient chambers for research on global environment change. I. Portable chambers for research on short-stature vegetation. *Plant Cell Environ* 18:1048-1054
- Reich PB, Hobbie SE** (2012) Decade-long soil nitrogen constraint on the CO₂ fertilization of plant biomass. *Nat Clim Change* 3:278-282
- Reich PB, Hobbie SE, Lee T, Ellsworth DS, West JB, Tilman D et al.** (2006) Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature* 440:922-925
- Remm M, Storm CEV, Sonnhammer ELL** (2001) Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol* 314:1041-1052
- Ristic Z, Momcilovic I, Bukovnik U, Prasad PVV, Fu J, Deridder B et al.** (2009) Rubisco activase and wheat productivity under heat-stress conditions. *J Exp Bot* 60:4003-4014
- Ritchie RJ** (2006) Estimation of cytoplasmic nitrate and its electrochemical potential in barley roots using ¹³NO₃⁻ and compartmental analysis. *New Phytol* 171:643-655
- Rochaix J-D** (2011) Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim Biophys Acta* 1807:375-383
- Rodríguez-López M, Baroja-Fernández E, Zanduetta-Criado A, Pozueta-Romero J** (2000) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis. *P Natl Acad Sci USA* 97:8705-8710
- Rogers GS, Milham PJ, Gillings M, Conroy JP** (1996) Sink strength may be the key to growth and nitrogen responses in N-deficient wheat at elevated CO₂. *Aust J Plant Physiol* 23:253-264
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Wang K, Ryu C-M, Kaundal A, Mysore KS** (2012) Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:675-709
- Rosenthal DM, Ruiz-Vera UM, Siebers MH, Gray SB, Bernacchi CJ, Ort DR** (2014) Biochemical acclimation, stomatal limitation and precipitation patterns underlie decreases in photosynthetic stimulation of soybean (*Glycine max*) at elevated [CO₂] and temperatures under fully open air field conditions. *Plant Sci* 226:136-146
- Rubio-Asensio JS, Rachmilevitch S, Bloom AJ** (2015) Responses of Arabidopsis and wheat to rising CO₂ depend on nitrogen source and nighttime CO₂ levels. *Plant Physiol* 168:156-163
- Rüdiger W, Grimm B** (2006) Chlorophyll metabolism, an overview. In: B Grimm, RJ Porra, W Rüdiger, H Scheer, eds. Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications, Vol 25. *Springer Netherlands*, pp 133-146
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB et al.** (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45
- Ruiz-Vera UM, Siebers M, Gray SB, Drag DW, Rosenthal DM, Kimball BA et al.** (2013) Global warming can negate the expected CO₂ stimulation in photosynthesis and productivity for soybean grown in the Midwestern United States. *Plant Physiol* 162:410-423
- Sage RF, Kubien DS** (2007) The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant Cell Environ* 30:1086-1106

- Sailo N, Verma R, Pandey R, Jain V** (2013) Effect of elevated carbon dioxide on nitrogen assimilation and mobilization in wheat and rye genotypes of different ploidy levels. *Ind J Plant Physiol* 18:333-338
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Salvucci M** (2008) Association of Rubisco activase with chaperonin-60 β : a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *J Exp Bot* 59:1923-1933
- Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ** (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiol Plantarum* 120:179-186
- Salvucci ME, Ogren WL** (1996) The mechanism of Rubisco activase: insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynth Res* 47:1-11
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY
- Sasanuma T** (2001) Characterization of the *rbcS* multigene family in wheat: subfamily classification, determination of chromosomal location and evolutionary analysis. *Mol Genet Genomics* 265:161-171
- Sato S, Yanagisawa S** (2014) Characterization of metabolic states of *Arabidopsis thaliana* under diverse carbon and nitrogen nutrient conditions via targeted metabolomic analysis. *Plant Cell Physiol* 55:306-319
- Scheible W-R, González-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboche M, Stitt M** (1997a) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9:783-798
- Scheible W-R, González-Fontes A, Morcuende R, Lauerer M, Geiger M, Glaab J et al.** (1997b) Tobacco mutants with a decreased number of functional *nia* genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta* 203:304-319
- Scheible W-R, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M, Stitt M** (1997c) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J* 11:671-691
- Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios Rojas N et al.** (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol* 136:2483-2499
- Schmittgen TD, Livak KJ** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 3:1101-1108
- Schulze S, Mant A, Kossmann J, Lloyd JR** (2004) Identification of an *Arabidopsis* inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. *FEBS Lett* 565:101-105
- Schulze W, Schulze ED, Stadler J, Heilmeyer H, Stitt M, Mooney HA** (1994) Growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate-uptake-deficient mutants. *Plant Cell Environ* 17:795-809
- Schwarte S, Bauwe H** (2007) Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144:1580-1586
- Schwartz B, Sloan J, Becker W** (1991) Characterization of genes encoding hydroxypyruvate reductase in cucumber. *Plant Mol Biol* 17:941-947
- Segonzac C, Boyer JC, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B et al.** (2007) Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell* 19:3760-3777
- Seneweera S** (2011) Reduced nitrogen allocation to expanding leaf blades suppresses ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis and leads to photosynthetic acclimation to elevated CO₂ in rice. *Photosynthetica* 49:145-148
- Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y** (2011) New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: the role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environ Exp Bot* 71:128-136
- Shangguan Z, Shao M, Dyckmans J** (2000) Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *J Plant Physiol* 156:46-51
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D et al.** (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498-2504
- Sharkey TD** (1985) Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot Rev* 51:53-105
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant Cell Environ* 30:1035-1040
- Sharkey TD, Savitch LV, Butz ND** (1991) Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of Rubisco. *Photosynth Res* 28:41-48
- Sharma P, Ganeshan S, Fowler DB, Chibbar RN** (2013) Characterisation of two wheat enolase cDNA showing distinct patterns of expression in leaf and crown tissues of plants exposed to low temperature. *Ann Appl Biol* 162:271-283
- Sharma S, Sreenivasulu N, Harshavardhan V, Seiler C, Sharma S, Khalil Z et al.** (2010) Delineating the structural, functional and evolutionary relationships of sucrose phosphate synthase gene family II in wheat and related grasses. *BMC Plant Biol* 10:134

- Shaw L, McIntyre C, Gresshoff P, Xue G-P** (2009) Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. *Funct Integr Genomics* 9:485-498
- Sheen J, Zhou L, Jang JC** (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2:410-418
- Shimono H, Bunce JA** (2009) Acclimation of nitrogen uptake capacity of rice to elevated atmospheric CO₂ concentration. *Ann Bot* 103:87-94
- Sicher RC** (2001) Responses of nitrogen metabolism in N-sufficient barley primary leaves to plant growth in elevated atmospheric carbon dioxide. *Photosynth Res* 68:193-201
- Sicher RC, Bunce JA** (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, Bunce JA** (2008) Growth, photosynthesis, nitrogen partitioning and responses to CO₂ enrichment in a barley mutant lacking NADH-dependent nitrate reductase activity. *Physiol Plantarum* 134:31-40
- Sims DA, Luo Y, Seemann JR** (1998) Comparison of photosynthetic acclimation to elevated CO₂ and limited nitrogen supply in soybean. *Plant Cell Environ* 21:945-952
- Sinha PG, Saradhi PP, Uprety DC, Bhatnagar AK** (2011) Effect of elevated CO₂ concentration on photosynthesis and flowering in three wheat species belonging to different ploidies. *Agric Ecosyst Environ* 142:432-436
- Slocum RD** (2005) Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiol Bioch* 43:729-745
- Smart DR, Ritchie K, Bloom AJ, Bugbee BB** (1998) Nitrogen balance for wheat canopies (*Triticum aestivum* cv. Veery 10) grown under elevated and ambient CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ* 21:753-763
- Smeeckens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:49-81
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30:1126-1149
- Smith JL, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Cramer WA** (2004) Cytochrome bc complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces. *Curr Opin Struct Biol* 14:432-439
- Sorokhtin OG, Chilingarian GV, Sorokhtin NO** (2011) Evolution of Earth and its climate: birth, life and death of Earth. *Elsevier*, Oxford, UK
- Spannagl M, Martis M, Pfeifer M, Nussbaumer T, Mayer K** (2013) Analysing complex *Triticeae* genomes - concepts and strategies. *Plant Methods* 9:35
- Spreitzer RJ, Salvucci ME** (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu Rev Plant Biol* 53:449-475
- Stepansky A, Leustek T** (2006) Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids* 30:127-142
- Stephenson T, McIntyre C, Collet C, Xue G-P** (2011) *TaNf-YB3* is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Triticum aestivum*. *Funct Integr Genomics* 11:327-340
- Stitt M** (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ* 14:741-762
- Stitt M, Bulpin PV, ap Rees T** (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta* 544:200-214
- 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, Kürzel B, Heldt HW** (1984) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate: II. Partitioning between sucrose and starch. *Plant Physiol* 75:554-560
- Stitt M, Lilley R, Gerhardt R, Heldt H** (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol* 174:518-552
- Stitt M, Lunn J, Usadel B** (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *Plant J* 61:1067-1091
- Stitt M, Müller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R et al.** (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* 53:959-970
- Stitt M, Zeeman SC** (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* 15:282-292
- Sturm A** (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 121:1-8
- Sturm A, Lienhard S, Schatt S, Hardegger M** (1999) Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Mol Biol* 39:349-360
- Sun J, Bankston JR, Payandeh J, Hinds TR, Zagotta WN, Zheng N** (2014) Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507:73-77
- Sun JY, Chen YM, Wan QM, Chen J, Wang XC** (2006) Glucose inhibits the expression of triose phosphate/phosphate translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1102-1113
- Suzuki Y, Makino A** (2013) Translational downregulation of *RBCL* is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. *J Exp Bot*

- Suzuki Y, Makino A, Mae T** (2001a) 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
- Suzuki Y, Makino A, Mae T** (2001b) An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. *J Exp Bot* 52:1575-1579
- Suzuki Y, Nakabayashi K, Yoshizawa R, Mae T, Makino A** (2009) Differences in expression of the *RBCS* multigene family and Rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. *Plant Cell Physiol* 50:1851-1855
- Szabados L, Savoure A** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15:89-97
- Taiz L, Zeiger E** (2010) Plant Physiology, 5th Edition. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts
- Takatani N, Ito T, Kiba T, Mori M, Miyamoto T, Maeda S-I et al.** (2014) Effects of high CO₂ on growth and metabolism of *Arabidopsis* seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen. *Plant Cell Physiol* 55:281-292
- Tallis MJ, Lin Y, Rogers A, Zhang J, Street NR, Miglietta F et al.** (2010) The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂ reveals increased anthocyanin biosynthesis during delayed autumnal senescence. *New Phytol* 186:415-428
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Rep* 28:2731-2739
- Tanaka R, Tanaka A** (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:321-346
- Taub DR, Seemann JR, Coleman JS** (2000) Growth in elevated CO₂ protects photosynthesis against high-temperature damage. *Plant Cell Environ* 23:649-656
- Taub DR, 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 et al.** (2005) The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytol* 167:143-154
- Taylor TC, Fothergill MD, Andersson I** (1996) A common structural basis for the inhibition of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase by 4-carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate and xylulose 1,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 271:32894
- Temple SJ, Vance CP, Stephen Gantt J** (1998) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci* 3:51-56
- Tenea G, Peres Bota A, Cordeiro Raposo F, Maquet A** (2011) Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions. *BMC Res Notes* 4:373
- 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
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815
- Theobald JC, Mitchell RAC, Parry MAJ, Lawlor DW** (1998) Estimating the excess investment in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of spring wheat crown under elevated CO₂. *Plant Physiol* 118:945-955
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P et al.** (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
- Thorne GN** (1974) Physiology of grain yield of wheat and barley. *Rep. Rothamsted exp. Stn. for 1973* Part 2:5-25
- Timm S, Nunes-Nesi A, Pärnik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O et al.** (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2848-2859
- Trevanion SJ, Castleden CK, Foyer CH, Furbank RT, Quick WP, Lund JE** (2004) Regulation of sucrose-phosphate synthase in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Funct Plant Biol* 31:685-695
- Truszkiewicz W, Paszkowski A** (2004) Serine:glyoxylate aminotransferases from maize and wheat leaves: purification and properties. *Photosynth Res* 82:35-47
- Tsai AY, Gazzarrini S** (2014) Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci* 5
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK** (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581:2290-2300
- Tsugeki R, Nishimura M** (1993) Interaction of homologues of Hsp70 and Cpn60 with ferredoxin-NADP⁺ reductase upon its import into chloroplasts. *FEBS Lett* 320:198-202
- Tzin V, Galili G** (2010) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* 3:956-972
- Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, Tran R, Tsai H, Berardi S et al.** (2009) A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biol* 9:115

- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible W-R** (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20:1736-1737
- Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H** (2012) Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *J Exp Bot*
- Uprety DC, Garg SC, Bisht BS, Maini HK, Dwivedi N, Paswan G et al.** (2006) Carbon dioxide enrichment technologies for crop response studies. *J Sci Ind Res* 65:859-866
- Urban O, Pokorný R, Kalina J, Marek MV** (2003) Control mechanisms of photosynthetic capacity under elevated CO₂ concentration: evidence from three experiments with Norway spruce trees. *Photosynthetica* 41:69-75
- Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios Rojas N et al.** (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of coresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol* 138:1195-1204
- Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A, Stitt M** (2009) A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. *Plant Cell Environ* 32:1211-1229
- Valluru R, Lammens W, Claupein W, van den Ende W** (2008) Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends Plant Sci* 13:409-414
- Valluru R, van den Ende W** (2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *J Exp Bot*:1-12
- van den Ende W** (2013) Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Front Plant Sci* 4:1-11
- van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, van Riet L, van Laere A, Yoshida M et al.** (2003a) Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiol* 131:621-631
- van den Ende W, Coopman M, Clerens S, Vergauwen R, Le Roy K, Lammens W et al.** (2011) Unexpected presence of graminan- and levan-type fructans in the evergreen frost-hardy eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae): purification, cloning, and functional analysis of a 6-SST/6-SFT enzyme. *Plant Physiol* 155:603-614
- van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R, van Laere A** (2003b) Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant J* 36:697-710
- van den Ende W, Yoshida M, Clerens S, Vergauwen R, Kawakami A** (2005) Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol* 166:917-932
- van den Heuvel RH, Curti BA, Vanoni MA, Mattevi AA** (2004) Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cell Mol Life Sci* 61:669-681
- van Peer G, Mestdagh P, Vandesompele J** (2012) Accurate RT-qPCR gene expression analysis on cell culture lysates. *Sci Rep* 2
- van Riet L, Altenbach D, Vergauwen R, Clerens S, Kawakami A, Yoshida M et al.** (2008) Purification, cloning and functional differences of a third fructan 1-exohydrolase (1-FEHw3) from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plantarum* 133:242-253
- van Riet L, Nagaraj V, van den Ende W, Clerens S, Wiemken A, van Laere A** (2006) Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* 57:213-223
- van Vuuren MMI, Robinson D, Fitter AH, Chasalow SD, Williamson L, Raven JA** (1997) Effects of elevated atmospheric CO₂ and soil water availability on root biomass, root length, and N, P and K uptake by wheat. *New Phytol* 135:455-465
- Vargas W, Pontis H, Salerno G** (2007) Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. *Planta* 226:1535-1545
- Verspreet J, Cimini S, Vergauwen R, Dornez E, Locato V, Le Roy K et al.** (2013) Fructan metabolism in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels. *Plant Cell Physiol*
- Vicente R, Morcuende R, Babiano J** (2011) Differences in Rubisco and chlorophyll content among tissues and growth stages in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) varieties. *Agron Res* 9:501-507
- Vicente R, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Gutiérrez E, Morcuende R** (2012) Efecto del CO₂ elevado y la disponibilidad de nitrógeno en la absorción de nitrato y el estado nitrogenado en plantas de trigo duro cultivadas en condiciones hidropónicas. In: I Bonilla, P Zornoza, A Gárate, E Marco, R Rivilla, JJ Lucena, eds. La nutrición mineral de las plantas como base de una agricultura sostenible. *Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid*, Madrid, pp 59-65

- Vicente R, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Gutiérrez E, Morcuende R** (2015a) Nitrate supply and plant development influence nitrogen uptake and allocation under elevated CO₂ in durum wheat grown hydroponically. *Acta Physiol Plant* 37:114
- Vicente R, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Usadel B, Kostadinova S, Morcuende R** (2015b) Quantitative RT-PCR platform to measure transcript levels of C and N metabolism-related genes in durum wheat: transcript profiles in elevated [CO₂] and high temperature at different nitrogen supplies. *Plant Cell Physiol* (in press)
- Vijn I, Smeekens S** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* 120:351-359
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M** (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J* 3:315-324
- von Caemmerer S, Farquhar GD** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387
- Vu JCV, Allen LH, Boote KJ, Bowes G** (1997) Effects of elevated CO₂ and temperature on photosynthesis and Rubisco in rice and soybean. *Plant Cell Environ* 20:68-76
- Vu JCV, Gesch RW, Hartwell Allen Jr L, Boote KJ, Bowes G** (1999) CO₂ enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. *J Plant Physiol* 155:139-142
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR** (2007) Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot* 61:199-223
- Wang G-F, Wei X, Fan R, Zhou H, Wang X, Yu C et al.** (2011) Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. *New Phytol* 191:418-431
- Wang H, Liu D, Sun J, Zhang A** (2005) Asparagine synthetase gene *TaASN1* from wheat is up-regulated by salt stress, osmotic stress and ABA. *J Plant Physiol* 162:81-89
- Wang JR, Yan ZH, Zheng YL, Cao WG, Wei YM** (2010) Molecular cloning and phylogenetic analysis of fructose-bisphosphate aldolase (cytoplasmic isozyme) in wheat, barley and rye. *Cereal Res Commun* 38:489-496
- Wang P, Liu J, Liu B, Da Q, Feng D, Su J et al.** (2014) Ferredoxin:thioredoxin reductase is required for proper chloroplast development and is involved in the regulation of plastid gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 7:1586-1590
- Wang Q-M, Chen J, Wang X-C, Sha W, Sun J-Y** (2002) Cloning and expression analysis of triose phosphate/phosphate translocator gene from wheat. *Acta Bot Sin* 44:67-71
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* 12:1491-1510
- Wang R, Okamoto M, Xing XJ, Crawford NM** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 132:556-567
- Wang X, Curtis P** (2002) A meta-analytical test of elevated CO₂ effects on plant respiration. *Plant Ecology* 161:251-261
- Ward DA, Keys AJ** (1989) A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynth Res* 22:167-171
- Watanabe CK, Sato S, Yanagisawa S, Uesono Y, Terashima I, Noguchi K** (2014) Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: possible relationships with respiratory rates. *Plant Cell Physiol* 55:341-357
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J et al.** (2013) Comprehensive dissection of spatio-temporal metabolic shifts in primary, secondary and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 162:1290-1310
- Webber AN, Nie G-Y, Long SP** (1994) Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynth Res* 39:413-425
- Wege S, Jossier M, Filleur S, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Gambale F et al.** (2010) The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO₃⁻/H⁺ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *Plant J* 63:861-869
- Wei H, Gou J, Yordanov Y, Zhang H, Thakur R, Jones W et al.** (2013) Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. *J Plant Res* 126:305-320
- Weigel HJ, Manderscheid R, Jäger HJ, Mejer GJ** (1994) Effects of season-long CO₂ enrichment on cereals. I. Growth performance and yield. *Agric Ecosyst Environ* 48:231-240
- Whitehead SJ, Caporn SJM, Press MC** (1997) Effects of elevated CO₂, nitrogen and phosphorus on the growth and photosynthesis of two upland perennials: *Calluna vulgaris* and *Pteridium aquilinum*. *New Phytol* 135:201-211

- Willingham NM, Lloyd JC, Raines CA** (1994) Molecular cloning of the *Arabidopsis thaliana* sedoheptulose-1,7-bisphosphatase gene and expression studies in wheat and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 26:1191-1200
- Wong S, Osmond C** (1991) Elevated atmosphere partial pressure of CO₂ and plant growth. III. Interactions between *Triticum aestivum* (C₃) and *Echinochloa frumentacea* (C₄) during growth in mixed culture under different CO₂, N nutrition and irradiance treatments, with emphasis on below-ground responses estimated using the δ¹³C value of root biomass. *Aust J Plant Physiol* 18:137-152
- Wu D-X, Wang G-X, Bai Y-F, Liao J-X** (2004) Effects of elevated CO₂ concentration on growth, water use, yield and grain quality of wheat under two soil water levels. *Agric Ecosyst Environ* 104:493-507
- Xu C, Huang B** (2010) Differential proteomic response to heat stress in thermal *Agrostis scabra* and heat-sensitive *Agrostis stolonifera*. *Physiol Plantarum* 139:192-204
- Xu G, Fan X, Miller AJ** (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 63:153-182
- Xu Y, Hall TC** (1993) Cytosolic triosephosphate isomerase is a single gene in rice. *Plant Physiol* 101:683-687
- Xue G-P, Kooiker M, Drenth J, McIntyre CL** (2011) TaMYB13 is a transcriptional activator of fructosyltransferase genes involved in β-2,6-linked fructan synthesis in wheat. *Plant J* 68:857-870
- Yadav UP, Ivakov A, Feil R, Duan GY, Walther D, Giavalisco P et al.** (2014) The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J Exp Bot* 65:1051-1068
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T** (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
- Yong Z, Kotur Z, Glass ADM** (2010) Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J* 63:739-748
- Yu S, Zhang XX, Guan QJ, Takano T, Liu SK** (2007) Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnol Lett* 29:89-94
- Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E et al.** (2007) The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell* 19:2636-2652
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF** (1974) A decimal code for growth stages of cereals. *Weed Res* 14:415-421
- Zaragosi L-E, Wdziekonski B, Brigand K, Villageois P, Mari B, Waldmann R et al.** (2011) Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol* 12:R64
- Zhang DY, Chen GY, Gong ZY, Chen J, Yong ZH, Zhu JG et al.** (2008) Ribulose-1,5-bisphosphate regeneration limitation in rice leaf photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Sci* 175:348-355
- Zhang DY, Chen J** (2009) Photosynthetic acclimation to CO₂ enrichment related to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation limitation in wheat. *Photosynthetica* 47:152-154
- Zhang H, Forde BG** (1998) An *Arabidopsis* MADS Box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409
- Zhang H, Rong H, Pilbeam D** (2007) Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 58:2329-2338
- Zhang X-C, Zhang F-S, Yu X-F, Chen X-P** (2010) Effect of nitrogen nutrition on photosynthetic function of wheat leaf under elevated atmospheric CO₂ concentration. *Acta Agron Sin* 36:1362-1370
- Zhang XC, Yu XF, Ma YF** (2013) Effect of nitrogen application and elevated CO₂ on photosynthetic gas exchange and electron transport in wheat leaves. *Photosynthetica* 51:593-602
- Zhang Y, Xiao W, Luo L, Pang J, Rong W, He C** (2012) Downregulation of *OsPK1*, a cytosolic pyruvate kinase, by T-DNA insertion causes dwarfism and panicle enclosure in rice. *Planta* 235:25-38
- Zhao T, Ni Z, Dai Y, Yao Y, Nie X, Sun Q** (2006) Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Genet Genomics* 276:334-350
- Zhao Z, Assmann SM** (2011) The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 62:5179-5189
- Zhong Y, Yan W, Chen J, Shangguan Z** (2014) Net ammonium and nitrate fluxes in wheat roots under different environmental conditions as assessed by scanning ion-selective electrode technique. *Sci Rep* 4
- Zhu C, Zhu J, Zeng Q, Liu G, Xie Z** (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 C, Ziska L, Zhu J, Zeng Q, Xie Z, Tang H et al.** (2012) The temporal and species dynamics of photosynthetic acclimation in flag leaves of rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) under elevated carbon dioxide. *Physiol Plantarum* 145:395-405
- Zivcak M, Olsovska K, Slamka P, Galambosova J, Rataj V, Shao HS et al.** (2014) Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. *Plant Soil Environ* 60:210-215

