



Universidad de Salamanca
Facultad de Biología
Departamento de Fisiología Vegetal



Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Salamanca
Departamento de Estrés Abiótico

**EFFECTOS DE LOS AUMENTOS DE CO₂ Y
TEMPERATURA DEL AIRE Y LA
DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO SOBRE EL
METABOLISMO DEL CARBONO Y
NITRÓGENO EN PLANTAS DE TRIGO
(*Triticum aestivum* L.)**

Tesis Doctoral

**Elena Gutiérrez Martín
2010**



Universidad de Salamanca
Facultad de Biología
Departamento de Fisiología Vegetal



Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca
Departamento de Estrés Abiótico

**EFFECTOS DE LOS AUMENTOS DE CO₂ Y TEMPERATURA DEL
AIRE Y LA DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO SOBRE EL
METABOLISMO DEL CARBONO Y NITRÓGENO EN PLANTAS DE
TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

TESIS DOCTORAL

ELENA GUTIÉRREZ MARTÍN

2010



UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA
Facultad de Biología
Departamento de
Fisiología Vegetal



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

**EFFECTOS DE LOS AUMENTOS DE CO₂ Y TEMPERATURA DEL
AIRE Y LA DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO SOBRE EL
METABOLISMO DEL CARBONO Y NITRÓGENO EN PLANTAS DE
TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctora en Biología por la
Licenciada
Elena Gutiérrez Martín

Directora

Dra. Rosa María Morcuende Morcuende

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

Tutora

Dra. Nieves Villalobos Juárez

Profesora Titular del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de
Biología de la Universidad de Salamanca

Salamanca, 2010

DÑA. ROSA MARÍA MORCUENDE MORCUENDE, CIENTÍFICA TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

CERTIFICA

Que la memoria titulada "Efectos de los aumentos de CO₂ y temperatura del aire y la disponibilidad de nitrógeno sobre el metabolismo del carbono y nitrógeno en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.)", ha sido realizada por la licenciada Dña. ELENA GUTIÉRREZ MARTÍN bajo mi dirección en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca 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, lo firmo en Salamanca a 7 de Junio de 2010.

Fdo. Dra. Rosa María Morcuende Morcuende

VºBº, la Tutora

Fdo. Dra. Nieves Villalobos Juárez

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una manera u otra, me han prestado su apoyo y colaboración en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quisiera expresar mi gratitud a mi directora de tesis, la Dra. Rosa María Morcuende Morcuende, por su labor de dirección, sus consejos y paciencia, así como su ayuda y dedicación, determinantes para la consecución de este trabajo.

Al Dr. Rafael Martínez-Carrasco por sus consejos, sus valiosas correcciones, su entereza y por su constante buen hacer por el departamento.

A la Dra. Pilar Pérez Pérez por su colaboración, su ánimo y por tener siempre una sonrisa incluso en los momentos más difíciles.

Al Dr. Wolf-Rüdiger Scheible, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo en el Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology. A Regina Feil y a la Dra. María Inés Zahor, por sus enseñanzas, su gran paciencia y su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

A Angel Luis (Verdejo), mi técnico favorito, por su ayuda, su compañerismo, por las conversaciones tan amenas, su confianza y en definitiva, por su amistad.

A Aitor, mi "compi" de laboratorio, por integrarme tan rápido en el centro haciendo que fuese una más al poco tiempo de empezar. A pesar de nuestras redecillas, sé que siempre has estado ahí para todo lo que he necesitado.

A Diego, mi otro "compi", ya parecemos hermanos y no porque nos apellidemos igual, sino por la relación que se ha formado en todos los años que llevamos juntos. Mucha suerte, eres el siguiente.

A Libia, Svetla, Alejandro, Gloria, Nines, Gyula y todos aquellos que han ido pasando por el laboratorio, por su compañerismo y cordialidad.

A Ángel y César, siempre pendientes de la finca y de que nuestro trigo estuviese en perfectas condiciones.

A Juan Carlos, por su labor en la instalación del riego y en otras tantas actividades. Pero sobre todo, por su amistad consolidada durante todos estos años, por los buenos ratos y consejos, que han sido muchos. He aprendido un montón de cosas contigo (si ya lo decías tú: "no te acostarás sin saber una cosa más...").

A todos los becarios del IRNA: Salud, Noemi, Cristina, María pastos, María piedras, Marta, Rebeca, Nando, Silvia, Sara, Oni, Marcos,..., por los buenos ratos pasados. Y por supuesto, gracias a un largo etcétera de científicos, investigadores, técnicos, gente de prácticas, limpieza, secretaría, gerencia, recepción, seguridad,..., que he ido conociendo en mi paso por el instituto y que han formado parte de mi día a día.

A todos los integrantes del grupo de investigación del Max Planck, por su acogida. A Ana Zabalza, Inma y Dani, Francesco, Elena, Fernando, Tiziana, Anja,..., por hacer que mis estancias en Golm city fueran tan agradables. Y en especial, a Manu, por su ayuda, confianza y amistad (echó de menos esas tertulias acompañados de cócteles y palitos).

A mis nuevos compañeros del INIA, por facilitarme las cosas en la última fase de este trabajo.

A Sergio, por su amistad y porque han sido muchos, variados y bonitos los momentos vividos. Me alegro de haber disfrutado contigo todos estos años, te mereces lo mejor.

A Mario, por hacerme sentir tan bien, cada día te me cuidas (¡ay madre!).

A Victoria, por todos sus buenos detalles conmigo.

A Carmen del Hoyo, por sus ánimos y sus sabios consejos.

A Carmela, Gloria y Azu, por esas tarde-noches tan agradables que hemos pasado con una cañita (o dos) al lado.

A Nieves, por su cariño y su apoyo constantes durante tantos años.

A Puri, Nines y Eva, por su amistad, sus consejos y el ánimo recibido, la próxima comida corre de mi cuenta.

A mis antiguas compañeras de piso, Cris, por haber estado a mi lado en muchos momentos, buenos y malos. A Magda, gracias por Dimitra, diosa de la agricultura, parece que el trigo ya ha dado su fruto. A Yolanda, gran compañera y amiga, muchas gracias por los ratos vividos, a pesar de los pesares.

A mi Melgar y a mis amigas las Isas, las Mamenes, Bea, María, Susi, Toñi, Marivi, Pili,..., y en general, a todos aquellos con los que he disfrutado de mi pueblo dándome fuerzas para llegar al término de este trabajo.

A Jose, por su amor, su apoyo y por animarme a levantarme en aquellos momentos en los que decaía; también a toda su gente, por su compañía, amabilidad y comprensión. Gracias por quererme. Te quiero, Cari.

Por último y de una forma muy especial, quería agradecer a mi familia por su ayuda incondicional y por la confianza que siempre han depositado en mi trabajo y en mi persona. A mis padres, Jesús y Luz, a mis hermanos, Cris, Yoli, Mamen, Raquel y Jesu, a los "allegados", Román, Alfredo, Carlos y Sara, y a mis sobrinos, Daniel, Ricardo, Lucía y Ana, **os quiero**. Sin olvidarme, por supuesto, de esa parte de la familia que ya no está, pero está y me anima a seguir adelante.

A mis padres

Abreviaturas

Acetil CoA: Acetil Coenzima A
ADP: Adenosina difosfato
AGPasa: ADPglucosa pirofosforilasa
Ala: Alanina
APAD: 3-acetilpiridina adenina dinucleótido
APADH: 3-acetilpiridina adenina dinucleótido reducido
Arg: Arginina
Asn: Asparragina
AS: Asparragina sintetasa
Asp: Aspartato
AT: Aminotransferasas
ATP: Adenosina trifosfato
CA1P: 2-carboxiarabinitol-1-fosfato
CFRC: Ciclo de reducción del carbono fotosintético
CGT: Cámara de gradiente de temperatura
cHATS: Sistema de transporte de alta afinidad constitutivo
cLATS: Sistema de transporte de baja afinidad constitutivo
CS: Citrato sintasa
CTC: Cobre-tartrato-carbonato
cv: Cultivar
dda: Días después de anthesis
DEPC: Dietileno pirocarbonato
DHAP: Dihidroxiacetona fosfato
DOC: Deoxicolato de sodio
EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA: Ácido bisetilen (oxietilen nitrilo) tetraacético
1FFT: Fructano:fructano 1-fructosiltransferasa
FACE: Sistemas libres de enriquecimiento de CO₂
FAD : Flavin-adenin dinucleótido
FATI: Sistemas libres de aumento de temperatura
F2,6bisP: Fructosa-2,6-bisfosfato
F2,6bisPasa: Fructosa-2,6-bisfosfatasa
F6P: Fructosa-6-fosfato
F6P2K: Fructosa-6-fosfato-2-quinasa

FBPasa citosólica: Fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica
6G-FFT: Fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa
G1P: Glucosa-1-fosfato
G3P: Gliceraldehído-3-fosfato
G6P: Glucosa-6-fosfato
G3PDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GDH: Glutamato deshidrogenada
Gln: Glutamina
Glu: Glutamato
GOGAT: Glutamina:oxoglutarato aminotransferasa o glutamato sintasa
GS: Glutamina sintetasa
Gly: Glicina
HK: Hexoquinasa
Hepes: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico.
Hexosas-P: Hexosas fosfato
Hys: Histidina
ICDH: Isocitrato deshidrogenasa
iHATS: Sistema de transporte de alta afinidad inducible
iLATS: Sistema de transporte de baja afinidad inducible
Ile: Isoleucina
IPCC: Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático
IRGA: Analizador de gases por infrarrojo
Leu: Leucina
Lys: Lisina
Met: Metionina
MoCo: Cofactor de molibdeno
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD(P): Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido
NiR: Nitrito reductasa
NR: Nitrato reductasa
2-OG: 2-Oxoglutarato
ODS: Octadecil silano
OPA: Orto-ftaldehído
OTC: Cámaras de techo abierto

3PGA: 3- Fosfoglicerato
3PGK: 3-Fosfoglicerato kinasa
6Pgluconato: Gluconato-6-fosfato
PAR: Radiación fotosintéticamente activa
PDC: Complejo piruvato descarboxilasa
PEP: Fosfoenolpiruvato
PEPCasa: Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PGI: Fosfoglucosa isomerasa
PGM: Fosfoglucosa mutasa
Phe: Fenilalanina
Pi: Fosfato inorgánico
PID: proporcional, integrador y diferencial
PK: Piruvato quinasa
PMSF: Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
ppb: partes por billón
ppm: partes por millón
PS: Fotosistemas
p/v: peso/volumen
Rubisco: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP: Ribulosa- 1,5-bisfosfato
SDS: Dodecilsulfato sódico
Ser: Serina
SPS: Sacarosa Fosfato Sintasa
1SST: Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa
6SFT: Sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa
TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
TCA: Ácido tricloroacético
TEA: Trietanolamina
TGT: Cámaras de gradiente de temperatura
Thr: Treonina
TP: Triosas fosfato
Tricina: N-tris(hidroximetil) metilglicina
Tris: Tris(hidroximetil) amino metano
Trp: Triptófano
Tyr: Tirosina
U: Unidades de enzima

UDP-glucosa: Uridina difosfato glucosa

UDPG-PP: Uridina 5`-difosfoglucosa pirofosforilasa

UTP- Uridina trifosfato

Val: Valina

v/v: Volumen/volumen

XuBP: Xilulosa-1,5-bisfosfato

λ : Absorbancia

ϵ_M : Coeficiente de extinción molar

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ¿ESTÁ CAMBIANDO EL CLIMA?	1
1.1.1 <i>Cambio climático reciente y futuros escenarios climáticos</i>	5
1.2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CEREALES: TRIGO	8
1.3. ¿TRABAJOS EN CÁMARA Y/O CAMPO?	11
1.4. METABOLISMO DEL CARBONO	14
1.4.1. <i>Asimilación fotosintética del CO₂</i>	14
1.4.1.1. Importancia de la Rubisco.....	16
1.4.2. <i>Biosíntesis de fotoasimilados</i>	21
1.4.2.1. Síntesis de almidón	22
1.4.2.2. Síntesis de sacarosa	23
1.4.2.3. Síntesis de fructanos.....	26
1.5. METABOLISMO DEL NITRÓGENO	29
1.5.1. <i>Asimilación de nitrógeno</i>	29
1.5.1.1. Absorción de nitrógeno	31
1.5.1.1.1. Absorción de amonio.....	33
1.5.1.1.2. Absorción de nitrato	34
1.5.1.2. Reducción de nitrato	36
1.5.1.3. Coordinación de las tasas de absorción y reducción de nitrato	39
1.5.1.4. Asimilación de amonio.....	42
1.5.1.5. Síntesis de aminoácidos	44
1.6. INTERACCIÓN DEL METABOLISMO DEL CARBONO Y NITRÓGENO	47
1.7. EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE LAS PLANTAS	51
2. OBJETIVOS	57
3. MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1. MATERIAL VEGETAL	59
3.2. CONDICIONES DE CULTIVO	59
3.3. CÁMARAS DE GRADIENTE DE TEMPERATURA Y CONTROL DEL CO₂ DEL AIRE	61
3.4. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS FOLIARES	64
3.5. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DEL CARBONO Y NITRÓGENO	66
3.5.1. <i>Carbohidratos, aminoácidos y clorofila</i>	66
3.5.2. <i>Almidón</i>	67
3.5.3. <i>Intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos</i>	67
3.5.4. <i>Proteínas</i>	68
3.6. VALORACIÓN DE METABOLITOS DEL CARBONO Y NITRÓGENO	69
3.6.1. <i>Carbohidratos solubles</i>	70
3.6.1.1. Glucosa y fructosa.....	71
3.6.1.2. Sacarosa.....	73
3.6.1.3. Fructanos	73
3.6.2. <i>Almidón</i>	74
3.6.3. <i>Intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos</i>	74
3.6.3.1. Hexosas fosfato y uridina difosfato glucosa.....	74
3.6.3.2. 3-Fosfoglicerato	75
3.6.3.3. Adenosina trifosfato	76
3.6.3.4. Ácido 2-oxoglutarato.....	76
3.6.3.5. Malato	77
3.6.4. <i>Aminoácidos</i>	77
3.6.5. <i>Nitrato</i>	80
3.6.6. <i>Clorofilas</i>	81
3.6.4. <i>Proteínas totales</i>	82

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA	83
3.8. VALORACIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA DE LA RUBISCO ...	85
3.9. DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	91
4. RESULTADOS	93
4.1. INTRODUCCIÓN.....	93
4.2. EXPERIMENTO DE CAMPO CORRESPONDIENTE A LA ANUALIDAD 2004.....	94
4.2.1. <i>Estudio de la hoja bandera del trigo en la emergencia de la espiga.....</i>	<i>94</i>
4.2.1.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (<i>rbcS</i>).....	94
4.2.1.2. Contenido de carbohidratos	95
4.2.1.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P	96
4.2.1.4. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos	97
4.2.1.5. Actividad nitrato reductasa	99
4.2.1.6. Contenido de aminoácidos.....	100
4.2.1.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas	103
4.2.2. <i>Estudio de la hoja bandera del trigo días después de la antesis</i>	<i>105</i>
4.2.2.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (<i>rbcS</i>).....	105
4.2.2.2. Contenido de carbohidratos	106
4.2.2.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P	107
4.2.2.4. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos	108
4.2.2.5. Actividad nitrato reductasa	109
4.2.2.6. Contenido de aminoácidos.....	110
4.2.2.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas	114
4.3. EXPERIMENTO DE CAMPO CORRESPONDIENTE A LA ANUALIDAD 2006.....	115
4.3.1. <i>Estudio de la hoja bandera del trigo en la emergencia de la espiga.....</i>	<i>115</i>
4.3.1.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (<i>rbcS</i>).....	115
4.3.1.2. Contenido de carbohidratos	116
4.3.1.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P	117
4.3.1.5. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos	118
4.3.1.5. Actividad nitrato reductasa	119
4.3.1.6. Contenido de aminoácidos.....	120
4.3.1.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas	123
4.3.2. <i>Estudio de la hoja bandera del trigo días después de la antesis</i>	<i>125</i>
4.3.2.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (<i>rbcS</i>).....	125
4.3.2.2. Contenido de carbohidratos	125
4.3.2.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P	126
4.3.2.4. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos	128
4.3.2.5. Actividad nitrato reductasa	128
4.3.2.6. Contenido de aminoácidos.....	129
4.3.2.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas	133
5. DISCUSIÓN	137
5.1. INTRODUCCIÓN.....	137
5.2. EL CRECIMIENTO PROLONGADO EN CO₂ ELEVADO CONDUCE A UN FENÓMENO DE ACLIMATACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS	139
5.3. LAS RESPUESTAS DE ACLIMATACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS AL CO₂ ELEVADO NO PUEDEN PREDECIRSE POR CAMBIOS EN LOS NIVELES DE MENSAJERO DE RUBISCO. LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL ENZIMA NO PARECE RELACIONARSE CON EL CONTENIDO FOLIAR DE AZÚCARES.....	141
5.4. EL CRECIMIENTO EN CO₂ ELEVADO CONDUCE A UNA ACUMULACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN LA HOJA BANDERA DEL TRIGO, MIENTRAS QUE LAS TEMPERATURAS ELEVADAS Y LA ABUNDANCIA DE NITRÓGENO DISMINUYEN SUS NIVELES EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO. EFECTOS QUE SE ATENÚAN EN ESTADIOS MÁS AVANZADOS	155
5.5. LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA ES DIFERENCIALMENTE REGULADA EN RESPUESTA A LOS DIFERENTES FACTORES AMBIENTALES.....	161

5.6. LOS FACTORES AMBIENTALES MODULAN LOS FLUJOS DE INTERMEDIARIOS DE LA GLICÓLISIS Y DEL CICLO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS PROPORCIONANDO PRECURSORES PARA LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS NITROGENADOS	168
5.7. LOS FACTORES AMBIENTALES CONDUCEN A CAMBIOS EN LOS COMPUESTOS NITROGENADOS FOLIARES Y MODULAN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE TRIGO	178
6. CONCLUSIONES	203
7. BIBLIOGRAFÍA	209

Prefacio

El incremento de la productividad de los cultivos para satisfacer la demanda mundial de alimentos es uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la investigación agrícola (Cassman, 1999). Considerando que la población mundial aumentará de 6,6 billones en la actualidad a 8,7-11,3 billones en 2050 (Bengtsson et al., 2006) se estima que la demanda global de cereales aumentará hasta en un 60% (Rosegrant & Cline, 2003). Simultáneamente, el cambio climático global constituirá un reto adicional ya que alterará significativamente las condiciones ambientales que afectan a los cultivos agrícolas (Cohen, 2003). Las previsiones climatológicas pronostican un aumento de la concentración de CO₂ atmosférico, junto a una elevación de la temperatura de la superficie terrestre, sequías más frecuentes y severas, y precipitaciones más intensas (Ainsworth et al., 2008) que conducirán a un aumento de las inundaciones, degradación de los suelos y condiciones climatológicas extremas más frecuentes. De manera que la producción agrícola global se verá profundamente influenciada (Cohen, 2003; Solomon et al., 2008), hasta el punto de que estos drásticos cambios climatológicos auguran una crítica incertidumbre sobre la toma de carbono por los ecosistemas terrestres y la producción de alimentos, que requerirá cultivos más eficientes y mejor adaptados a los nuevos escenarios climáticos (Ellis et al., 2000).

El trigo es uno de los principales cultivos agrícolas a nivel mundial y contribuye sustancialmente a la dieta humana (Shewry, 2007). Su consumo está aumentando en la actualidad, principalmente en países en desarrollo, estimándose que la demanda global para la producción de trigo aumentará hasta un 40% en el 2020 (Rajaram, 2005). En ambientes áridos y semiáridos, especialmente en zonas mediterráneas, ciertos factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes (Oweis et al., 1998; Passioura, 2002), la escasez de agua (Araus et al., 2002) y las temperaturas supraóptimas (Wardlaw & Moncur, 1995) limitan la productividad y el rendimiento de los cultivos. Y el cambio climático podría agravar dicha situación con predicciones de temperaturas más elevadas, mayor sequía y máxima inestabilidad (Stitt & Krapp, 1999; Schneider, 2001; Ainsworth et al., 2008). Aunque existen opciones limitadas de mitigar los efectos adversos del clima en la producción y calidad de los cultivos a través de distintas prácticas agronómicas, será de gran utilidad -científica y agronómica- avanzar en el conocimiento de la adaptación de los cultivos de trigo a las nuevas condiciones ambientales.

Un incremento de la concentración de CO₂ por encima de los niveles atmosféricos actuales aumenta la fotosíntesis en plantas C₃, debido a que el enzima de la carboxilación la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) no está saturada por su sustrato a las concentraciones atmosféricas actuales de CO₂ y la oxigenación es inhibida (Long et al., 2004). Sin embargo, el crecimiento por periodos prolongados en condiciones de CO₂ elevado conduce a un proceso de aclimatación de la fotosíntesis (Drake et al., 1997; Stitt & Krapp, 1999) que implica un descenso en la capacidad de asimilación de CO₂ (Stitt & Krapp, 1999; Martínez-Carrasco et al., 2005), así como una reducción de la conductancia estomática (Drake et al., 1997; Lodge et al., 2001) y de la velocidad de transpiración (Senock et al., 1996; Del Pozo et al., 2005; Ainsworth & Rogers 2007). La pérdida de capacidad fotosintética en CO₂ elevado con frecuencia se acompaña de un descenso de actividad Rubisco o proteína Rubisco (Drake et al., 1997; Sicher & Bunce, 1997; Pérez et al., 2005). La disminución de la cantidad de proteína Rubisco a menudo se asocia con un descenso de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña del enzima (Jang & Sheen, 1994; Drake et al., 1997) que parece ser mediado por un aumento del nivel de carbohidratos en las hojas en condiciones de CO₂ elevado (Sheen, 1990; Krapp et al., 1993). Varios estudios muestran que este descenso es, al menos parcialmente, debido a un bajo estado nitrogenado de la planta (Nakano et al., 1997; Geiger et al., 1999; Pérez et al., 2005), lo cual refleja un cambio en el balance carbono-nitrógeno de la planta (Ainsworth et al., 2007) derivado de unas mayores velocidades de fijación de carbono, y se manifiesta por cambios de parámetros metabólicos indicativos de un agotamiento de nitrógeno (Geiger et al., 1999). Lo que hace suponer la existencia de alteraciones en procesos básicos que regulan el crecimiento en respuesta a la disponibilidad de carbono y nutrientes (Lee et al., 2001; Yin, 2002). Y sugiere la necesidad de un estudio integrado del metabolismo del nitrógeno junto a la fotosíntesis, el metabolismo del carbono y el crecimiento en respuesta a las condiciones ambientales presentes y futuras.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿Está cambiando el clima?

El cambio climático es una de las principales amenazas para el desarrollo sostenible y representa uno de los principales retos ambientales con efectos sobre la economía global, la salud y el bienestar social.

El cambio climático se refiere a una importante variación estadística en el estado medio del clima o en su variabilidad, que persiste durante un periodo prolongado de tiempo (normalmente decenios o incluso periodos superiores). Dicha variabilidad puede estar asociada bien a procesos naturales internos, como los resultantes de erupciones volcánicas, variaciones solares, o bien a variaciones del forzamiento externo, es decir, cambios persistentes antropogénicos en la composición de la atmósfera o en el uso de las tierras. La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), define “cambio climático” como: “un cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante periodos comparables”. La CMNUCC diferencia entre “cambio climático” atribuido a actividades humanas que alteran la composición atmosférica y “variabilidad climática” atribuida a causas naturales. En cualquier caso, el cambio climático implica no sólo un incremento en las temperaturas, el calentamiento global, sino cambios en otras variables, como las precipitaciones, la humedad, la cobertura de las nubes y todos los demás elementos del sistema atmosférico. El clima terrestre es un sistema altamente complejo, con mecanismos que interaccionan entre la atmósfera, la superficie terrestre, los océanos y las zonas heladas, que está sujeto a fluctuaciones naturales. Por ello, discernir claramente el componente de forzamiento humano en el clima terrestre de forma separada a las fluctuaciones naturales es una cuestión fundamental, pero muy problemática. La complejidad del sistema y sus múltiples interacciones hacen que la única manera de evaluar estos cambios sea mediante el uso de modelos computacionales que simulan la física de la atmósfera y del océano. Los cuales gozan de una precisión limitada, pero parecen predecir la existencia de una relación directa entre incremento de la temperatura media del planeta y aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera.

La relación entre las concentraciones de ciertos gases en la atmósfera y su efecto en la temperatura del aire no es nueva. Ya en 1824, el científico francés Fourier, sugirió que la atmósfera terrestre permitía la entrada de la radiación solar, y captaba parte de la radiación reflejada por la superficie terrestre a la atmósfera. Efecto actualmente conocido como

efecto invernadero natural. Los responsables de la absorción de la radiación infrarroja son los gases heteroatómicos, como el CO₂, el metano (CH₄) y los óxidos de nitrógeno como el óxido nitroso (N₂O). Estos procesos de absorción y emisión de radiación solar en la atmósfera son fundamentales para el desarrollo de la vida sobre la tierra tal y como se conoce. Con posterioridad, Svante Arrhenius (1896) establecería una relación entre las concentraciones de uno de los gases atmosféricos, el CO₂, y la temperatura sugiriendo que una duplicación de la concentración de CO₂ provocaría un aumento de temperatura de 5 °C. Thomas Chamberlin (1987) sería el primero en acuñar el término cambio climático, quien junto con Arrhenius indicaría que las actividades humanas podrían provocar un aumento de los gases de efecto invernadero, con la consiguiente elevación de la temperatura de la superficie terrestre, proceso conocido en la actualidad como efecto invernadero inducido. En aquellos años, se pensaba que la influencia de las actividades humanas era insignificante, comparada con las fuerzas naturales, tales como, la actividad solar o los movimientos circulatorios en el océano. Además, se consideraba que los océanos eran grandes sumideros de carbono, los cuales cancelarían automáticamente la contaminación producida por el hombre. No sería hasta principios de los 60, con los estudios de curvas de concentración de CO₂ atmosférico en la Antártida, y especialmente, en Mauna Loa (Islas Hawaii, USA) (Keeling, 1960) cuando se evidenciaría una de las señales más importantes sobre el calentamiento de la tierra. Siendo Stephen Schneider (1976) quien utilizó por primera vez el término calentamiento global. Las investigaciones desarrolladas por este científico en esta temática le han convertido en uno de los mayores expertos sobre el cambio climático. A partir de esta fecha las organizaciones no gubernamentales medioambientales toman conciencia de la necesidad de proteger el medio ambiente para prevenir un calentamiento global de la tierra. Desencadenándose una cierta sensibilización sobre el problema, hasta el punto de establecerse en 1988 el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC), creado por la Organización Meteorológica Mundial y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, con el fin de evaluar la información científica, técnica y socioeconómica pertinente para comprender el cambio climático, sus posibles repercusiones y las posibilidades de adaptarse a dicho cambio y atenuarlo. Los informes elaborados por dicho panel han contribuido al análisis exhaustivo y actualizado de los conocimientos sobre el cambio climático. El IPCC atribuye, con un alto grado de confianza, el calentamiento global de la Tierra al aumento del contenido atmosférico de gases de efecto invernadero, separando en las simulaciones, la variabilidad natural de la de origen antrópico. Sin embargo, los

científicos más críticos con estas propuestas aseguran que todavía existe un alto grado de incertidumbre en el conocimiento de la magnitud de la variabilidad natural.

La principal consecuencia del cambio climático antropogénico es el efecto invernadero inducido, derivado del aumento de los gases de efecto invernadero a la atmósfera. Se sabe que la radiación solar es interceptada por la Tierra y aproximadamente el 45% atraviesa la atmósfera sin ser absorbida y llega a la superficie del planeta (Larcher, 2003). Esta radiación es nuevamente reflejada a la atmósfera en forma de radiación infrarroja, una parte atraviesa la atmósfera, mientras que otra es absorbida y reemitida en todas las direcciones por las nubes y los gases de efecto invernadero. Por ello un aumento de la concentración atmosférica de dichos gases conduce a una mayor retención de calor en la atmósfera y devuelve a la Tierra aún más energía, causando un desequilibrio del balance radiativo y un calentamiento del planeta significativo; que se acompaña de cambios climáticos regionales, a veces beneficiosos y otros desastrosos, junto a una elevación del nivel de los mares (Maslin, 2004).

Las concentraciones globales en la atmósfera de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) han aumentado notablemente como resultado de las actividades humanas desde inicios de 1750, época de la Revolución Industrial (Figura 1), y han superado, sensiblemente, los valores preindustriales determinados por testigos de hielo que abarcan varios miles de años. El incremento de la concentración atmosférica de CO_2 deriva fundamentalmente de la quema de combustibles fósiles, la deforestación y el cambio de uso de las tierras, mientras que los aumentos en las concentraciones de CH_4 y N_2O se deben principalmente a la agricultura y la ganadería. El CO_2 , CH_4 y N_2O son químicamente estables y se trata de gases de efecto invernadero de vida larga, de modo que sus emisiones ejercen influencia en el clima a largo plazo. El CO_2 carece de un periodo específico de vida porque está en ciclo continuo con la atmósfera, los océanos y la biosfera; y su eliminación neta de la atmósfera involucra una gama de procesos con escalas de tiempo diferentes. El CO_2 es, sin duda, el gas de efecto invernadero antropogénico más importante. Su concentración atmosférica global ha aumentado un 35% en los últimos 250 años (Albritton et al., 2001), pasando de una concentración aproximada de 280 ppm, en la era preindustrial, a las 370 ppm de la actualidad, pronosticándose que podría llegar a alcanzar hasta 700 ppm a finales de siglo (Solomon et al., 2007). La concentración atmosférica global de CH_4 ha aumentado notablemente su valor preindustrial, incluso en un porcentaje superior al CO_2 , si bien sus niveles atmosféricos son muy inferiores. En lo que respecta a las concentraciones atmosféricas de N_2O también han aumentado, aunque

de un modo sensiblemente inferior a los otros dos gases de efecto invernadero de vida larga (Figura 1) (IPCC, 2007).

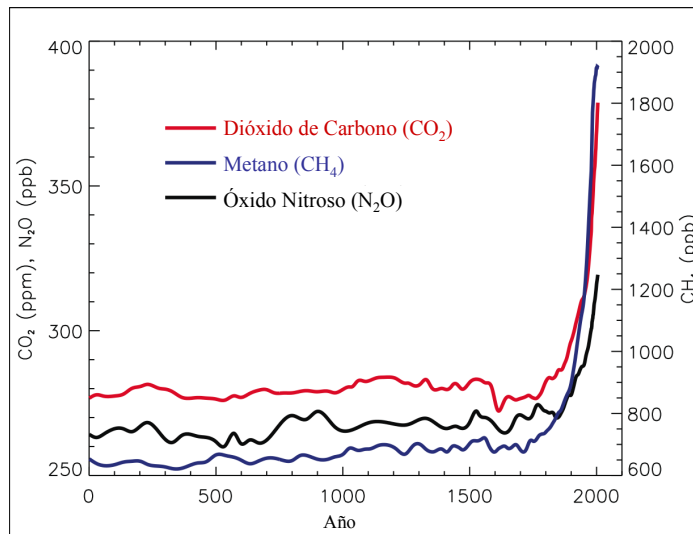


Figura 1. Concentraciones de los gases de efecto invernadero de vida larga más importantes en los últimos 2000 años. Los aumentos desde 1750 son atribuidos a actividades humanas de la era industrial. Las unidades de concentración son partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb), indicando el número de moléculas del gas por millón o billón de moléculas de aire, respectivamente, en una muestra atmosférica (IPCC, 2007).

Otros gases de efecto invernadero, cuyo origen es puramente antropogénico, son los clorofluorocarbonos (CFC) e hidroclorofluorocarbonados (HCFC), que son empleados como refrigerantes, y sus niveles aumentaron drásticamente en las últimas décadas con consecuencias inquietantes para la integridad de la capa de ozono estratosférica. Lo que hizo necesario el establecimiento un control exhaustivo de las emisiones de estos gases, que tuvo lugar gracias a la aprobación del protocolo de Montreal (1987). El ozono troposférico (O_3) es un componente gaseoso de la atmósfera producido por reacciones fotoquímicas en las que intervienen gases resultantes de actividades humanas, principalmente monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles, como los formaldehídos (smog fotoquímico). El ozono troposférico se comporta como un gas de efecto invernadero por su contribución al calentamiento global. Junto a las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera consecuencia de las actividades antropogénicas están también los aerosoles (compuestos principalmente por azufres, carbono orgánico, carbono negro, nitrato y polvo) que en conjunto producen un efecto de enfriamiento, mitigando parcialmente el calentamiento global.

Existe en la actualidad un fuerte consenso científico, político y social de que las emisiones de gases de efecto invernadero, resultado de las actividades antropogénicas,

están alterando significativamente el clima global, desencadenando el proceso conocido como cambio climático o calentamiento global.

1.1.1. Cambio climático reciente y futuros escenarios climáticos

Según el Grupo Intergubernamental de Expertos de Cambio Climático (IPCC), el calentamiento global es inequívoco y se atribuye a la acción del hombre con una certidumbre superior al noventa por ciento, como lo evidencian las observaciones de los incrementos de las temperaturas medias del aire y del océano, el derretimiento generalizado del hielo y de la nieve, y la elevación del nivel medio del mar en el mundo.

Los años 2005 y 1998 fueron los más cálidos en el registro de temperatura del aire superficial mundial desde 1850. Las temperaturas superficiales en 1998 se intensificaron por el fenómeno de El Niño de 1997-1998, pero esta anomalía no tuvo lugar en 2005. De los últimos doce años (1995–2006), 11 de ellos exceptuando 1996, se encuentran entre los años más calurosos de los registros instrumentales de la temperatura global en superficie, desde 1850. La tendencia lineal de 100 años, comprendida entre 1906-2005 es de $0,74\text{ }^{\circ}\text{C}$, mayor que la tendencia entre 1901-2000 que fue de $0,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IPCC, 2001). Lo que indica que el calentamiento de los últimos 50 años ($0,13\text{ }^{\circ}\text{C}$ por decenio) casi duplica el de los últimos 100 años, siendo el aumento total de la temperatura de 1850-1899 hasta 2001-2005 de $0,76\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IPCC, 2007).

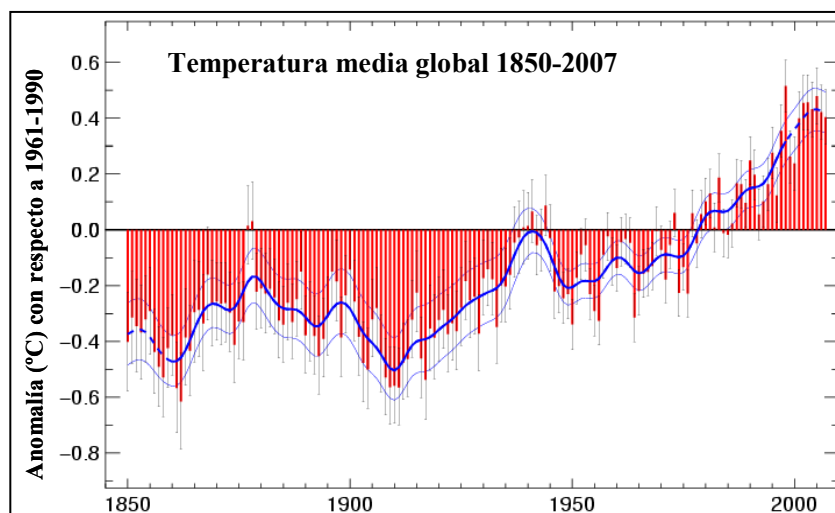


Figura 2. Las barras rojas muestran la media anual global de las anomalías de la temperatura cercana a la superficie con respecto a 1961-1990, desde 1850 a 2007, para las áreas terrestres y oceánicas combinadas (la incertidumbre al 95% se refleja en las barras de error). La línea azul indica la tendencia de la temperatura (la incertidumbre al 95% se muestra en las líneas azules claras). Datos procedentes de HadCRUT3 del Met Office Hadley Centre for Climate Change (adaptado de Brohan et al., 2006).

Análisis de mediciones, por globos estratosféricos y vía satélite, de temperaturas de las capas baja y media de la troposfera muestran que las tasas de calentamiento fueron similares a las de los registros de temperaturas de superficie (Figura 2).

Las observaciones desde 1961 muestran que los océanos han estado absorbiendo más del 80% del calor añadido al sistema climático. Este calentamiento ha contribuido al aumento del nivel del mar, influido también por las reducciones generalizadas de glaciares y casquetes de hielo en ambos hemisferios. De manera que el nivel medio del mar creció con un índice medio de 1,8 mm por año entre 1961 y 2003. Y la tasa fue mucho más rápida entre 1993 y 2003, con un promedio de 3,1 mm por año; posiblemente las pérdidas de las placas de hielo de Groenlandia y la Antártida favoreciesen el aumento del nivel del mar en dichas fechas. Las temperaturas medias del Ártico duplicaron también el índice medio en los últimos 100 años. En algunas regiones se han analizado las precipitaciones en el periodo comprendido entre 1900-2005, observándose un aumento significativo de las mismas en la parte este de América del norte y Sudamérica, en el norte de Europa y Asia, y en Asia central, junto a un descenso de precipitaciones en el Sáhel, el Mediterráneo, África del sur y partes del sur de Asia. Se han mostrado también evidencias de un incremento en la actividad de ciclones intensos en el Atlántico norte a partir de 1970, relacionándose con el calentamiento de la temperatura de la superficie del mar en los trópicos. Los vientos del oeste, de latitud media, son más fuertes en ambos hemisferios desde los años 60. Y se han observado sequías más largas e intensas desde los años 70, particularmente, en los trópicos y subtropicos. Los cambios en las temperaturas de la superficie del mar, los patrones de viento, y la disminución de los neveros y de la capa de nieve se han vinculado también a las sequías; al igual que la elevación de la temperatura atmosférica y el descenso de precipitaciones. Además, la frecuencia de fenómenos de precipitaciones fuertes se ha incrementado en la mayoría de las áreas terrestres, en concordancia con el calentamiento y los aumentos del vapor de agua atmosférico. En definitiva, durante los últimos 50 años, se han observado cambios generalizados en las temperaturas extremas, siendo cada vez menos frecuentes los días y noches fríos y las heladas, y más frecuentes los días y noches calurosos y las olas de calor (IPCC, 2007).

El incremento de las temperaturas medias mundiales desde mediados del siglo XX se asocia muy probablemente al aumento observado de las concentraciones de gases de efecto invernadero de origen antropogénico. Ahora bien, el calentamiento generalizado observado en la atmósfera y los océanos, conjuntamente con la pérdida de la masa de hielo, apoya la conclusión de que es extremadamente improbable que los cambios de los últimos 50 años

puedan ser explicados sin el forzamiento externo, y posiblemente no se deban únicamente a causas naturales conocidas (Maslin, 2004). Para los estudios de las previsiones de cambio climático se dispone de un amplio número de simulaciones, modelos que cubren un rango de futuros escenarios posibles e incluyen suposiciones de emisiones¹, referidas al dióxido de carbono, gas de efecto invernadero que contribuye en mayor medida al calentamiento global. Según estos modelos, la continuidad de las emisiones de gases de efecto invernadero en los índices actuales ocasionaría un mayor calentamiento e induciría cambios en el sistema climático global durante el siglo XXI superiores a aquellos observados durante el siglo XX. Las estimaciones en el calentamiento de la superficie terrestre según previsiones para finales del siglo XXI (2090-2099) para el escenario bajo en emisiones (600 ppm) son de 1,8 °C (rango de probabilidad entre 1,1 y 2,9 °C), y para el escenario con mayores emisiones (1550 ppm) de 4,0 °C (rango de probabilidad de 2,4 a 6,4 °C).

En definitiva, como se ha mencionado en el apartado anterior, la concentración atmosférica de CO₂ atmosférica ha aumentado hasta niveles entre 370-380 ppm desde la era pre-industrial (Albritton et al., 2001) y los pronósticos de cambio climático para este siglo prevén que podría llegar a alcanzarse ~550 ppm en el 2050 y ~730-1020 ppm para el 2100 (Solomon et al., 2007). De manera que una duplicación de los niveles de CO₂, incrementará la temperatura atmosférica entre 1,5-4,5 °C (Stott et al., 2000; Schneider, 2001). Lo que tendrá un notable impacto en el ciclo de vida de las plantas, en los ecosistemas y sistemas socioeconómicos en todas las regiones del planeta (Maslin, 2004), con incidencia significativa en zonas más vulnerables, como es el sur de Europa -zonas Mediterráneas-. España, por su situación geográfica y características socioeconómicas, es un país vulnerable al cambio climático, como se ha puesto de manifiesto en las más recientes evaluaciones e investigaciones. Destacando entre los problemas ambientales que se han visto reforzados por efecto del cambio climático: la disminución de los recursos hídricos, la regresión de la costa, las pérdidas de la biodiversidad biológica y ecosistemas naturales y los aumentos en los procesos de erosión del suelo.

La comunidad científica advierte que las actuales emisiones de CO₂ deberían reducirse notablemente para evitar un calentamiento catastrófico del clima mundial e indican que dada la dificultad para detener el calentamiento global no debería superarse el umbral de 450 ppm de CO₂. La fuerte sensibilización existente ante las repercusiones que pueda tener

¹ Las concentraciones de CO₂ aproximadas, debidas a gases de efecto invernadero y aerosoles antropogénicos en 2100, calculadas para los distintos escenarios de emisiones del IPCC, están alrededor de 600, 700, 800, 850, 1250 y 1550 ppm.

el cambio climático ha desencadenado un compromiso serio por parte de las autoridades políticas encaminado a conseguir una reducción inmediata, sostenida y sustancial de las emisiones de los gases de efecto invernadero por parte de los países tecnológicamente avanzados, para contribuir al cumplimiento de los compromisos de reducción acordados en el protocolo de Kyoto (a nivel Europeo se ha acordado recientemente que la emisión de dichos gases deberá de reducirse un 20% para el 2020). Dicho compromiso pasa, a su vez, por un incremento del uso de energías renovables y el desarrollo de biocarburantes de segunda generación, para evitar en la medida de lo posible la quema de combustibles fósiles. Existe, por tanto, una necesidad urgente de controlar y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera, además de estudiar los mecanismos de adaptación a los impactos del cambio climático a todos los niveles. Aspecto, este último, abordado en el presente trabajo de investigación.

1.2. Importancia del cultivo de cereales: trigo

El trigo es un cereal de la familia de las gramíneas (*Poaceae*) que ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre. Se trata de uno de los cereales más ampliamente cultivado por contribuir sustancialmente a la nutrición humana, aunque gran parte se destina también a la alimentación animal. El origen del actual trigo cultivado se encuentra en Asia, en la región comprendida entre los ríos Tigris y Eufrates. Desde Oriente Medio el cultivo del trigo fue difundido al resto del mundo. Las primeras formas de trigo recolectadas por el hombre, hace más de doce mil años, eran del tipo *Triticum monococcum* L. y *T. dicoccum* L., caracterizadas fundamentalmente por la fragilidad de sus espigas que se disgregaban al madurar.

El trigo, según su utilidad, se clasifica en trigo blando y duro. Al primer grupo pertenecen una serie de especies que se destinan principalmente a la producción de pan en Europa y de pastas en Estados Unidos o Canadá. Se cultivan preferentemente en regiones cálidas o templadas y la especie más abundante es *Triticum aestivum*. El grano posee un contenido en almidón, grasas, hierro, fósforo y vitamina B superior al trigo duro. En cuanto al segundo grupo, la especie más utilizada es *Triticum durum* y se cultiva en zonas más secas. Es la variedad de trigo más utilizada en Estados Unidos y Canadá, empleándose en la producción de pan, pero menos utilizada en Europa, donde se destina principalmente a la producción de pastas. Presenta una mayor proporción de proteínas, agua y calcio que el trigo blando. Ambos tipos de trigo, difieren también en el número de cromosomas, mientras que la especie *T. aestivum* es hexaploide, la especie *T. durum* es tetraploide.

El trigo harinero (*T. aestivum*) es el cereal panificable más cultivado en el mundo. Posee una raíz fasciculada que alcanza generalmente una profundidad de 25 cm, pudiendo llegar hasta un metro, cuyo crecimiento comienza en el periodo de ahijado y su desarrollo se considera completo al final del encañado. El tallo es hueco (caña) y la resistencia al encamado dependerá de su altura y solidez. Las hojas son cintiformes, paralelinervias y terminadas en punta. Poseen vaina, lígula y aurículas bien definidas. La inflorescencia es una espiga compuesta de un tallo central con entrenudos cortos, llamado raquis, sobre el que se disponen de 20 a 30 espiguillas en forma alterna, protegida por dos brácteas más o menos coriáceas a ambos lados. Cada espiguilla presenta diversas flores, de las cuales aborta la mayor parte. La flor consta de un pistilo y tres estambres, y está protegida por dos brácteas verdes o glumas, la exterior se puede prolongar en una arista en algunos trigos. La fecundación y maduración del óvulo produce el grano de trigo, un fruto de tipo cariósipide. El grano consta de envolturas externas: pericarpio, mesocarpio y epicarpio; y capas internas: la testa, el endospermo (que contiene sustancias de reservas que constituyen la masa principal del grano) y el germen (que es el embrión a partir del cual se origina una nueva plántula). El conjunto del pericarpio y la testa es lo que se conoce como salvado.

A lo largo del ciclo de vida de la planta se distinguen distintas fases, que comprenden desde la germinación hasta la madurez fisiológica del trigo (Figura 3) (Zadoks et al., 1974). Las distintas fases se describen a continuación:

Germinación. El periodo de germinación y arraigo del trigo es muy importante para la futura cosecha de grano. El grano de trigo necesita para germinar humedad, temperatura y aireación adecuada. Una vez que se forman las raíces primarias y alguna hoja verde, la planta puede alimentarse por sí misma tras el agotamiento de las reservas del grano, en el que termina el periodo de germinación.

Ahijamiento. Las zonas de los tallos que están en contacto con la tierra, crecen dando lugar a raíces adventicias hacia abajo y nuevos tallos secundarios hacia arriba llamados “hijos”; se dice entonces que el trigo “ahija” o “amacolla”. El trigo ahija más si la siembra es espaciada, temprana y se mantiene una humedad adecuada. Las variedades de trigo que ahijan muy poco dan lugar a una menor productividad, y para compensar esa falta de ahijamiento deberá sembrarse mayor cantidad de semilla.

Encañado. Esta fase consiste en el crecimiento del tallo por alargamiento de los entrenudos, en la cual la caña sigue alargándose durante el espigado alcanzando longitudes y grosores diferentes según las variedades. Durante la fase de encañado la planta mantiene

una gran actividad fisiológica, por lo tanto la extracción de elementos nutritivos del suelo, principalmente nitrógeno y agua suele ser muy elevada.

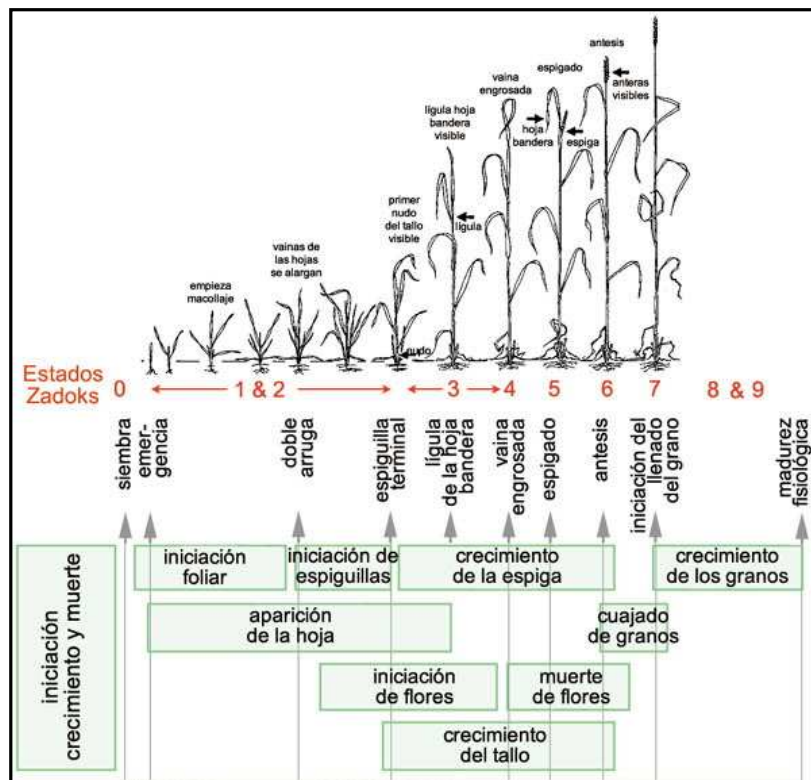


Figura 3. Fases de desarrollo de un cereal siguiendo la escala decimal Zadoks (Zadoks et al., 1974).

Espigado. El periodo de “espigado” junto con la anthesis son los de máxima actividad fisiológica, con una transpiración y una extracción de humedad y nutrientes del suelo, que alcanzan su máximo. Los azúcares de las hojas superiores son transferidos a los granos de trigo en formación mientras las hojas se van secando. La elevada cantidad de agua necesaria para transportar las sustancias de reserva a los granos, facilita la desecación en el entorno de la raíz, siendo muy importante el riesgo de sequía en esta fase.

Antesis. Es el momento de expansión completa de la flor, desde el desarrollo del estigma receptivo a la fecundación, donde las anteras amarillas son claramente visibles en las espigas, las cuales liberan el polen, agente de la fecundación.

Maduración. El periodo de maduración comienza en la “madurez láctea” cuando las hojas inferiores ya están secas, pero las tres superiores y el resto de la planta está verde. Seguidamente tiene lugar la “maduración pastosa”, en la que sólo se mantienen verdes los nudos y el resto de la planta toma su color típico de trigo seco, tomando el grano su color definitivo. A los tres o cuatro días del estado pastoso llega el cereal a su “madurez completa”. Es imprescindible en esta etapa que las temperaturas sean suaves, pues si

sobrevienen vientos secos o calor excesivo el grano de trigo se “asura”, es decir, madura precipitadamente y no se acumulan en la semilla las sustancias de reserva necesarias para adquirir un adecuado grosor del grano.

En cuanto a los requerimientos edafoclimáticos necesarios para el desarrollo adecuado del trigo destacan: una temperatura óptima de crecimiento en torno a los 25 °C con temperaturas máximas y mínimas de 3-4 °C y 30-32 °C, respectivamente (Briggle, 1980). La humedad relativa entre 40 y 70%; desde el espigado hasta la cosecha, época de mayores requerimientos, aunque la humedad relativa óptima ronda el 50-60%, siendo necesario un clima seco para la maduración. En años secos el trigo puede desarrollarse bien con 300-400 mm de precipitación. Los mejores suelos para su crecimiento suelen ser neutros o algo alcalinos además de arcilloso-arenosos para mantener la adecuada proporción de agua (Ruiz, 1981).

El trigo es uno de los tres cereales más cultivados a nivel mundial, junto al maíz y el arroz, (FAO, 2006) y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la antigüedad. El trigo generalmente es molido como harina para su utilización (Kent, 1983), las masas producidas a partir de la harina de trigo de pan difieren de las realizadas a partir de otros cereales, gozando de unas excepcionales propiedades viscoelásticas (Orth & Shellenberger, 1988). Un gran porcentaje de la producción total de trigo es utilizada para el consumo humano por ser una fuente importante de carbohidratos y proteínas (Curtis, 2002). El trigo también es destinado a la alimentación animal y a menudo se usa en la industria para hacer adhesivos, aditivos de papel y otros productos e incluso en la preparación de cerveza y otros licores. En la actualidad se emplea también como biomasa para la fabricación de biocombustibles, lo que ha generado cierta controversia y debate por el incremento de los precios de los productos derivados de los cereales consecuencia del aumento de su demanda como fuente de energías renovables.

1.3. ¿Trabajos en cámara y/o campo?

En las últimas décadas, los efectos e impactos de una elevación de las concentraciones atmosféricas de CO₂ en la fisiología y la productividad de las plantas han sido objeto de intensas investigaciones, cuyos resultados más relevantes se recogen en ciertas revisiones (Stitt et al., 1991; Drake et al., 1997; Curtis & Wang, 1998; Norby et al., 1999; Ainsworth et al., 2002; Long et al., 2004; Körner, 2006; Ainsworth et al., 2008). Estudios realizados, inicialmente, en invernaderos y cámaras de ambiente controlado, si bien se han diseñado

con posterioridad otros sistemas que permiten la simulación de las previsiones de cambio climático con mayor precisión; aunque no están exentos de ventajas o desventajas selectivas.

Las cámaras de crecimiento son utilizadas en aquellos trabajos en los que se necesita mantener con precisión condiciones de crecimiento estables, repetibles y de diferentes rangos, que raramente pueden obtenerse en ambientes naturales. Esta experimentación, aunque no suele ser representativa de lo que sucede en la naturaleza, es válida para estudiar las pautas de respuesta fisiológicas y mecanismos de regulación del desarrollo de las plantas en las condiciones establecidas. A diferencia de las cámaras de crecimiento, en los estudios de campo, las demandas evaporativas son mayores y están sujetos a la influencia de ciertos factores abióticos y bióticos; en referencia a los primeros, los de mayor relevancia son la temperatura, humedad relativa y radiación, parámetros ambientales que fluctúan a lo largo del fotoperiodo; y respecto a los segundos, destacan los virus, hongos, insectos, roedores, etc. (Morison & Lawlor, 1999; Jamieson et al., 2000; Aranjuelo et al., 2005; Pérez et al., 2007). Por ello, la experimentación en condiciones naturales en el campo ofrece la ventaja de estudiar la respuesta de las plantas al futuro escenario climático teniendo en consideración parámetros climáticos que fluctúan conjuntamente; además, evitan la limitación del crecimiento de la raíz de las plantas asociada al cultivo en macetas (Arp, 1991) y la restricción, por cuestiones de espacio, tanto del número de tratamientos aplicables simultáneamente como de individuos por tratamiento.

Son varias las aproximaciones empleadas para analizar el efecto del aumento de CO₂ en plantas, en los últimos años, en estudios en campo: FACE (Free Air CO₂ Enrichment) (Allen et al., 1985), FATI (Free Air Temperature Increase) (Nijs et al., 1996a), OTC (Open Top Chamber) (Rogers et al., 1983), y TGC (Temperature Gradient Chambers) (Rawson et al., 1995). Los FACE o enriquecimiento en CO₂ al aire libre son instalaciones situadas en espacios naturales (campos de cultivo, bosques, etc.) en los que se enriquece el ambiente mediante la emisión de CO₂. La tecnología FACE permite examinar el efecto del aumento de la [CO₂] atmosférica sobre comunidades vegetales intactas. Las principales ventajas de este sistema son, por una parte la alteración mínima del microclima del ecosistema en estudio, aunque alteran ligeramente la temperatura, sobre todo la nocturna, al fumigar con gas y provocar inversiones térmicas en el dosel vegetal, y por otra, sus dimensiones que permiten incluir un amplio número de individuos (Hendrey, 1992). Las desventajas de esta técnica son la imposibilidad de analizar el efecto conjunto con otros parámetros ambientales (temperatura del aire y humedad relativa), la dificultad de controlar el CO₂ que

es liberado a la atmósfera y los elevados costes de dicho gas. Algunos autores han combinado la tecnología FACE y FATI con el objeto de analizar el efecto combinado de CO₂ y temperatura (Nijs et al., 1996a). Los FATI o aumento de la temperatura al aire libre son una tecnología análoga a los FACE que simula diferentes condiciones térmicas (Nijs et al., 1996b). Al igual que los FACE, los FATI se disponen en espacios abiertos, sólo que en este caso se busca crear condiciones térmicas concretas, mediante la aplicación de radiación infrarroja modulada directamente sobre las plantas del cultivo. La desventaja de este sistema, es el calentamiento de las plantas, porque no se calienta el aire circundante y el incremento de temperatura que se consigue es muy pequeño, únicamente se consigue elevar la temperatura 1 °C.

Las OTC o cámaras de techo abierto se colocan en un área natural encerrando en su interior las plantas a las que se suministra una [CO₂] determinada. Respecto al sistema FACE, mantiene las fluctuaciones térmicas, humedad relativa y radiación naturales, además de considerar el efecto de factores bióticos (hongos, insectos, etc.). Su principal limitación sería el efecto barrera debido a la estructura del equipo usado para exponer a las plantas a una determinada [CO₂] (Hendrey & Kimball, 1994). Estos artefactos generalmente se conocen como “efectos de cámara” e incluyen cambios en la velocidad del viento, humedad, temperatura, calidad o intensidad de la luz y variables del suelo (Allen et al., 1992; Hendrey et al., 1994). Al igual que en el caso de los FACE, los OTC tienen el inconveniente del alto coste de instalación y funcionamiento debido principalmente al consumo de CO₂ emitido libremente a la atmósfera.

Las TGC o cámaras de gradiente térmico, son sistemas portátiles cerrados que pueden situarse en el medio natural y permiten crear un gradiente de temperatura controlando, a su vez, las concentraciones de CO₂ (para una descripción más detallada ver apartado 3.3). Las ventajas y desventajas de las TGC son idénticas a las OTC, salvo que por el hecho de tener el techo cerrado reduce considerablemente el consumo y, por tanto, los costes de CO₂. Además, permiten estudiar simultáneamente diferentes variables como el CO₂ y la temperatura.

La bibliografía indica que existe cierta similitud, entre los estudios en condiciones controladas y naturales, en cuanto a la respuesta al CO₂ (Körner, 1995). Habiéndose mostrado evidencias que el nitrógeno limita la respuesta al crecimiento en condiciones de CO₂ elevado tanto en experimentos llevados a cabo en cámaras en ambientes controlados, invernaderos, cámaras de campo transparentes y cámaras de techo abierto (Stitt & Krapp,

1999; Poorter & Pérez-Soba, 2001; Pérez et al., 2005). La incertidumbre de que ciertas observaciones fueran un artefacto derivado del crecimiento en un volumen radicular limitado (Arp, 1991; Long & Drake, 1992; Ainsworth et al., 2002), han sido despejadas por las evidencias mostradas en experimentos en el campo en condiciones totalmente abiertas mediante el empleo de sistemas FACE (Ainsworth & Long, 2005). Se ha realizado un exhaustivo análisis estadístico de los resultados obtenidos con experimentación FACE, que han sido comparados con los derivados de estudios en cámaras controladas (Long, 2004). Las tendencias de ambos estudios concuerdan, si bien emergen diferencias cuantitativas importantes, que pudieran tener implicaciones significativas en la comprensión de cómo se adaptarían los cultivos al futuro escenario climático, en particular, los aumentos de CO₂ y temperatura previstos con el cambio climático global.

1.4. Metabolismo del carbono

1.4.1. Asimilación fotosintética del CO₂

La fijación fotosintética del CO₂ es considerada el proceso químico más importante que tiene lugar en la superficie terrestre y que permite el desarrollo de otras formas de vida sobre la tierra (Xiong & Bauer, 2002). Mediante la fotosíntesis, los organismos autótrofos facilitan la incorporación de materia y energía a la biosfera (Medrano & Flexas, 2000). Las plantas y otros organismos como las algas son capaces de transformar la energía luminosa procedente del sol en energía química utilizable para el mantenimiento de distintas rutas metabólicas, que permitirá la síntesis de carbohidratos y otros compuestos a partir del CO₂ asimilado en órganos fotosintéticos y el hidrógeno proveniente del agua y los minerales absorbidos por las raíces. Los cuales serán la base estructural para el crecimiento y desarrollo de la planta y en consecuencia, de la producción primaria de los ecosistemas y de la biosfera (Nelson & Yocum, 2006). La fotosíntesis es, por tanto, el proceso por el cual las plantas son capaces de asimilar el CO₂ de la atmósfera y transformarlo en moléculas utilizando como fuente de energía la radiación solar.

La fotosíntesis en plantas engloba una serie de reacciones que tienen lugar principalmente, aunque no de forma exclusiva, en el cloroplasto (Nelson & Yocum, 2006). Comprende dos fases, (1) generación de energía química en forma de ATP y poder reductor (NAPH) a partir de la energía solar, que será utilizada en (2) la fijación y asimilación del CO₂ en intermediarios fundamentales para diferentes rutas biosintéticas dentro y fuera del cloroplasto a través del ciclo de reducción del carbono fotosintético

(CFRC) o ciclo de Benson-Calvin (Figura 4). La generación de energía tiene lugar gracias a la captura de energía de excitación por las antenas de los Fotosistemas (PS), su transporte a los centros de reacción, y la cadena de transporte de electrones entre el PSII y el PSI. Acoplada a este proceso está la fotofosforilación, de forma que el flujo de electrones en la cadena de transporte genera un gradiente protónico en la membrana del tilacoide, cuya descarga está asociada a la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa. Esta energía química (ATP) y el poder reductor (NADPH) generados a partir de la energía solar por medio del transporte electrónico y la fotofosforilación, será utilizada en el proceso de asimilación fotosintética de carbono (Lawlor, 1993). De manera que el ciclo de reducción del carbono fotosintético constituye el nexo de unión entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de carbohidratos, por lo que debe ser sensible a los cambios en la relación aporte y demanda de productos de la cadena de transporte de electrones, tanto a corto como a largo plazo (Leegood, 1990).

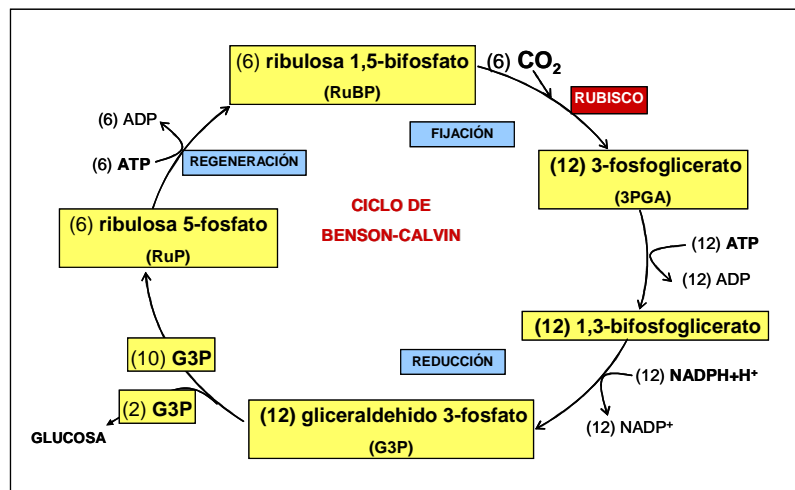


Figura 4. Ciclo de Benson-Calvin (Adaptado de Malkin & Niyogi, 2000).

El Ciclo de Benson-Calvin en plantas C_3 (Figura 4) tiene lugar en el estroma del cloroplasto y comprende 11 enzimas que catalizan trece reacciones que utilizan el ATP y el NADPH en la fijación del CO_2 atmosférico para originar esqueletos carbonados, los cuales son posteriormente usados en la biosíntesis de sacarosa y almidón (Woodrow & Berry, 1988; Geiger & Servaites, 1994). En este ciclo se distinguen tres fases, la primera fase comprende la carboxilación de la molécula aceptora del CO_2 , la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), por el enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), dando lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA). Ésta es seguida de la fase reductiva, en la que el 3PGA será reducido a triosas fosfato (TP), gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), con consumo de ATP y NADPH. La fase final del ciclo

comprende la fase regenerativa en la que por isomerizaciones, condensaciones y reordenaciones, las TP son utilizadas para producir la molécula aceptora del CO_2 , la RuBP, proceso que requiere también consumo de energía en forma de ATP (Raines et al., 1999). La fijación de una molécula de CO_2 requiere el consumo de 3 ATP y 2 NADPH. Parte de las TP generadas en el ciclo de Benson-Calvin serán exportadas al citosol en intercambio estequiométrico con fosfato inorgánico (P_i) y servirán como fuente de carbono para la síntesis de sacarosa, o bien serán empleadas para la síntesis de almidón en el cloroplasto (Figura 5). A pesar de ser muchas las especies vegetales que sintetizan predominantemente sacarosa y almidón, existen algunas que forman polímeros de fructosa, conocidos como fructanos (ver apartado 1.4.2.3). Ciertos aminoácidos (leucina, isoleucina, valina y lisina), ácidos grasos e isoprenoides, son sintetizados también en el cloroplasto a partir del carbono fijado en la fotosíntesis (Geigenberger et al., 2005).

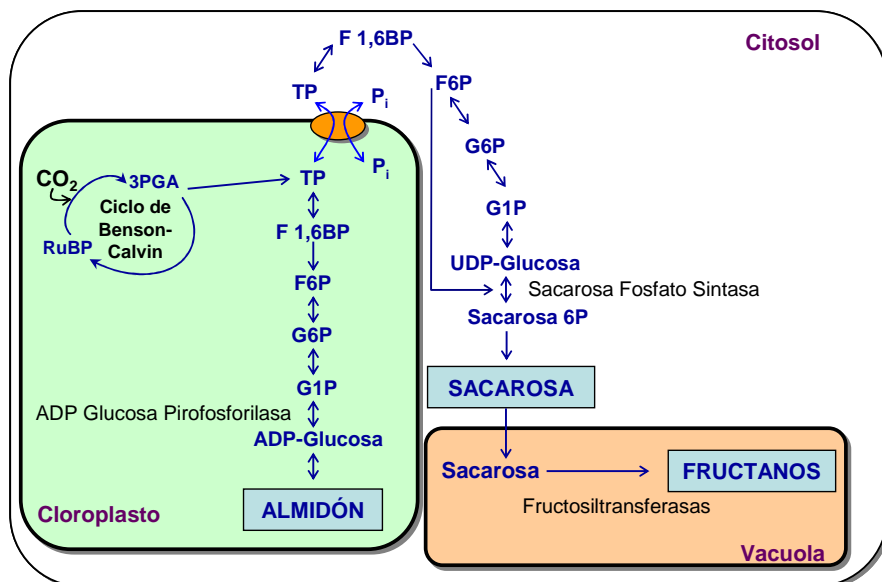


Figura 5. Esquema de la síntesis de sacarosa, almidón y fructanos que tiene lugar en el citosol, cloroplasto y vacuola, respectivamente (Adaptado de Nielsen et al., 2004).

1.4.1.1. Importancia de la Rubisco

La Rubisco cataliza el paso inicial de la asimilación fotosintética del carbono, la carboxilación de la RuBP generando dos moléculas de 3PGA, que serán empleadas en la formación de moléculas orgánicas vitales (Andersson, 2008). La Rubisco se encuentra en la mayoría de organismos autotrófos, tanto procariotas (bacterias fotosintéticas y cianobacterias), como eucariotas (algas y plantas superiores) (Andersson & Backlund, 2008). El enzima, en plantas superiores, está constituido por 8 subunidades grandes que se disponen en 4 dímeros que forman un núcleo octamérico y 8 subunidades pequeñas situadas alrededor del núcleo (Knight et al., 1990) que al ensamblarse generan un

holoenzima con una estructura hexadecamérica (Andersson, 2008). La subunidad grande es codificada por un único gen en el genoma del cloroplasto y sintetizada por el ribosoma plastidial. Mientras que la subunidad pequeña es codificada por una familia de genes nucleares estrechamente relacionados y sintetizada en el citosol (Spreitzer, 2003). La síntesis y ensamblaje del holoenzima Rubisco requiere un control coordinado de procesos cloroplásticos y citosólicos que involucran modificaciones post-traduccionales y la asistencia de proteínas auxiliares denominadas chaperonas (Barraclough & Ellis, 1980; Gatenby & Ellis, 1990). La subunidad pequeña no está directamente implicada en la catálisis, pero la aumenta en más de dos órdenes de magnitud (Andrews, 1988) e interviene en su especificidad por el CO₂ frente al O₂ (Spreitzer et al., 2005), siendo el octámero de subunidades grandes el que mantiene la actividad carboxilasa (Morrel et al., 1997). El sitio activo de la proteína se localiza en la interconexión intra-dímeros, entre el dominio carboxi-terminal de una subunidad grande y el dominio amino-terminal de la segunda subunidad grande del dímero, de manera que la molécula hexadecamérica consta de 8 centros activos, en los que tiene lugar la carboxilación (Knight et al., 1990).

La Rubisco posee una serie de características, tales como, una lenta velocidad catalítica (Parry et al., 2007), una baja afinidad por el CO₂ atmosférico y la posibilidad de emplear O₂ como sustrato alternativo en el proceso competidor con la fotosíntesis, la fotorrespiración, que hacen que sea notoriamente ineficiente como enzima inicial fijadora de CO₂ en la fotosíntesis (Portis, 2003; Portis & Parry, 2007; Andersson, 2008). Por ello, las plantas deben de localizar más de un 50% de la proteína soluble de la hoja en Rubisco (Ellis, 1979). Además, dicho enzima depende de moléculas efectoras para modular su actividad y de proteínas auxiliares para controlar su estado de activación (Rubisco activasa) y mediar su correcto plegamiento y ensamblaje en la célula (chaperonas) (Andersson, 2008).

La actividad catalítica de la Rubisco es regulada por un mecanismo único de regulación post-traducciona que incluye la carbamilación reversible de un grupo ε-amino en un residuo lisina en el centro activo de la proteína (Lorimer & Miziorko, 1980) y estabilización posterior del carbamato en presencia de cationes magnesio (Figura 6). Durante la catálisis tienen lugar cambios conformacionales en el sitio activo de la proteína que facilitan su cierre. El mecanismo de cierre involucra movimientos del bucle 6 (bucle que conecta la cadena β 6 con la α-hélice 6 en el cañón α/β) del extremo carboxi-terminal (Duff et al., 2000) y del bucle del dominio amino-terminal de la subunidad grande adyacente del dímero (Taylor & Andersson, 1996; Duff et al., 2000). La importancia del

cañón α/β 6 para la catálisis y especificidad del enzima ha sido demostrada por selección genética y mutagénesis dirigida (Chen & Spreitzer, 1989). Estudios que han puesto también de manifiesto que el extremo carboxi-terminal no es absolutamente necesario para la catálisis, aunque es requerido para conseguir la máxima actividad y estabilidad enzimática (Gutteridge et al., 1993; Esquivel et al., 2002). El bucle 6 goza de una gran flexibilidad y sus movimientos desde una conformación cerrada a otra abierta van ligados al mecanismo catalítico de la Rubisco (Duff et al., 2000). Mientras que la conformación abierta se asocia con un sitio activo de la proteína carente de ligandos unidos o bien ocupado con ligandos débilmente unidos.

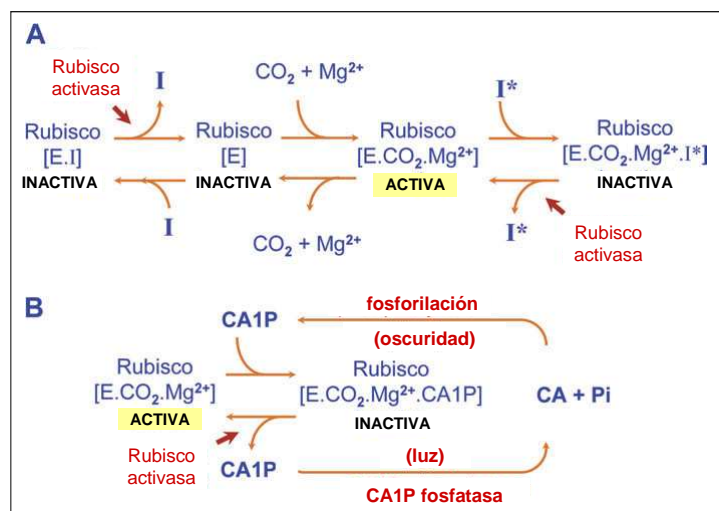


Figura 6. (A) Regulación de la actividad catalítica de la Rubisco. Se muestran los pasos necesarios para que tenga lugar la carbamilación del enzima, cuyos detalles se explican en el texto. Se representa la Rubisco descarbamilada [E], el enzima descarbamilado con inhibidores (I: RuBP o XuBP) unidos a los sitios activos de la proteína [E.I], el enzima carbamilado con los sitios activos catalíticamente competentes [E.CO₂.Mg²⁺] y finalmente el enzima carbamilado con los sitios catalíticos ocupados por inhibidores fuertemente unidos (CA1P [2-carboxiarabinitol-1-fosfato], PDBP [pentodiulosa bisfosfato] y KABP [3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato]) [E.CO₂.Mg²⁺.I]. (B) Regulación de la Rubisco dependiente de la luz mediada por el inhibidor natural el CA1P (Parry et al., 2008).

La conformación cerrada es generada y estabilizada por la unión fuerte de ligandos como la RuBP o la xilulosa-1,5-bisfosfato (XuBP) al enzima no carbamilado, o la unión al enzima carbamilado del 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (CA1P) u otros azúcares fosfato que actúan como inhibidores del enzima (Andrews et al., 1995) y dificultan la catálisis (Duff et al., 2000). Por ello la Rubisco para ser activa “*in vivo*” requiere la acción continuada de una proteína conocida como Rubisco activasa (Figura 6) que facilita la eliminación dependiente de ATP de los azúcares fosfato unidos al sitio activo del enzima, convirtiendo los sitios activos de la Rubisco de una conformación cerrada, e inactiva, a una conformación abierta, potencialmente activa (Andrews et al., 1995; Spreitzer & Salvucci, 2002; Portis, 2003). La conversión de la conformación cerrada a la abierta no sólo libera

los sitios activos de la Rubisco de los inhibidores, sino que requiere también de la activación espontánea por carbamilación y unión de magnesio (Figura 6), del modo anteriormente mencionado, pre-requisito para la unión de la RuBP y catálisis consiguiente (Spreitzer & Salvucci, 2002).

La Rubisco activasa se ha mostrado que es un miembro de la familia de proteínas AAA⁺ (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares) que incluye a una amplia variedad de proteínas con funciones como la chaperonas, típicamente involucradas en la alteración de estructuras moleculares y macromoleculares. El cambio de conformación mediado por la activasa depende de la hidrólisis de ATP y por tanto del pH estromal, constituyendo las bases de la regulación de la Rubisco por luz (Zhang et al., 2002). Se ha mostrado que la Rubisco activasa consta de dos isoformas (Werneke et al., 1989) y que la actividad activasa se regula por la razón ADP/ATP y la respuesta es modificada por cambios redox en la isoforma mayor, mediados por la tiorredoxina-f (Zhang & Portis, 1999).

La regulación enzimática dependiente de la luz puede también ser mediada por un inhibidor natural en plantas, el 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (CA1P), que se asemeja al 3-cetoarabinitol bisfosfato que se produce en el centro activo por una mala protonación de la RuBP, y se acumula en la oscuridad y condiciones de baja intensidad luminosa (Figura 6). La liberación del CA1P del sitio activo de la Rubisco es facilitada por la Rubisco activasa (Robinson & Portis, 1988) y su degradación posterior debida a una fosfatasa específica (Gutteridge & Julien, 1989; Holbrook et al., 1989). Algunas plantas, como en el trigo, carecen de este inhibidor nocturno, en cambio, tienen un inhibidor diurno la pentodiulosa bisfosfato, o su derivado, el carboxitritol bisfosfato (Parry et al., 2008).

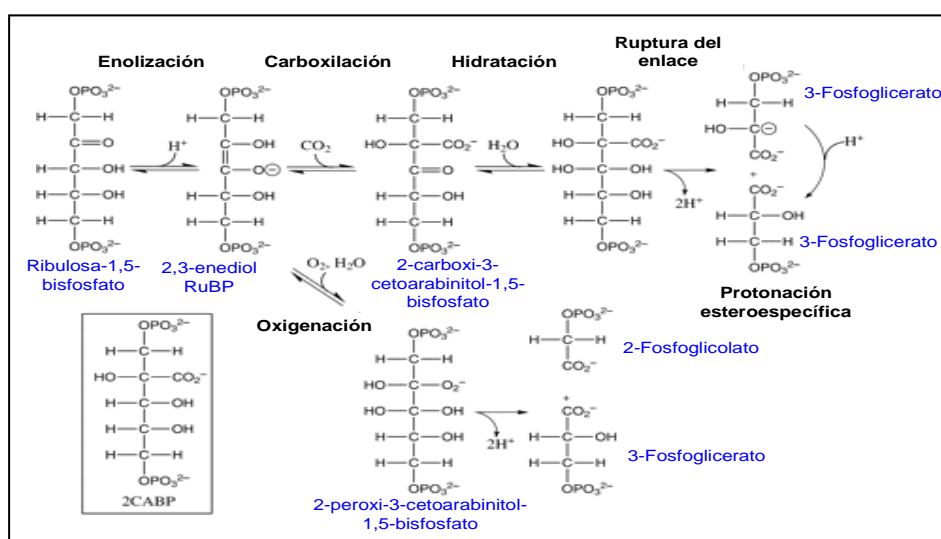


Figura 7. Reacciones catalizadas por la Rubisco, carboxilación y oxigenación de la RuBP (Andersson, 2008).

La carboxilación involucra al menos cuatro etapas, posiblemente cinco, y tres estados de transición (Figura 7); enolización de la RuBP, carboxilación del 2,3-enodiolato, hidratación de la cetona resultante, escisión de la unión carbono-carbono y protonación estereoespecífica del carboxilato resultante de uno de los 3PGA producidos (Andersson, 2008).

La Rubisco cataliza la carboxilación y la oxigenación de la RuBP, siendo el CO_2 y el O_2 mutuamente competitivos por el sitio activo de la subunidad grande del enzima. Mientras que la carboxilación explica la fijación neta de CO_2 , la oxigenación conduce a la pérdida de CO_2 en la ruta fotorrespiratoria (Laing et al., 1974). La oxigenación de la RuBP produce una molécula de 3PGA, que es metabolizada a través del CFRC, y una molécula de 2-fosfoglicolato, molécula de uso limitado para la mayoría de los organismos. Aunque parte del carbono del 2-fosfoglicolato es rescatado a través de la fotorrespiración (Figura 8), tras su desfosforilación a glicolato y posterior transformación a glicina; que junto a otra glicina, libera CO_2 , amonio y serina. El amonio es asimilado en el cloroplasto mediante el ciclo de la GS/GOGAT (glutamina sintetasa/glutamato sintasa) y la serina transformada en 3PGA, con consumo de ATP y NADPH, el cual es asimilado nuevamente en el ciclo CFRC, regenerando RuBP (Andrews & Lorimer, 1978).

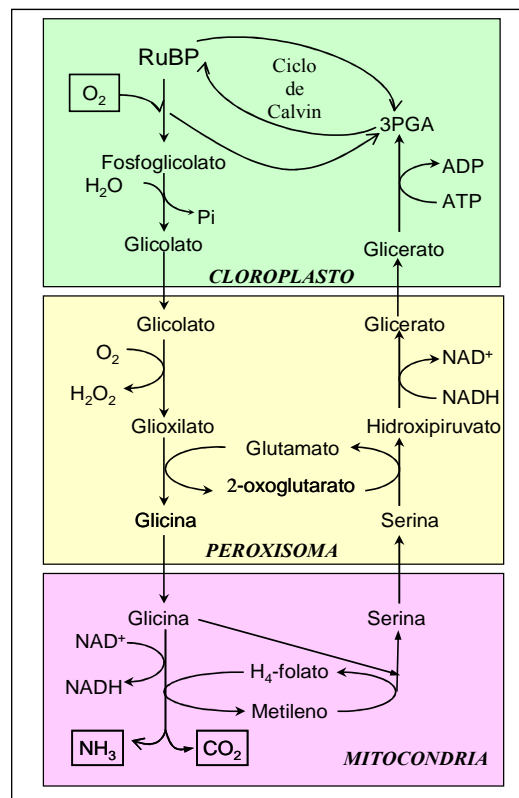


Figura 8. Esquema de la ruta fotorrespiratoria. El reciclaje de 2-fosfoglicolato a 3PGA en el ciclo fotorrespiratorio (ciclo C₂) contempla una serie de reacciones enzimáticas que requiere el concurso coordinado de tres orgánulos diferentes: cloroplasto, peroxisoma y mitocondria (Adaptado de Eckardt, 2005).

El resultado de la actividad oxigenasa es una pérdida constante de RuBP, unida a un descenso de la eficiencia de la fijación de carbono hasta un 50% (Schneider et al., 1992), que junto al consumo de ATP y poder reductor, disminuye la eficiencia energética de la fotosíntesis. Aspectos que tendrán implicaciones en el rendimiento de los cultivos, el uso del nitrógeno y el agua por las plantas y en el ciclo global del carbono. Si bien, se ha propuesto que en ciertas circunstancias tal consumo energético pudiera ser beneficioso; por ejemplo, pudiendo funcionar como un sumidero, disipando el exceso de energía en condiciones fotoinhedoras cuando la disponibilidad de CO₂ es limitada (Osmond, 1981).

En las últimas décadas, la Rubisco ha sido objeto de numerosos estudios de manipulación genética enfocados a mejorar sus propiedades catalíticas, por su importancia en la fijación del carbono. Sin embargo, hasta la fecha, se carece de información exhaustiva sobre las diferencias de especificidad de la Rubisco entre especies vegetales, los residuos que puedan mejorar la especificidad del enzima por el CO₂ o el O₂, o la eficiencia catalítica en la carboxilación; si bien parece plausible que con la emergencia de nuevas tecnologías como la genómica y la proteómica se avance en el esclarecimiento de dichos aspectos, que ayudarán a su vez a la comprensión del proceso fotosintético.

1.4.2. Biosíntesis de fotoasimilados

La sacarosa y el almidón constituyen los productos primarios de la asimilación fotosintética del carbono en las hojas de la mayoría de las plantas (Zeeman et al., 2007). El carbono fijado durante el día puede ser exportado desde el cloroplasto al citosol, como triosas fosfato a través del translocador de TP (Flügge et al., 1989), haciendo posible la síntesis de sacarosa. Dicho carbohidrato es posteriormente cargado al floema de los tejidos fuente (hojas maduras) para ser distribuido a órganos heterotróficos de la planta -raíces, semillas, hojas en desarrollo, frutos o tubérculos- y empleado en procesos de crecimiento activo, en la biosíntesis de celulosa, de carbohidratos de almacenaje -almidón y fructanos- o lípidos (Fallai et al., 2008). El almidón, por su parte, es sintetizado al mismo tiempo que la sacarosa en hojas, mediante una ruta gluconeogénica que tiene lugar en el cloroplasto. El almidón comprende polímeros de glucosa que son empaquetados formando gránulos densos (Bulón et al., 1998; Zeemann et al., 2002) y representa un almacenaje transitorio de carbono, que es movilizado durante la noche para soportar el metabolismo de la hoja y continuar la exportación y el mantenimiento de la síntesis de sacarosa (Niittyla et al., 2004).

1.4.2.1. Síntesis de almidón

Es comúnmente aceptado que la biosíntesis de almidón (Figura 5) en hojas verdes tiene lugar exclusivamente en el cloroplasto (Lunn, 2007), siendo el almidón el producto final de la ruta en la que la ADPglucosa pirofosforilasa (AGPasa) utiliza la glucosa-1-fosfato (G1P) y el ATP generado fotoquímicamente para sintetizar ADPglucosa, que sirve como donador inmediato de glucosilos para la almidón sintasa (Preiss, 1988). La reacción catalizada por la AGPasa cloroplástica se considera el principal paso limitante del proceso biosintético, por tratarse de un enzima altamente regulado en todas las plantas analizadas (Ballicora et al., 2004). Sin embargo, se ha mostrado que en el endospermo de cereales, como trigo, maíz, cebada y arroz, la actividad AGPasa tiene una localización citosólica, y la ADPglucosa necesaria para la síntesis de almidón es generada en el citosol e importada por los amiloplastos vía un transportador específico localizado en la membrana de los amiloplastos (Denyer et al., 1996; Sikka et al., 2001; Tetlow et al., 2003). Además, la localización plastidial generalmente aceptada para la síntesis de ADPglucosa en otras especies y órganos ha sido cuestionada recientemente por la propuesta de que la ADPglucosa es sintetizada en el citosol no por la AGPasa sino por la sacarosa sintasa (Baroja-Fernández et al., 2004). Sin embargo, es difícil conciliar dicha proposición en base a la amplitud de evidencias genéticas y bioquímicas que ponen de manifiesto que la AGPasa plastidial proporciona la mayoría de la ADPglucosa para la biosíntesis de almidón (Neuhaus et al., 2005; Lunn et al., 2007).

En cloroplastos de tejidos fotosintéticos, la AGPasa es alostéricamente activada por 3PGA e inhibida por Pi (Kleczkowski et al., 1993). En órganos de almacenaje, sin embargo, el papel de la regulación alostérica de la AGPasa es menos evidente, ya que tanto el endospermo del trigo (Olive et al., 1989) como los embriones de guisante (Hylton & Smith, 1992) y judía (Weber et al., 1995) poseen isoformas con baja sensibilidad o insensibles a la regulación 3PGA/Pi. Se ha mostrado también la regulación a nivel transcripcional de esta ruta biosintética, de manera que la sacarosa y glucosa aumentan la expresión de varios genes de AGPasa en plantas (Salanoubat & Belliard, 1989; Müller-Röber et al., 1990; Krapp & Stitt, 1995). Además, la trehalosa, carbohidrato estructuralmente similar a la sacarosa cuyo papel atribuido en plantas es el de agente protector frente al estrés, aumenta también la expresión de uno de los genes que codifica la subunidad grande de la AGPasa en *Arabidopsis* (Wingler et al., 2000). Sin embargo, el nitrato disminuye la expresión génica de la *agpS2* en tabaco, conduciendo a un descenso de

la síntesis de almidón (Scheible et al., 1997a); el fosfato reprime también la expresión del enzima (Nielsen et al., 1998).

Finalmente, una de las aportaciones más recientes al estudio de la biosíntesis de almidón es el descubrimiento de que la AGPasa está sujeta a regulación redox post-traducciona que proporciona un nuevo mecanismo para ajustar la velocidad de síntesis de almidón al suministro de sacarosa en tubérculos de patata (Tiessen et al., 2002). El mecanismo involucra la formación de un puente de cisteína entre las subunidades catalíticas del heterotetrámero de la AGPasa, que afecta a las propiedades cinéticas del enzima por alteración de su afinidad por el sustrato y por modificación de su sensibilidad a efectores alostéricos. Mostrándose con posterioridad que la AGPasa en hojas de *Arabidopsis*, guisante y patata está también sujeta a regulación redox post-traducciona (Hendrick et al., 2003). Además, se han mostrado evidencias de que tanto la sacarosa como la glucosa conducen a una activación redox de la AGPasa por medio de rutas diferentes que involucran la SnRK1 y la hexoquinasa endógena, respectivamente (Tiessen et al., 2003). El mencionado mecanismo de regulación post-traducciona de la AGPasa permitirá que la síntesis de almidón sea regulada en respuesta a la luz y los niveles de azúcares en la hoja, complementando el sistema de regulación que coordina el flujo de metabolitos con el reciclado de fosfato durante la fijación del carbono fotosintético y la síntesis de sacarosa (Tiessen et al., 2003).

1.4.2.2. Síntesis de sacarosa

La sacarosa, como se ha mencionado con anterioridad, es el principal producto de la fotosíntesis exportado desde las hojas para suministrar al resto de la planta el carbono y la energía necesaria para el crecimiento y la síntesis de reservas de almacenaje (Lunn & Furbank, 1999). La sacarosa, en sí misma, es el principal compuesto de almacenaje en algunas plantas, tal es el caso del tallo de la caña de azúcar, la raíz de la remolacha azucarera y los frutos de ciertas especies vegetales (Lunn & MacRae, 2003). Si bien, bajo ciertas condiciones ambientales, la sacarosa es acumulada como mecanismo de protección frente al estrés como ocurre con las temperaturas bajas (Strand et al., 2003) y la sequía (Yang et al., 2001). Además, se han mostrado evidencias de que la sacarosa en plantas desempeña una función señalizadora, modulando la expresión de varios genes que codifican enzimas involucrados en diferentes rutas metabólicas (Ciereszko et al., 2001; Stitt et al., 2002), transportadores (Vaughn et al., 2002) y proteínas de almacenaje (Zourelidou et al., 2002). Junto a genes que están involucrados en la división celular y

diferenciación (Ohto et al., 2001) y el control de procesos de desarrollo; entre los que se incluyen, la inducción de la floración (Ohto et al., 2001), la diferenciación de tejidos vasculares (Uggla et al., 2001), desarrollo de semillas (Iraqi & Tremblay, 2001) y acumulación de productos de reserva (Rook et al., 2001; Davoren et al., 2002). Por tanto, la sacarosa no sólo proporciona el combustible para el crecimiento de las plantas sino que también parece tener influencia sobre su propio destino. Sin embargo, los detalles de las rutas de señalización por azúcares no han sido esclarecidos, y se especula sobre la interacción de estas rutas con la de señalización de hormonas (Rook et al., 2001; Finkelstein & Gibson, 2002).

La sacarosa es fundamentalmente sintetizada en el citosol de las células del mesófilo de las hojas a partir de las triosas fosfato que son exportadas desde el cloroplasto vía el translocador de TP (Figura 5) (Stitt et al., 1987). La ruta de síntesis opera tanto en tejidos fotosintéticos como heterotróficos y, en general, se asume que el enzima clave que controla el flujo del carbono en sacarosa es la sacarosa fosfato sintasa (SPS) (Huber & Huber, 1996) que cataliza la síntesis de sacarosa-6-fosfato, la cual es posteriormente hidrolizada por la sacarosa fosfatasa produciendo sacarosa y Pi (Lunn & MacRae, 2003). Recientemente se han mostrado evidencias de la presencia de sacarosa en el cloroplasto (Gerrits et al., 2001), indicativo por una parte de que la envuelta del cloroplasto es menos impermeable a la sacarosa de lo que inicialmente se pensaba, y por otra, que la sacarosa pudiera estar directamente involucrada en la regulación fotosintética y de otros procesos de los plastidios (Tiessen et al., 2002; Oswald et al., 2001).

En plantas C_3 se han descrito dos mecanismos de control básicos para la regulación de la síntesis de sacarosa ejercidos a nivel de los enzimas: (i) fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica (FBPasa citosólica) y (ii) sacarosa fosfato sintasa.

(i) Fructosa-1,6-Bisfosfatasa Citosólica

Cataliza la conversión de la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-P (Stitt, 1990). La actividad del enzima es regulada por un potente inhibidor alostérico, la fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6bisP); metabolito que no sólo contribuye a la coordinación de la síntesis de sacarosa con la velocidad de fijación de CO_2 sino que indirectamente participa en el control de la partición de asimilados entre sacarosa y almidón (Stitt, 1990; Markham & Kruger, 2002).

Los niveles de F2,6bisP dependen de los enzimas responsables de su síntesis y degradación, la fructosa-6-fosfato-2-quinasa (F6P2K) y la fructosa-2,6-bisfosfatasa

(F2,6bisPasa), respectivamente (Okar et al., 2001). Ambas actividades residen en un enzima bifuncional F2KP sujeto a una compleja regulación alostérica por metabolitos (Markham & Kruger, 2002; Villadsen & Nielsen, 2001). La actividad F6P2K es estimulada por fructosa-6- fosfato (F6P) y Pi e inhibida por esteres fosfato de tres átomos de carbono, entre los que se incluyen el 3PGA y la DHAP, mientras que la actividad F2,6bisPasa es inhibida por F6P y Pi. Estas propiedades permiten que el nivel de F2,6bisP responda sensiblemente a la disponibilidad de fotosintatos y a la acumulación de sacarosa (Nielsen et al., 2004).

(ii) Sacarosa Fosfato Sintasa

La SPS es un enzima altamente regulado que cataliza la penúltima reacción en la síntesis de sacarosa en plantas (Toroser et al., 2000), en concreto la síntesis de sacarosa-6- fosfato a partir de UDPglucosa y F6P. Su actividad es controlada por una jerarquía de mecanismos que involucran modificaciones post-traduccionales, control directo por efectores alostéricos (Huber & Huber, 1996) e interacciones proteína-proteína con la implicación de proteínas 14-3-3 (Toroser et al., 1998). Las plantas contienen varias isoformas de SPS que parecen ser, al menos en parte, funcionalmente distintas (Langenkämper et al., 2002; Chen et al., 2005). En *Arabidopsis* se ha puesto de manifiesto la presencia de cuatro genes que codifican dicha enzima (Langenkämper et al., 2002), dichos genes de SPS de *Arabidopsis* y todas las secuencias de SPS de plantas conocidas se engloban en tres familias -A, B y C-, con divisiones entre familias en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se estima que todas las plantas superiores contienen al menos una forma representativa de cada familia SPS en su genoma y que un miembro de cada familia es expresado, aunque una isoforma puede predominar (Langenkämper et al., 2002; Lunn & MacRae, 2003). La comprobación de que las plantas tienen una multiplicidad de genes SPS complica la interpretación de muchos estudios previos de dicho enzima, los cuales estuvieron basados en asumir la uniformidad de las estimaciones de actividad SPS, estado de activación/fosforilación o expresión génica (Lunn & MacRae, 2003).

Este enzima clave de la ruta biosintética de sacarosa es modulado reversiblemente por transiciones luz/oscuridad y el mecanismo responsable se fundamenta en cambios en el estado de fosforilación del enzima (Huber et al., 1989). En la luz, la SPS es activada por desfosforilación catalizada por una proteína fosfatasa del tipo 2A (Siegl et al., 1990) y, en la oscuridad, es inactivada por fosforilación mediada por una quinasa (Huber & Huber, 1992), proteína quinasa III (PK_{III}) (McMichael et al., 1995; Toroser & Huber, 1997). Al

menos dos tipos de proteínas quinasas han sido implicadas en la fosforilación de la SPS: una proteína quinasa (SnRK1) relacionada con las proteínas quinasas de sacarosa no fermentantes de levadura (SNF1) (Sugden et al., 1999; Winter & Huber, 2000) y una proteína quinasa dependiente de calcio (CDPK) (Winter & Huber, 2000). Huang & Huber (2001) mostraron evidencias de que las SPS de dicotiledóneas son principalmente moduladas por SnRK1, mientras que tanto las SnRK1 como las CDPK podrían fosforilar SPS de monocotiledóneas.

La fosforilación del enzima ocurre en varios residuos serina de la proteína, de los cuales tres se conoce que son importantes para la regulación (Winter & Huber, 2000). La fosforilación reversible de la serina 158 y de la serina 424 en espinaca, parece ser responsable de la modulación luz/oscuridad (Toroser et al., 1999) y de la activación por estrés osmótico (Toroser & Huber, 1997), respectivamente. Mientras que la fosforilación de la serina 229 promueve la interacción dependiente de magnesio con las proteínas 14-3-3 (Toroser et al., 1998), que parece inhibir la actividad SPS. Aunque el papel de esta asociación con proteínas 14-3-3 no está claro, pudiera facilitar la interacción del enzima con otras proteínas como la SPS fosfatasa o la UDPglucosa pirofosforilasa (Winter & Huber, 2000).

Finalmente, el enzima es alostéricamente regulado por ciertos metabolitos, siendo la glucosa-6-fosfato (G6P) -activador- y el Pi -inhibidor-, los cuales no sólo actúan como efectores alostéricos del propio enzima, sino también como efectores de los enzimas de interconversión de la SPS. El Pi inhibe la SPS fosfatasa que desfosforila y activa el enzima (Weiner et al., 1992) y la G6P inhibe la proteína quinasa (Toroser et al., 2000). Estos cambios metabólicos desempeñarán un papel importante en la regulación de la velocidad de síntesis de sacarosa con la velocidad fotosintética (Huber & Huber, 1992).

1.4.2.3. Síntesis de fructanos

Junto a la sacarosa y el almidón existe un tercer carbohidrato de reserva en plantas, los fructanos, que son polímeros lineales o ramificados de fructosa (Vijn & Smeekens, 1999), constituidos por una molécula de sacarosa con fructosas adicionales unidas con enlaces $\beta(2,1)$ y $\beta(2,6)$ (Gadegaard et al., 2008). Son compuestos de almacenaje en cerca de un 15% de las angiospermas (Hendry, 1993) y entre las especies acumuladoras de fructanos destacan cereales de gran cultivo como -el trigo y la cebada-, junto a otras gramíneas -Lolium, Festuca-, hortalizas -cebolla, lechuga, alcachofa y achicoria- y ciertas plantas ornamentales -dalia, tulipán- (Pollock & Cairns, 1991; Van der Meer et al., 1994). Estos

carbohidratos, solubles en agua, difieren unos de otros en su longitud (grado de polimerización), ramificaciones, tipo de uniones entre fructosas adyacentes y posición del residuo de glucosa (Lasseur et al., 2006). Los fructanos junto a su papel en la partición de asimilados (Pollock & Cairns, 1991), están involucrados en la resistencia a estreses ambientales como el frío (Tognetti et al., 1990; Pérez et al., 2001) y la sequía (Roover et al., 2000; Hinch et al., 2002). Se ha sugerido que actúan como osmoprotectores, participando en la estabilización de membranas (Konstantinova et al., 2002; Hinch et al., 2002; Van den Ende et al., 2005). Parece ser que desempeñan un papel importante durante el llenado del grano (Willenbrink et al., 1998; Morvand-Bertrand et al., 2001) y facilitan la descarga de sacarosa al floema y el mantenimiento del potencial osmótico, asegurando un aumento celular en las zonas de elongación (Pavis et al., 2001; Pollock et al., 2003). Recientemente, han adquirido importancia como alimentos funcionales o saludables, ya que son compuestos prebióticos que promueven selectivamente bacterias beneficiosas para el colon -lactobacillus y bifidobacterias- (Van Laere & Van den Ende, 2002; Ritsema & Smeekens, 2003) y estimulan la reabsorción de calcio además de contribuir al descenso de los niveles de insulina, fosfolípidos, colesterol y triacilglicerol en el suero sanguíneo (Ritsema & Smeekens, 2003), desempeñando posiblemente un importante papel en la prevención de cáncer de colon, osteoporosis, diarreas infecciosas o enfermedades cardiovasculares (Roberfroid & Delzenne, 1998).

Los fructanos pueden almacenarse tanto en el grano como en órganos vegetativos, hojas y tallo, dependiendo del estado de desarrollo de la planta y condiciones ambientales, tales como, intensidad luminosa, suministro de agua, temperatura y nutrición (Wang & Tillberg, 1996; Van der Meer et al., 1994; Yang et al., 2004; Morcuende et al., 2004a, 2005). En plantas se han identificado cinco tipos de fructanos (Tabla 1), que difieren estructuralmente, y varían en el tipo de uniones glicosídicas: serie inulina formados por unidades de fructofuranosil unidas por enlaces lineales $\beta(2,1)$, los cuales se encuentran principalmente en dicotiledóneas; serie levanos formados por unidades de fructofuranosil unidas por enlaces $\beta(2,6)$; la serie levano mixto comprende fructanos más complejos, ramificados, con uniones $\beta(2,1)$ y $\beta(2,6)$ tipo gramíneas, comunes en monocotiledóneas; mientras que las neoserias inulina y levanos presentan enlaces $\beta(2,1)$ y $\beta(2,6)$, respectivamente (Vijn et al., 1997; Vijn & Smeekens, 1999; Chalmers et al., 2005).

La sacarosa es el sustrato para la biosíntesis de fructanos, la cual tiene lugar en la vacuola por acción de fructosiltransferasas especializadas (Figura 5) (Pollock & Cairns, 1991). La adición de una fructosa a uno de los tres grupos hidroxilo de la sacarosa genera

uno de los tres diferentes trisacáridos básicos, 1-cestosa, 6-cestosa o neocestosa (6G-cestosa) (Tabla 1), precursores de todos los fructanos de mayor grado de polimerización (French, 1989). La síntesis de fructanos se inicia por la transferencia de un fructosilo de una molécula de sacarosa a otra para formar un trisacárido (1-cestosa) y glucosa, reacción catalizada por la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1SST) (Vijn et al., 1998). La sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6SFT) transfiere un grupo fructosilo a la fructosa intermedia de una cestosa para producir bifurcosa (1,6-cestotetraosa), un fructano ramificado (Sprenger et al., 1995). La fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1FFT) cataliza la formación y extensión de fructanos con uniones $\beta(2,1)$ en las Asteraceas (Bonnett et al., 1997; Vergauwen et al., 2003) y las Poaceas (Kawakami & Yoshida, 2005). Un enzima diferente es el encontrado en las Asparagaceas la fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) que cataliza una transfructosilación desde fructooligosacáridos al C6 del residuo de glucosa de la sacarosa (Ritsema et al., 2003; Ueno et al., 2005).

CLASES	TIPO DE ENLACE	SERIES DE TRISACÁRIDOS
SERIE INULINA	$\beta(2,1)$	1-cestosa (G1-2F1-2F)
SERIES LEVANOS	$\beta(2,6)$	6-cestosa (G1-2F6-2F)
LEVANO MIXTO	$\beta(2,1)$ y $\beta(2,6)$	1-cestosa y 6-cestosa
NEOSERIE INULINA	$\beta(2,1)$	Neocestosa (F2-6G1-2F)
NEOSERIE LEVANOS	$\beta(2,6)$	Neocestosa

Tabla 1. Tipos de fructanos identificados en plantas (Chalmers et al., 2005).

Las fructosiltransferasas necesarias para la producción de fructanos en plantas superiores son la 1SST, 1FFT, 6SFT y la 6G-FFT (Sprenger et al., 1995; Van den Ende & Van Laere, 1996; Vijn et al., 1997). Sin embargo, ninguna especie vegetal investigada hasta la fecha, se ha encontrado que disponga de los cinco tipos de fructanos aislados y los cuatro genes que codifican las fructosiltransferasas. Siendo tres fructosiltransferasas - 1SST, 1FFT y 6SFT- el máximo número de enzimas clonadas y caracterizadas en una misma especie, caso del trigo (Kawakami & Yoshida, 2002, 2005).

Se ha mostrado que tanto la iluminación como la incubación de hojas con sacarosa inducen la síntesis de fructanos. Además, la sacarosa o análogos de sacarosa, aumentan la expresión y actividad de los enzimas involucrados en su síntesis (Müller et al., 2000), en especial la 6SFT. De manera que la sacarosa es no sólo el sustrato para la síntesis de fructanos sino un efector para la inducción de la actividad fructosiltransferasa (Sprenger et

al., 1995). Estudios con hexosas susceptibles de ser fosforiladas por hexoquinasa no produjeron una acumulación de fructanos, lo que sugiere que la regulación de la síntesis de fructanos es independiente de la hexoquinasa, pudiendo posiblemente asociarse a la sensibilización por sacarosa (Müller et al., 2000). Las proteínas quinasas y fosfatasa están involucradas en la inducción de fructosiltransferasas (Martínez et al., 2001). Ciertos estreses ambientales, algunos de los cuales se han mencionado con anterioridad, como la sequía (Roover et al., 2000), temperaturas bajas (Tognetti et al., 1990; Pérez et al., 2001), disminución del tamaño de la espiga (Martínez-Carrasco et al., 1993) o deficiencia en nitrógeno (Wang et al., 2000) conducen a una mayor acumulación de fructanos. Además, ciertos nutrientes, como el nitrato y el fosfato, inhiben la síntesis de fructanos. Sin embargo, el mecanismo es bien diferente, mientras el nitrato es una señal negativa para la expresión de las fructosiltransferasas, independiente de la señalización por carbohidratos (Morcuende et al., 2004a); el fosfato inhibe la actividad SPS reduciendo el sustrato para la síntesis de fructanos (Morcuende et al., 2005).

1.5. Metabolismo del nitrógeno

1.5.1. Asimilación de nitrógeno

El crecimiento y desarrollo de las plantas requiere nutrientes, agua, CO₂, temperatura y luz, dentro de un rango, que suele ser dependiente del genotipo (Andrews et al., 2001). Generalmente, en plantas superiores los nutrientes y el agua son captados del suelo por la raíz, mientras que el CO₂ y la luz son recursos adquiridos por la parte aérea (Lawlor, 2002; Andrews et al., 2001). El nitrógeno (N) es el nutriente mineral necesitado en mayor medida por las plantas (Crawford, 1995) y el principal constituyente de proteínas, ácidos nucleicos, ciertos cofactores y metabolitos secundarios (Marschner, 1995; Scheible et al., 2004). El N afecta a todas las funciones de la planta, desde el metabolismo a la distribución de los recursos, así como el crecimiento y desarrollo, incluyéndose cambios en la arquitectura de la raíz, senescencia, floración, tuberización etc. (Stitt, 1999; Stitt & Krapp, 1999). La disponibilidad de nitrógeno se considera el principal factor nutricional limitante de la productividad de los cultivos agrícolas (Good et al., 2004; Karungi et al., 2006; Barbanti et al., 2007) y, en particular, de los cereales como el trigo (Hirel et al., 2007). Aunque el nitrógeno está presente en la atmósfera, es a menudo un nutriente limitante ya que sólo algunas plantas, en asociación simbiótica con bacterias, son capaces de utilizar esta fuente de nitrógeno. Tal es el caso de las leguminosas, en las que el dinitrógeno atmosférico es convertido a amonio por la actividad nitrogenasa presente en la bacteria *rhizobium* que

establece una interacción simbiótica, vía órganos especializados de la raíz denominados nódulos; siendo el amonio generado rápidamente asimilado en compuestos nitrogenados que son exportados fuera de los nódulos (Hodges, 2002). Formas orgánicas de nitrógeno, las cuales pueden encontrarse temporalmente en los suelos en concentraciones elevadas, como la urea, pueden ser asimiladas por las plantas, aunque suelen ser rápidamente convertidas a amonio y nitrato por los microorganismos del suelo (Andrews et al., 2004). En suelos no mejorados, los aminoácidos pueden también estar disponibles y ser adquiridos directamente por las plantas (Bardgett et al., 2003). Sin embargo, existen evidencias de que el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) son las formas principales de nitrógeno absorbidas y asimiladas por la mayoría de las plantas superiores que no son fijadoras de nitrógeno, las cuales proceden de la mineralización de la materia orgánica o de los fertilizantes (Raven et al., 1992; Lea & Azevedo, 2006). Mientras que el amonio es la forma reducida de nitrógeno captada por las plantas del suelo para su asimilación y empleo posterior en la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, vía el ciclo GS/GOGAT, ruta que comprende los enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT); el nitrato debe ser reducido a amonio por la acción secuencial de los enzimas citosólicos y cloroplásticos, nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), respectivamente (Lea & Ireland, 1999; Hodges, 2002), permitiendo de este modo su posterior incorporación en materia orgánica (Marschner, 1995) (Figura 9). Por ello, la ruta GS/GOGAT desempeña un papel importante en la asimilación del nitrógeno, ya que la glutamina y el glutamato producidos podrán ser empleados como precursores para la biosíntesis de otros compuestos nitrogenados, entre los que se incluyen aminoácidos, nucleótidos, clorofilas, poliaminas y alcaloides (Lea & Ireland, 1999), necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

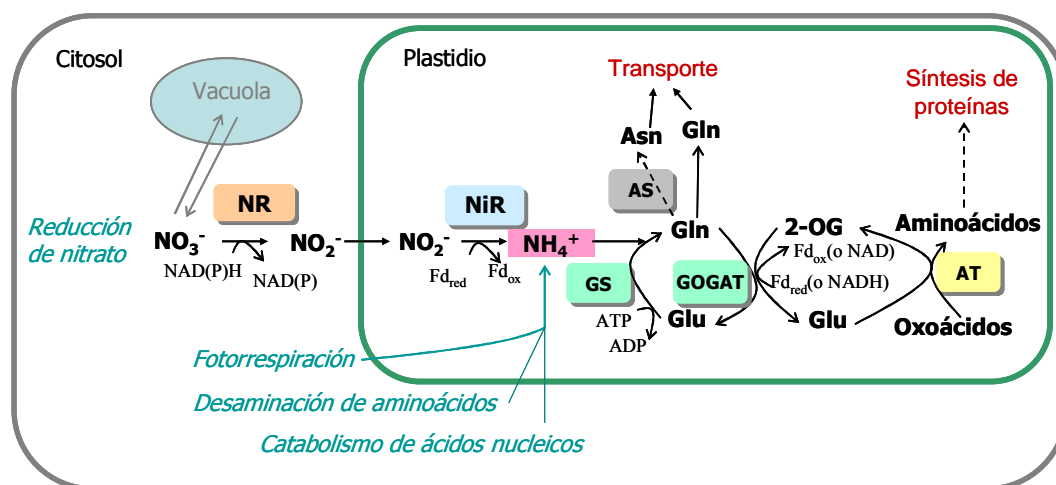


Figura 9. Procesos metabólicos que generan amonio, junto a su asimilación y transporte (Adaptado de Maldonado et al., 2000).

A pesar de la existencia de diferentes fuentes de nitrógeno, se sabe que la mayoría de las plantas cultivadas emplean nitrato. Nutriente que es adquirido a través de la membrana plasmática de las células epidérmicas y corticales de la raíz, y bien puede ser reducido y asimilado en la propia raíz, o en las hojas, dependiendo de las especies vegetales y la disponibilidad de nitrógeno (Crawford, 1995; Orsel et al., 2002); o puede ser transportado a las partes aéreas de la planta como NO_3^- o como productos de su asimilación, asparragina y/o glutamina; o bien, su destino, puede ser el almacenaje en vacuolas de la raíz o de los órganos aéreos. Siendo varios los factores fisiológicos, genéticos y ambientales que condicionarán la asimilación, distribución o almacenaje de nitrato en la planta (Crawford et al., 2000). El nitrato almacenado en la vacuola servirá como reservorio para el mantenimiento de procesos de crecimiento en periodos en los que la disponibilidad de nitrógeno externo pudiera llegar a ser limitante (der Leij et al., 1998). Aunque en muchas especies vegetales de cultivo la asimilación primaria de N ocurre predominantemente en las hojas y es modulada en respuesta a la fotosíntesis (Kaiser & Foster, 1989; Pace et al., 1990; Ferrario-Mery et al., 1998), por tratarse de procesos metabólicos estrechamente relacionados (ver apartado 1.6); en otras, especialmente las silvestres, el nitrato es asimilado en las raíces usando esqueletos carbonados y energía derivada del metabolismo respiratorio.

Finalmente, es importante indicar que las plantas tienen que competir por el nitrógeno del suelo, con procesos bióticos y abióticos, tales como la erosión, filtración, consumo microbiano etc. Y para poder ser competitivas han desarrollado mecanismos complejos que les permiten la adquisición de nitrógeno a bajas concentraciones, el empleo de una variedad de formas de nitrógeno y la integración del metabolismo del nitrógeno con el del carbono (Crawford, 1995). Mecanismos que les facilita el control de la velocidad de crecimiento, la razón carbono/nitrógeno, la concentración de reductores, balance de iones y pH y el flujo de asimilados a las células y al resto de la planta (Crawford et al., 2000) y, en definitiva, ajustar su crecimiento a la disponibilidad de dicho nutriente. Son varias las revisiones bibliográficas que discuten el papel del nitrógeno en la regulación del metabolismo y el desarrollo (Stitt, 1999; Stitt & Krapp, 1999; Scheible et al. 2004), algunos de cuyos aspectos más relevantes serán tratados a continuación.

1.5.1.1. Absorción de nitrógeno

Las plantas requieren más de quince elementos minerales para completar su ciclo de vida. Elementos que incluyen, por una parte, los nutrientes mayoritarios -nitrógeno,

fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre- y, por otra, una amplia variedad de micronutrientes, entre los que destacan el zinc y el hierro. Se sabe que las diferentes especies vegetales requieren cantidades variables de estos elementos minerales para crecer y que los diversos tipos de cultivo, ecotipos y variedades difieren en su capacidad para adquirir y utilizar los elementos minerales (Marschner, 1995). Además, es también conocido que la heterogeneidad en la disponibilidad de nutrientes del suelo es uno de los factores que más notablemente influye en el estado nutricional de las plantas, junto con la demanda de recursos por la propia planta, y las variaciones diurnas y estacionales en su velocidad de crecimiento (Glass et al., 2002). Si bien, de todos los nutrientes necesitados por las plantas, el nitrógeno es el demandado en mayor medida, y su deficiencia considerada uno de los factores limitantes de la productividad de los cultivos; y en ausencia de sequía, el factor más influyente en el control de la velocidad de acumulación de biomasa (Jensen et al., 1990).

Las concentraciones de nitrógeno en solución en suelos agrícolas pueden variar en varios órdenes de magnitud (Jackson & Caldwell, 1993), siendo la situación incluso más variable en suelos naturales. El nitrógeno es también el nutriente más susceptible a pérdidas por desnitrificación y su disponibilidad afectada por el tipo de suelo, la fuente de nitrógeno, la rotación de los cultivos y la precipitación (Hatfield et al., 2001). Factores que han hecho necesario el uso de fertilizantes nitrogenados para conseguir una adecuada productividad y calidad de los cultivos (Marschner, 1995). Por ello, si en décadas pasadas, las prácticas agrícolas se basaban en aumentar la producción por aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados; sin tener en consideración las consecuencias socioeconómicas y ecológicas implícitas (Schlegel et al., 1996; Cohen et al., 1996); en la actualidad, la adopción de prácticas agronómicas sostenibles en armonía con el medio ambiente, enfatiza la necesidad de aumentar la eficiencia en el uso del nitrógeno de los cultivos. Este parámetro ha sido definido como la producción de grano por unidad de nitrógeno disponible en el suelo (Moll et al., 1982), el cual estima el producto de la eficiencia en la absorción de N, que se correspondería con la capacidad de la planta para captar nitrógeno del suelo y la eficiencia en la utilización de N, que representaría la capacidad de la planta para transferir el nitrógeno al grano (Gallais & Hirel, 2004). En el caso de los cereales, que requieren elevadas cantidades de fertilizantes nitrogenados para maximizar la productividad, la eficiencia en el uso del nitrógeno estimada se encuentra en torno al 33% (Raun & Johnson, 1999). Por ello la productividad de los cultivos no depende únicamente de la cantidad total de materia seca producida, sino también, de cómo ésta es distribuida

entre las partes útiles o rentables económicamente de la planta (Jenkins & Mahmood, 2003). Y es por lo que desde un punto de vista agronómico se considera que una mayor eficiencia en el uso del N permitiría una reducción del empleo de fertilizantes nitrogenados sin que tuviera lugar un descenso en la productividad (Gallais & Hirel, 2004; Hirel et al., 2007). En base a ello, para la mayoría de los cultivos, los cultivares empleados en la actualidad se han seleccionado por su mayor capacidad para responder al nitrógeno aplicado (Andrews et al., 2004).

1.5.1.1.1. Absorción de amonio

Las plantas muestran bastante diversidad de estrategias en la absorción de nitrógeno, que se evidencian comparando distintas especies e individuos de una especie determinada que crecen en ambientes diferentes (Crawford & Glass, 1998). En muchos ecosistemas naturales y agrícolas, el NH_4^+ es la fuente predominante de nitrógeno (Pearson & Steward, 1993), tal es el caso de zonas boscosas y la tundra ártica, hábitats en los que las especies vegetales han llegado a especializarse en la absorción de dicha fuente de nitrógeno (Kielland, 1994; Stark & Hart, 1997). En suelos agrícolas en los que ambas formas de nitrógeno, NH_4^+ y NO_3^- , están presentes, la abundancia relativa de NH_4^+ comparado con el NO_3^- , en solución, es determinada por una serie de factores, entre los que destacan, la acumulación de materia orgánica, pH del suelo, temperatura, presencia de compuestos alelopáticos y oxigenación del suelo (Dijk & Eck, 1995). Típicamente, unos valores bajos de estos factores [¿también valores bajos de compuestos alelopáticos?], inhiben muchos microorganismos nitrificantes (Stark & Hart, 1997), conduciendo a mayores velocidades de amonificación que nitrificación (Eviner & Chapin, 1997). Si bien, la mayoría de las plantas absorben preferentemente amonio cuando ambas formas de nitrógeno están presentes, e incluso, cuando el nitrato pudiera superar al amonio en orden de magnitud (Gessler et al., 1998); principalmente porque el nitrato tiene que ser reducido antes de ser asimilado (von Wirén et al., 2000). Aunque ha sido mostrado también que el amonio inhibe fuertemente la captación de nitrato (Aslam et al., 1996).

El amonio es una fuente de nitrógeno importante cuyo estado de oxidación no requiere su reducción en las células vegetales (Salsac et al., 1987) y es un intermediario de muchas reacciones metabólicas y procesos fundamentales de las plantas, como la reducción de nitrato, fotorrespiración, metabolismo de fenilpropanoides, degradación de amidas de transporte y catabolismo de proteínas (Joy, 1988). Sin embargo, sus concentraciones en tejidos vegetales suelen mantenerse bajas (Howitt & Udvardi, 2000). Habiéndose

apreciado síntomas de toxicidad en algunas, pero no todas, las plantas que se cultivan en NH_4^+ como fuente exclusiva de nitrógeno (Britto & Kronzucker, 2002).

Estudios fisiológicos en distintas especies vegetales han mostrado que la entrada de NH_4^+ es multifásica, observándose al menos dos componentes cinéticamente diferentes para la absorción de amonio, uno de baja afinidad no saturable y otro de alta afinidad saturable (Ullrich et al., 1984; Wang et al., 1993). De manera que la absorción de amonio por las raíces tiene lugar gracias a una familia multigénica de transportadores de alta y baja afinidad (von Wirén et al., 2000; Glass et al., 2002). Los primeros genes involucrados en la adquisición de amonio fueron identificados en levaduras, y en *Arabidopsis*, por complementación funcional de un mutante de levadura defectivo en la absorción de amonio de alta afinidad (Ninnemann et al., 1994). En esta especie vegetal han sido identificados hasta seis genes pertenecientes a la familia de transportadores de amonio (AMT) (Glass et al., 2002), habiéndose presentado evidencias de la expresión de estos genes en los pelos radiculares de plantas (Lauter et al., 1996). Aparte de su papel central en la absorción de dicho nutriente, las proteínas AMT podrían actuar como sensores de amonio, como ocurre con los transportadores relacionados en levaduras (Lorenz & Heitman, 1998).

Finalmente, el transporte de alta afinidad de amonio se ha demostrado sólo para los genes *AMT1;1* de *Arabidopsis* (Ninnemann et al., 1994), mostrándose también que los niveles de transcritos de los genes de esta familia son regulados por el estado fisiológico de la planta y la afinidad por el sustrato y que la entrada de amonio en las raíces y los niveles de expresión del mensajero están altamente correlacionados diurnamente (Gazzarrini et al., 1999).

1.5.1.1.2. Absorción de nitrato

El nitrato es la principal fuente de nitrógeno para la mayoría de las plantas (Marschner, 1995), predominando en suelos agrícolas con elevado recambio de nitrógeno, pH neutro y buena aireación (Daniel-Vedele et al., 1998; Orsel et al., 2002). El nitrato junto a su papel como nutriente actúa también como molécula señalizadora regulando el metabolismo y crecimiento vegetal (Forde, 2002).

El transporte activo de NO_3^- a través de la membrana plasmática de las células corticales y epidérmicas de la raíz (Daniel-Vedele et al., 1998; Gojon et al., 1998) constituye el primer paso en la adquisición y uso de dicho nutriente. La absorción de nitrato está mediada por un mecanismo simporte $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ (De Angeli et al., 2006), en el

que el gradiente de potencial electroquímico de H^+ a través del plasmalema, necesario para sustentar dicho simporte, es mantenido por una H^+ -ATPasa que transporta unidireccionalmente H^+ al exterior con consumo energético en forma de ATP proveniente de la respiración de las células de la raíz (Maldonado et al., 2000). Las plantas son capaces de adaptarse a un amplio rango de concentraciones de nitrato exterior ($0.5\mu M$ a $50mM$), debido al funcionamiento de los sistemas de transporte de dicho nutriente (Crawford et al., 2000; Vidmar et al., 2000). Según criterios cinéticos, parecen coexistir varios sistemas de transporte de nitrato en las células de la raíz, cada uno de los cuales muestra diferentes características, en relación a su inducibilidad por nitrato, o en cuanto al rango de concentraciones de NO_3^- en el medio externo a los que operan (Forde & Clarkson, 1999). El primero de ellos opera a bajas concentraciones externas de NO_3^- , en el rango de $0,2mM$, e incluso cuando las plantas no han estado en presencia previa de nitrato. Este sistema de transporte de alta afinidad constitutivo (cHATS) es completado con otro sistema de alta afinidad inducible por muy bajas concentraciones de nitrato (iHATS) (Behl et al. 1988; Aslam et al., 1992). Cuando la concentración externa de NO_3^- alcanza valores superiores a $1mM$, se activa un sistema de transporte de baja afinidad (LATS) (Siddiqi et al., 1990; Glass et al., 1992), cuya actividad, en ciertas especies vegetales, es incrementada por suministro de NO_3^- (Kronzucker et al., 1995); por lo que se diferencian también transportadores constitutivos (cLATS) e inducibles (iLATS) (Okamoto et al., 2006). De manera que, en ciertos casos, el nitrato actúa como regulador de su propia absorción, propiedad que no es compartida con otros sistemas de transporte de iones como el sulfato o fosfato (Smith et al., 2000). Junto al propio nitrato, formas reducidas de nitrógeno están involucradas en la regulación de la absorción de NO_3^- . El amonio, ejerce efectos inhibitorios que parece ser que afectan más a los iHATS que a los cHATS o LATS (Kronzucker et al., 1999). Y la provisión de aminoácidos como única fuente de nitrógeno para el crecimiento de las plantas inhibe también la absorción de nitrato (Muller & Touraine, 1992).

Estudios moleculares han puesto de manifiesto la existencia de dos familias de genes que codifican los transportadores de NO_3^- en eucariotas, conocidas como las familias NRT1 y NRT2 (Orsel et al., 2002; Okamoto et al., 2003). Estas familias se piensa que se corresponden con las categorías fisiológicas, anteriormente descritas, de transportadores de alta y baja afinidad, sugiriéndose que los genes NRT1 y NRT2 codifican proteínas involucradas en la absorción de nitrato de baja afinidad y alta afinidad (LATS y HATS), respectivamente (Crawford & Glass, 1998; Forde, 2000). En *Arabidopsis thaliana* 4

miembros de la familia AtNRT1 han sido descritos: AtNRT1.1 (originalmente CHL1), AtNRT1.2 (originalmente NTL1), AtNRT1.3 (originalmente NTP3) y AtNRT1.4 (originalmente NTP2), aunque sólo AtNRT1.1 y AtNRT1.2 han sido objeto de análisis funcionales (Tsay et al., 1993; Hatzfeld & Saito, 1999; Huang et al., 1999). Aunque inicialmente se propuso que el gen AtNRT1.1 estaba involucrado exclusivamente en la absorción de nitrato de baja afinidad, se han mostrado evidencias de que también participa en la absorción de nitrato de alta afinidad; ya que bajos niveles de nitrato (100µM) inducen la expresión del gen, proponiéndose que se trata de un transportador de NO₃⁻ de doble afinidad (Wang et al., 1998). En cuanto a la familia de transportadores de nitrato de alta afinidad, en *Arabidopsis* se han aislado siete miembros AtNRT2, de los cuales el gen AtNRT2.1 es inducido por NO₃⁻ (Okamoto et al., 2003). Se han mostrado evidencias de que los 11 genes expresados en raíces, pertenecientes a ambas familias de transportadores NRT1 y NRT2, son también expresados en el tallo (Okamoto et al., 2003); si bien se desconocen las funciones de los transportadores en el tallo, aspecto que requerirá de estudios fisiológicos y genéticos sobre la absorción de nitrato en tejidos foliares.

1.5.1.2. Reducción de nitrato

La reducción de nitrato es un proceso biológico vital y la ruta principal por la que el nitrógeno inorgánico es incorporado en compuestos orgánicos en plantas superiores (Campbell, 1995). El nitrato absorbido por la raíz puede ser reducido y asimilado en éste órgano o bien ser transportado a la parte aérea de la planta y ser reducido en hojas (Faure et al., 2001), lo que depende de las especies vegetales y la disponibilidad de nitrógeno (Marschner, 1995). En organismos eucariotas, la reducción de nitrato a nitrito es catalizada por la NAD(P)H nitrato reductasa, de la que se han descrito tres formas: una enzima NADH específica, que se encuentra comúnmente en plantas y algas; una NAD(P)H específica encontrada sólo en hongos y formas NAD(P)H biespecíficas encontradas en los tres grupos, aunque principalmente en hongos (Campbell & Kinghorn, 1990). En la mayoría de especies vegetales la NR se encuentra tanto en raíces como hojas (Vaughn & Campbell, 1988), y se trata de una proteína perteneciente a la familia de enzimas que contienen cofactores de molibdeno, que se localiza en el citosol de las células corticales y epidérmicas de la raíz o del mesófilo de las hojas (Vaughn & Campbell, 1988). La NR cataliza la transferencia de dos electrones desde el NAD(P)H al nitrato, que es reducido a nitrito, y éste posteriormente a amonio, en los plastidios, en una reacción catalizada por la nitrito reductasa (NiR), que requiere seis electrones donados por la ferredoxina reducida (Figura 9) (Crawford, 1995).

La NR puede también catalizar la transferencia de un electrón desde el NAD(P)H al nitrito produciendo óxido nítrico (Yamasaki et al., 1999) y del NAD(P)H al O₂ para producir anión superóxido (Yamasaki & Sakihama, 2000). El poder reductor generado fotosintéticamente en los cloroplastos, es exportado al citosol, para ser empleado en la reducción del nitrato en las hojas. Sin embargo, en tejidos no fotosintéticos, como la raíz, el NADH requerido por la NR es producido por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria, que debe también ser exportado al citosol (Maldonado et al., 2000). Por su parte, la reducción de nitrito a amonio requiere el concurso de la ferredoxina reducida, que en hojas es generada fotoquímicamente en los cloroplastos, y en la raíz se forma a partir del NADPH producido en la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Crawford, 1995).

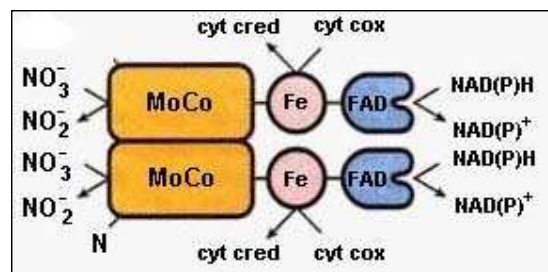


Figura 10. Diagrama esquemático del homodímero de la nitrato reductasa, en el que se indican los dominios funcionales (Crawford, 1995).

La reacción catalizada por la nitrato reductasa se considera el paso limitante en la reducción de nitrato, sujeto a múltiples niveles de regulación (Hoff et al., 1994). La NR es una enzima compleja que contiene diversos grupos prostéticos con distinta actividad redox. Es sólo activa como un homodímero y la dimerización es dependiente del cofactor de molibdeno (Campbell, 2001). El monómero consta de tres regiones distinguibles: el dominio del C-terminal asociado con el cofactor flavin-adenin dinucleótido (FAD), el dominio adyacente del citocromo b₅ de unión del Fe-hemo y el N-terminal del cofactor de molibdeno (MoCo) (Figura 10) (Fischer et al., 2005). La dimerización de la NR es mediada por el fragmento que contiene molibdeno, y en la proximidad del cofactor de molibdeno, se localiza una extensión N-terminal rica en residuos ácidos, que parece relacionarse con la regulación post-transcripcional del enzima (Nussaume et al., 1995). Los tres dominios se encuentran unidos entre sí por regiones bisagras hidrófilas que son muy susceptibles al ataque de proteasas (Crawford et al., 2000). Durante la catálisis, los electrones son transferidos del NADH o NAD(P)H al FAD, siendo lanzados con posterioridad vía reducción del citocromo b₅ hemo-Fe al dominio del cofactor de molibdeno. El átomo de molibdeno reducido en el dominio del MoCo transfiere

posteriormente dos electrones al nitrato que es reducido a nitrito y éste a amonio en los plastidios (Fischer et al., 2005).

En plantas superiores, la NR es regulada tanto a nivel transcripcional como post-traducciona por varias señales externas y endógenas, entre ellas, la luz, que se ha mostrado que activa la NR a ambos niveles (Kaiser & Huber, 2001; Lea et al., 2006). La expresión del enzima es inducida por nitrato (Cheng et al., 1992; Scheible et al., 1997a), reprimida por glutamina (Vincentz et al., 1993) y estimulada por azúcares (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993). Cuando los azúcares caen por debajo de un nivel umbral crítico la expresión del enzima es totalmente inhibida (Matt et al. 1998; Klein et al., 2000). La actividad NR es rápida y reversiblemente modulada en respuesta a transiciones luz/oscuridad (Figura 11), siendo inactivada por fosforilación de un residuo serina de la proteína (la serina 543 en espinaca), localizado en la bisagra 1 en la conexión de los dominios del grupo hemo y el MoCo, y el concurso de una proteína adicional conocida como inhibidor de proteína (Bachman et al., 1996a; Moorhead et al., 1996), que se ha identificado que pertenece al grupo de proteínas 14-3-3 (Kaiser & Huber, 2001; Mackintosh & Meek, 2001). De manera que en presencia de magnesio la forma fosforilada de la NR interacciona con las proteínas 14-3-3 y su actividad es inhibida (Athwal & Huber, 2002), por inducción de un cambio en la conformación del enzima que interrumpe el transporte electrónico entre el dominio hemo y el cofactor de molibdeno (Kaiser & Huber, 2001).

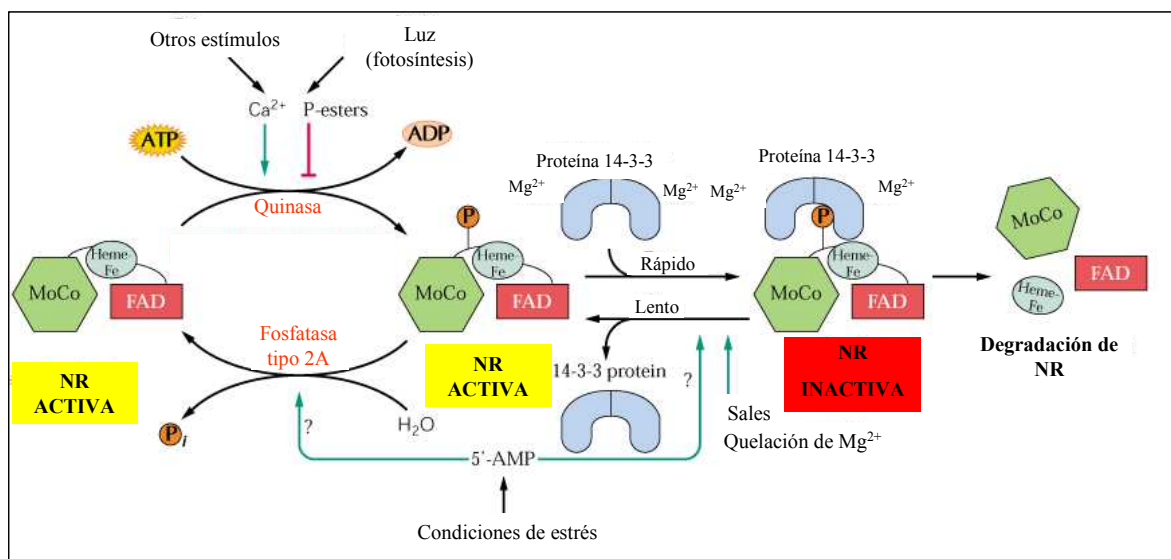


Figura 11. Regulación post-traducciona de la NR. La fosforilación dependiente de la unión de proteínas 14-3-3 regula la actividad de la NR en respuesta a señales endógenas y ambientales (Adaptado de Huber et al., 1996).

La fosforilación es catalizada por proteínas quinasas, dos de las cuales pertenecen a la familia de las CDPK (proteínas quinasas dependientes de calcio) y una es una SNF1 (quinasa relacionada con la sacarosa no fermentante) (Kaiser et al., 2002). Mientras que la activación del enzima tiene lugar por desfosforilación mediada por proteínas fosfatasas 2A (Weiner & Kaiser, 2001). La fosforilación reversible seguida de la unión en presencia de magnesio de las proteínas inhibitorias 14-3-3 facilita la inactivación post-traducciona y la degradación de la NR en la oscuridad o cuando los azúcares son bajos (Kaiser & Huber, 1994; Weiner & Kaiser, 1999) y ralentiza la desfosforilación (Bachmann et al., 1996b) y la activación del enzima. El estado de activación del enzima es frecuentemente empleado para describir los efectos post-traducción y refleja cuanto enzima se encuentra en forma activa no fosforilada (Huber et al., 1992).

Los azúcares, la acidificación citosólica y la anaerobiosis son factores conocidos que activan la NR en raíces y hojas (Provan & Lillo, 1999; Kaiser & Huber, 2001). En las hojas, la regulación de la NR está estrechamente acoplada a la fotosíntesis y la inactivación post-traducciona de la NR tiene lugar cuando la intensidad luminosa es repentinamente disminuida o las hojas son desprovistas de CO₂ (Provan & Lillo, 1999). La interrelación en la regulación de la NR y la fotosíntesis pudiera ser importante para evitar la acumulación de los productos de reacción de la NR (Lillo et al., 2004), si bien estos aspectos serán tratados con mayor detalle con posterioridad (ver apartado 1.5.1.2).

1.5.1.3. Coordinación de las tasas de absorción y reducción de nitrato

La demanda de N por la planta se define como la diferencia entre el N orgánico asimilado en un momento determinado y la cantidad de N requerido para el mantenimiento de una óptima velocidad de crecimiento (Imsande, 1992; Imsande & Touraine, 1994). La representación más sencilla de la absorción iónica según la demanda de nitrógeno, sería aquella en la que la concentración de nitrato en el citosol de las raíces controlase tanto la síntesis como la actividad de los transportadores responsables de su absorción. De hecho, usando mutantes de cebada deficientes en NR, se ha mostrado que la acumulación de nitrato en las células radiculares inhibe su propia absorción (King et al., 1993). Sin embargo, este esquema no parece ser funcional a nivel de planta entera, ya que los iones NO₃⁻ no son transportados por el floema y por ello no podrían enviar información a las raíces sobre la demanda de dicho nutriente. Esto hace suponer la existencia de señales internas capaces de detectar alteraciones específicas en la absorción de nitrato; moléculas cuya concentración, distribución o compartimentación sea dependiente de la demanda de N

de la planta o bien estén relacionadas con la asimilación de nitrato. En concreto, algunos productos de la asimilación de amonio parecen estar implicados en la regulación de la absorción de nitrato; pues se ha puesto de manifiesto que inhibidores de la actividad GS, el enzima que regula el paso primario de la asimilación de amonio, previenen el efecto inhibitor del amonio sobre la absorción de nitrato (Breteler & Siegerist, 1984). Muller & Touraine (1992) estudiaron el papel de los **aminoácidos** en la absorción de nitrato, mediante técnicas de inmersión de cotiledones de plántulas en soluciones concentradas de aminoácidos; y observaron que las tasas de translocación, vía floemática, de diferentes aminoácidos fue incrementada. Además, la arginina (Arg), alanina (Ala), asparragina (Asn) y glutamina (Gln) inhibían fuertemente la absorción de nitrato, mientras que el glutamato (Glu), la metionina (Met) y el aspartato (Asp) eran sólo inhibidores débiles; y otros aminoácidos o bien carecían de efecto o estimulaban ligeramente la absorción del mencionado nutriente, caso de la histidina (His), isoleucina (Ile), serina (Ser), valina (Val), fenilalanina (Phe) y leucina (Leu). Dicho patrón de inhibición fue similar cuando los aminoácidos se suministraron directamente a la raíz en el medio nutritivo (Muller & Touraine, 1992). Estas investigaciones permitieron sugerir que bien los aminoácidos, o ciertos péptidos, que circulan por el floema podrían intervenir en el control de la tasa de absorción de nitrato por las raíces.

Así mismo, el control del pH intracelular por los **ácidos orgánicos** constituye un mecanismo de regulación de la absorción de nitrato. Durante la reducción de nitrato se generan iones alcalinos (1 mol de equivalente de hidróxido por cada mol de nitrato reducido) que no pueden ser fácilmente expulsados de las células. Por lo que para el mantenimiento homeostático celular, las plantas sintetizan ácidos orgánicos fuertes, principalmente oxalacetato, a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y HCO_3^- , en la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa). Razón por la cual se acumulan cantidades considerables de ácidos orgánicos en hojas durante la reducción del NO_3^- ; siendo el número de cargas negativas generadas por reducción de nitrato, en plantas fertilizadas con dicho nutriente, tres órdenes de magnitud superior a la acumulación de carboxilatos, bases conjugadas de los ácidos carboxílicos (Touraine et al., 1988). Esta diferencia se debe a que los carboxilatos son transportados, principalmente como malato-K, por el floema hacia la raíz, donde son descarboxilados. Y mientras el HCO_3^- es expulsado al exterior de la raíz, el K^+ acompaña a un anión nitrato, recién absorbido, en su transporte por el xilema a las hojas (Figura 12) (Touraine et al., 1988). De este modo, la velocidad del transporte de malato-K depende de la velocidad de reducción de nitrato en

hojas y refleja el estatus de metabolismo del N en éstos órganos. En definitiva, el malato-K podría ser responsable de la coordinación entre la absorción y reducción de nitrato. Se ha puesto de manifiesto que la absorción de nitrato en raíces de plantas de soja intactas es alterada por malato, tanto si se aporta directamente en la superficie radicular o internamente vía floemática (Touraine et al., 1992). Lo que explica, que bien la estimulación o inhibición de la reducción de nitrato en la parte aérea de la planta, induce o reprime, respectivamente, la absorción de nitrato en raíces (Touraine et al., 1992).

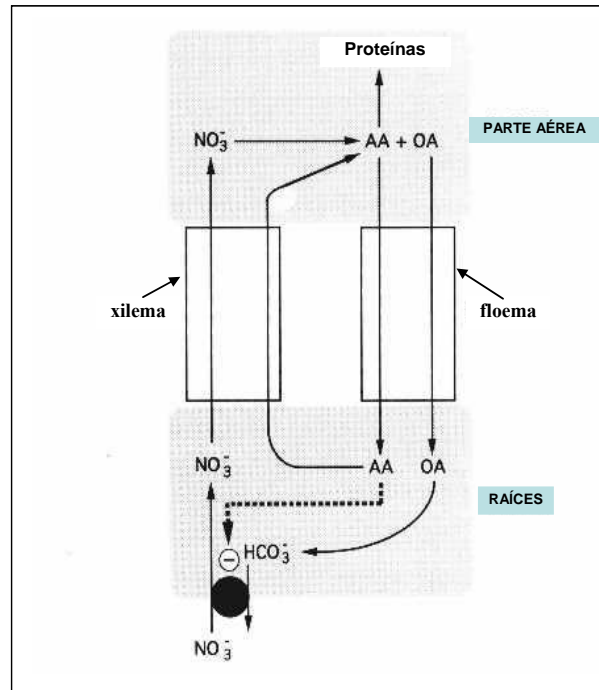


Figura 12. Regulación de la absorción de nitrato por la demanda de nitrógeno de la planta. Los productos de asimilación del nitrato, aminoácidos y ácidos carboxílicos, son transportados vía floemática desde la parte aérea a las raíces, inhibiendo o estimulando, respectivamente la absorción de nitrato (Touraine et al., 1992).

El control de la absorción de nitrato por los productos de exportación de la hoja, bien sean aminoácidos o ácidos orgánicos, podría *a priori* parecer contradictorio, al tratarse de señales con efectos opuestos. Sin embargo, ambos tipos de intermediarios metabólicos, en general, no son exportados paralelamente. Ello se pone de manifiesto en fases contrastadas del desarrollo fisiológico de los cereales, como el crecimiento vegetativo y durante el llenado del grano. En fases de desarrollo vegetativo, las tasas de reducción de nitrato y de síntesis de carboxilatos y aminoácidos son elevadas. Los aminoácidos en su gran mayoría serán empleados localmente para la síntesis de clorofila, Rubisco y proteínas de almacenamiento vegetativo, etc.; mientras que los carboxilatos serán exportados rápidamente hacia la raíz. De manera, que el sistema de transporte de nitrato dispondrá de un nivel alto de HCO_3^- y bajo de aminoácidos translocados a través del floema. Por el contrario, durante el llenado del grano, la reducción de nitrato en hojas y los niveles de

HCO₃⁻ en raíces serán disminuidos, mientras que la exportación de aminoácidos desde las hojas se verá incrementada notablemente, asociada a la movilización del N foliar. La mayoría del nitrógeno translocado desde las hojas contribuirá al llenado del grano, debido a una rápida velocidad cíclica del N en el circuito xilema-floema (Cooper & Clarkson, 1989). En definitiva, las tasas de absorción de nitrato deberían disminuir tanto por un menor transporte de ácidos orgánicos como por las mayores concentraciones de aminoácidos en el floema.

1.5.1.4. Asimilación de amonio

El amonio es la forma reducida de nitrógeno disponible para la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos (Nussaume et al., 1995). Éste es generado no sólo por reducción de nitrato sino también por la descarboxilación de glicina a serina, en la reacción catalizada por la glicina descarboxilasa mitocondrial, en el proceso fotorrespiratorio; así como por desaminación de aminoácidos y el catabolismo de ácidos nucleicos; procesos, éstos últimos, especialmente importantes durante la senescencia (Andrews et al., 2004). El amonio generado en los diferentes procesos metabólicos de la planta, ha de ser rápidamente asimilado en compuestos orgánicos con objeto de evitar problemas de toxicidad en la misma. La glutamina sintetasa (GS) es el enzima responsable del primer paso de la asimilación de amonio, y junto a la glutamato sintasa (GOGAT) forma un ciclo GS/GOGAT (Keys et al., 1978) (Figura 9) que produce tanto glutamina como glutamato, los precursores de todos los compuestos nitrogenados en plantas, pues actúan como donadores de nitrógeno para la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, clorofilas, poliaminas, alcaloides etc. (Lea & Ireland, 1999).

En la ruta GS/GOGAT, la glutamina sintetasa cataliza la conversión dependiente de ATP de glutamato y amonio en glutamina. La transferencia del grupo amino de la glutamina a un esqueleto carbonado, el 2-oxoglutarato (2-OG), es catalizada por la glutamato sintasa, bien la forma dependiente de NADH o de ferredoxina reducida, con objeto de reciclar una molécula de glutamato en la reacción acoplada a la GS/GOGAT (Masclaux et al., 2001). Parte del nitrógeno asimilado como glutamina puede ser empleado para la síntesis de aminoácidos y proteínas del propio tejido, o bien, ser transportado a otros órganos como glutamina, asparragina o ureidos. La glutamina y asparragina son los principales compuestos transportadores de nitrógeno en las plantas (Lam et al., 1998; Lea & Azevedo, 2007), mientras que los ureidos constituyen la forma predominante de transporte del N₂ fijado (Winkler et al., 1987). La asparragina es sintetizada a partir de

glutamina y aspartato por la enzima asparragina sintetasa, que cataliza también la formación de asparragina a partir de aspartato y amonio. La ruta GS/GOGAT es considerada la ruta principal de asimilación de amonio, aunque existen otras reacciones enzimáticas potencialmente capaces de asimilar amonio, como son las catalizadas por la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la asparragina sintetasa (Lam et al., 1996; Dubois et al., 2003). Este papel de la GDH ha sido objeto de intensa controversia, por ser un enzima que funciona en la dirección de desaminación y aminación de glutamato. Si bien parece ser que la función más aceptada del enzima es la de proporcionar esqueletos carbonados en condiciones de escasez de carbono y de energía (Mifflin & Habash, 2002), más que la de reasimilación del exceso de amonio liberado por hidrólisis proteica durante la germinación de la semilla y la senescencia.

De la GS se conocen dos isoformas, una de localización citosólica (GS1), en las células de raíces y tallo; y otra plastidial (GS2), presente en cloroplastos de tejidos fotosintéticos y plastidios de raíces y otros tejidos no fotosintéticos. Estudios con una amplia variedad de especies vegetales han mostrado que la GS1 es codificada por una familia multigénica compleja (en las que el número de genes varía entre 3 y 6, según especies), mientras que la GS2 es codificada por un único gen (Andrews et al., 2004). Aunque el enzima cataliza la misma reacción en todas las células, la fuente del amonio asimilado varía dependiendo del tejido y el estado de desarrollo de la planta (Masclaux et al., 2001) y se ha mostrado que ambas isoformas son diferencialmente reguladas, lo que es necesario para el desarrollo de papeles fisiológicos diversos (Lam et al., 1996). Así, en hojas con elevada capacidad fotosintética la GS2 es responsable del reciclado de amonio producido en la fotorrespiración y de la asimilación de amonio procedente de la reducción de nitrato. Y es posible que durante la maduración de la hoja y posterior senescencia, la GS1, desempeñe un papel esencial en la reasimilación eficiente del amonio liberado de reacciones catabólicas cuando la fotosíntesis disminuye y tiene lugar la removilización de nitrógeno (Habash et al., 2001).

En cuanto a la glutamato sintasa, en plantas superiores existen dos formas, una dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) (Sakakibara et al., 1992) y otra dependiente de NADH (NADH-GOGAT) (Peeters & Laere, 1992), como donadores de electrones. Ambas enzimas se localizan exclusivamente en cloroplastos o plastidios; en las hojas la Fd-GOGAT es la más abundante y se localiza en el cloroplasto de las células del mesófilo, mientras que la NADH-GOGAT predomina en tejidos no fotosintéticos (Lancien et al., 2002). Además, dos genes diferencialmente expresados en raíz y hojas codifican la Fd-

GOGAT, aunque en el caso de la NADH-GOGAT no está claro si uno o dos genes codifican dicho enzima (Lea & Mifflin, 2003). Existen evidencias en varias especies de cultivo que la raíz es el principal lugar de asimilación del amonio absorbido del suelo (Andrews et al., 2001) siendo posible que la GS1, GS2 y la NADH-GOGAT estén involucradas en la asimilación primaria de amonio en raíces (Tobin & Yamaya, 2001). Parece ser que las raíces poseen niveles elevados constitutivos de GS y NADH-GOGAT y ambas enzimas son inducidas con el suministro de amonio (Ishiyama et al., 2003). Finalmente, la asimilación de amonio genera protones que deberán ser excretados al medio externo o neutralizados para mantener el pH citoplasmático y existen evidencias de que el NH_4^+ absorbido del suelo, cuando su suministro es elevado, puede ser transportado a través del xilema al tallo (Schjoerring et al., 2002).

1.5.1.5. Síntesis de aminoácidos

La asimilación del nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos interacciona con el metabolismo de los ácidos orgánicos (Stitt & Krapp, 1999). Estos últimos se requieren como precursores para la síntesis de aminoácidos, en particular el 2-oxoglutarato que actúa como aceptor primario de grupos amino en la reacción catalizada por la GOGAT; junto a otros ácidos orgánicos, que sirven de punto de partida para la síntesis de diversos aminoácidos (Morcuende et al., 1998). Cambios en el metabolismo de los ácidos orgánicos son también importantes para la regulación del pH celular; ya que durante la conversión del nitrato en amonio se consumen protones (Raven, 1988). Y mientras que en organismos unicelulares la alcalinización resultante puede ser contrarrestada por intercambio protónico con el medio circundante; en hojas, el área circundante a las paredes celulares dispone de una escasa capacidad de tamponación, que hace necesaria la síntesis de aniones para contrarrestar la carga, como es el malato, que es exportado a través del floema a la raíz donde es descarboxilado (Martinoia & Rentsch, 1994).

Son varios los mecanismos que facilitan la formación de ácidos orgánicos durante la asimilación de nitrógeno. Por una parte, el nitrato induce la fosfoenolpiruvato carboxilasa, piruvato quinasa citosólica (PK), citrato sintasa (CS) y la NADP-isocitrato deshidrogenasa y reprime la subunidad regulatoria de la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima clave en la ruta de síntesis de almidón (Scheible et al., 1997a); promoviendo una reprogramación del metabolismo que permite la síntesis de 2-OG y malato durante la asimilación del nitrato (Stitt & Krapp, 1999). Y por otra, cambios en las concentraciones de ciertos efectores metabólicos y fosforilación de la PEPCasa permiten su regulación cuando el nitrato y el

amonio están siendo asimilados (Rivoal et al., 1997). Así mismo, la asimilación de nitrato y el metabolismo de los ácidos orgánicos responden a cambios en el pH celular, de manera que la alcalinización conduce a la inhibición post-traducciona de la NR (Botrel & Kaiser, 1997) y activa la PEPCasa disminuyendo su sensibilidad a la retroinhibición por malato (Chollet et al., 1996).

En definitiva, la asimilación del nitrógeno origina un flujo de carbono desde los carbohidratos hasta los aminoácidos; pues la síntesis neta de una molécula de glutamina o asparragina requiere la reducción y asimilación de dos moléculas de nitrato y el aporte de una molécula de 2-oxoglutarato o de oxalacetato, respectivamente, como esqueletos carbonados, los cuales provienen del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Mientras que en la luz, los azúcares sintetizados en el ciclo reductivo de las pentosas fosfato constituyen la fuente última de esqueletos carbonados para sustentar la síntesis de aminoácidos (Vanlerberghe et al., 1992; Huppe et al., 1992); en su ausencia, el almidón o la sacarosa suministran dicho carbono (Krömer et al., 1988; Krömer & Heldt, 1991; Krömer, 1995). Por ello, en tejidos fotosintéticos, el carbono asimilado es derivado hacia la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos; y el flujo del carbono orgánico, hacia una u otra vía, dependerá de la regulación de enzimas clave implicadas en dichas rutas biosintéticas en respuesta a la luz y la disponibilidad de carbono y nitrógeno.

Los aminoácidos (Figura 13) generalmente se dividen en mayoritarios y minoritarios; se requieren para la biosíntesis de proteínas y son generados a través de rutas biosintéticas ramificadas, a partir de un número relativamente pequeño de metabolitos precursores. Los aminoácidos mayoritarios incluyen, glutamina (Gln), glutamato (Glu), aspartato (Asp), alanina (Ala), glicina (Gly), serina (Ser) y asparragina (Asn), los cuales se sintetizan a partir de intermediarios del metabolismo primario del carbono. La Gln y Glu son sintetizados directamente durante la asimilación de nitrato o amonio, actuando el 2-oxoglutarato como aceptor primario del carbono. El Asp y la Ala se sintetizan por transferencia de grupos amino desde el glutamato al oxalacetato y piruvato. En la fotorrespiración, los grupos amino se transfieren al glioxilato para producir Gly, y consecuentemente, Ser. La Asn es sintetizada desde el Asp en una transaminación dependiente de Gln (Fritz et al., 2006a). Los aminoácidos minoritarios, por su parte, son sintetizados en rutas más largas y complejas. Estas comienzan a partir de uno de los aminoácidos centrales, o a partir de un intermediario del metabolismo del carbono; siendo en casi todas ellas, los donadores de grupos amino el Glu o el Asp (Morcuende et al., 1998). Los aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) se

sintetizan a partir de la eritrosa-4-fosfato y PEP a través de la ruta del ácido siquímico. La leucina (Leu) y valina (Val), aminoácidos de cadena ramificada, son generados a partir del piruvato; y la arginina (Arg) a partir del Glu a través de la ornitina y, posteriormente, citrulina. La síntesis de prolina tiene también lugar a partir del Glu por una ruta separada. El Asp es el punto de partida para la síntesis de la treonina (Thr), isoleucina (Ile) y lisina (Lys) mediante una ruta ramificada, en la cual se forman la Lys y Thr, y a partir de ésta última, puede generarse la Ile (Ireland, 1997).

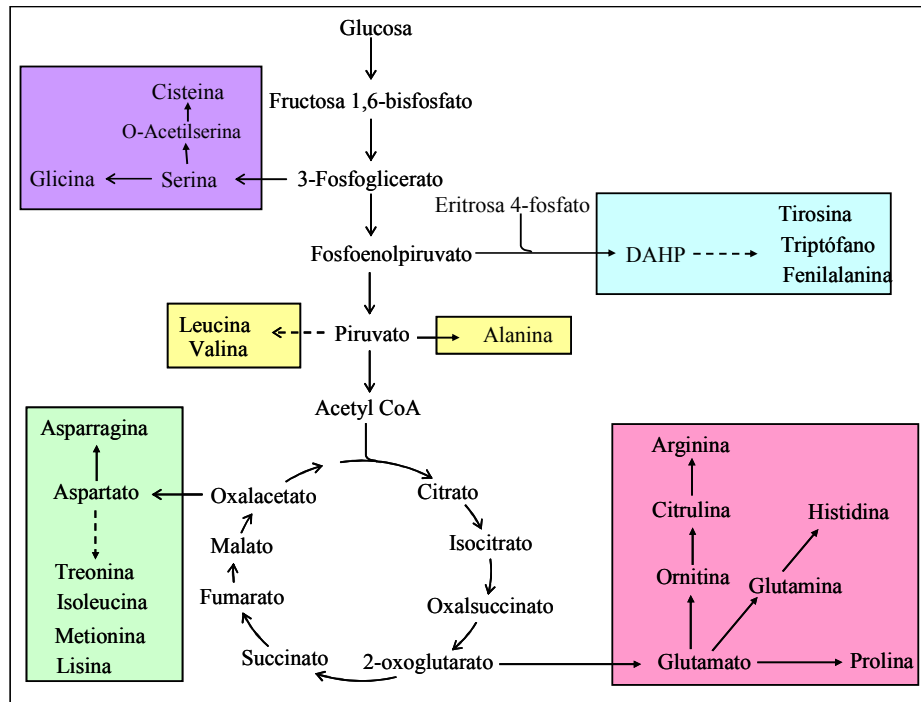


Figura 13. Perspectiva general de las rutas biosintéticas de aminoácidos (Coruzzi & Last, 2000).

La metionina (Met) junto con la cisteína constituyen los aminoácidos azufrados. Mientras que el aspartato es el precursor necesario para la síntesis de Met, que requiere también la incorporación de cisteína; la síntesis de éste último aminoácido requiere como precursor un intermediario de las rutas de asimilación del carbono y nitrógeno, la O-acetilserina, que junto con el sulfuro resultante de la reducción del sulfato incorporado por la planta del suelo permite la síntesis de cisteína (Koprivova et al., 2000). Finalmente, la Gln es el punto de partida para la síntesis de His, que también proporciona los grupos aminos para la formación de carbamoyl-P, que es necesario en la síntesis de Arg y nucleótidos. Los aminoácidos minoritarios están generalmente presentes en menores niveles que los aminoácidos mayoritarios, aunque existen excepciones. Ya que la Thr a menudo se encuentra en niveles relativamente elevados; mientras que los aminoácidos mayoritarios específicos pueden disminuir sus niveles en determinadas condiciones (Fritz, 2006a).

1.6. Interacción del metabolismo del carbono y nitrógeno

En plantas superiores existen evidencias de que el metabolismo del carbono y nitrógeno son procesos fisiológicos estrechamente relacionados (Figura 14). Ambas rutas metabólicas están altamente coordinadas y la regulación de sus interacciones involucra pasos de control recíproco que permitirán la optimización de los recursos de la planta (Foyer et al., 1994a).

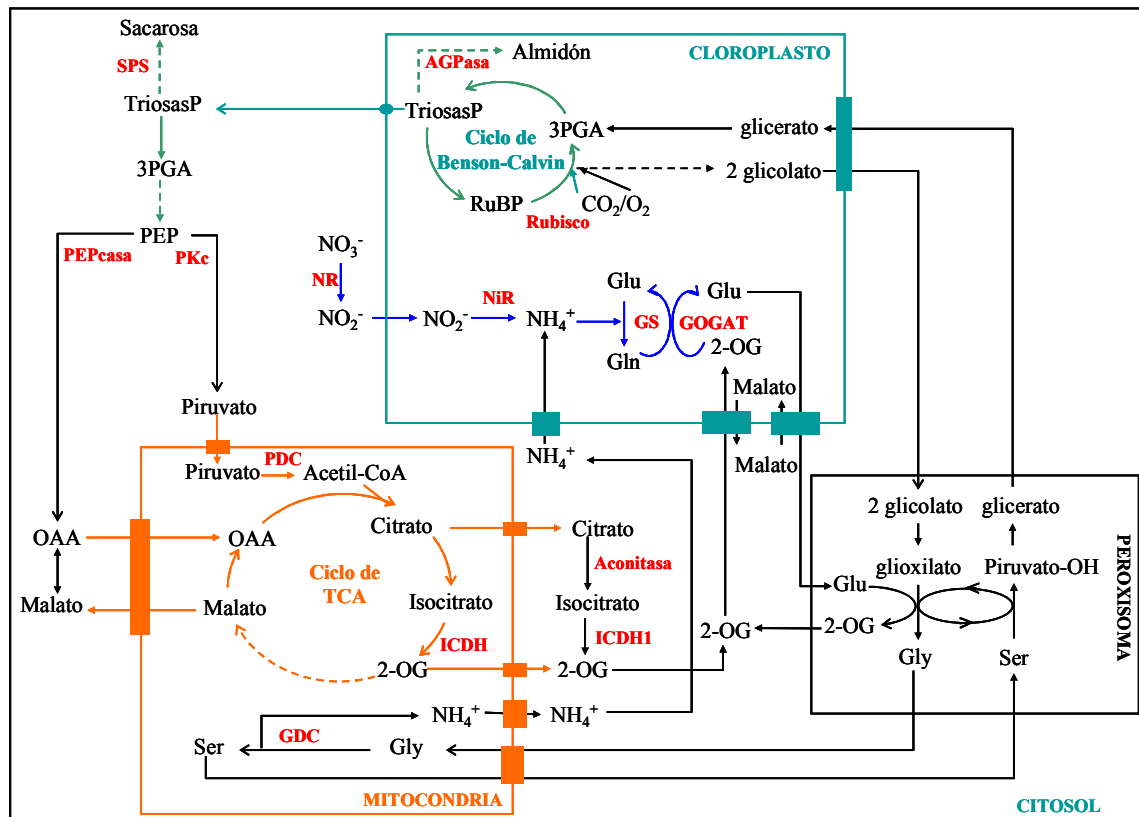


Figura 14. Esquema simplificado de la interacción del metabolismo del C y N. Se muestra la coordinación de las rutas metabólicas implicadas -ciclo de Calvin, glicólisis, fotorrespiración y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)-, que tienen lugar en diferentes compartimentos celulares (modificado de Lancien et al., 2000 y Foyer et al., 2009).

La fotosíntesis o el catabolismo de carbohidratos en tejidos no fotosintéticos, proporcionan esqueletos carbonados, equivalentes de reducción y ATP requeridos para la asimilación del nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos (Stitt & Krapp, 1999; Coruzzi & Zhou, 2001; Foyer et al., 2003). Estos compuestos nitrogenados son necesarios para que el carbono sea empleado en la síntesis de componentes celulares y estructurales requeridos para el crecimiento de la planta. Los aminoácidos desempeñan un papel importante en esta interacción entre los metabolismos de C y N (Lea & Forde, 1994), como se ha mencionado anteriormente (ver apartado 1.5.1.5). A menudo, los niveles de aminoácidos fluctúan en paralelo con los azúcares; de manera que la asimilación de nitrato

se inhibe y los niveles de aminoácidos disminuyen, cuando el carbono es limitante; como ocurre en circunstancias en las que el crecimiento se realiza en condiciones de baja intensidad luminosa, en un fotoperiodo corto, o en plantas con inhibición antisentido de la expresión del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco *-rbcS-* (Geiger et al., 1998; Matt et al., 1998). Además, una mayor velocidad de fotosíntesis, como ocurre en condiciones de CO₂ elevado, conduce a un aumento de los niveles de aminoácidos si el suministro de nitrógeno es adecuado; o bien, a un descenso de los mismos, cuando el suministro es limitado (Scheible et al., 1997b; Geiger et al., 1998; Matt et al., 2001a). El metabolismo de los aminoácidos está también estrechamente unido al recambio de proteínas. Los niveles de aminoácidos son bajos en plántulas de *Arabidopsis* deficientes en nitrógeno, en las que el aporte de nitrato conduce a un aumento de dichos metabolitos entre las 3-8 horas de la adición de dicho nutriente, niveles que disminuyen con posterioridad, al comenzar la síntesis proteica (Scheible et al., 2004). Sin embargo, en plántulas de *Arabidopsis* deficientes en carbohidratos, tuvo lugar una acumulación de aminoácidos presumiblemente resultado del catabolismo de proteínas (Thimm et al., 2004). Y la adición de azúcares a dichas plántulas, se acompañó de una disminución de aminoácidos consecuencia de la inducción de la síntesis proteica (Osuna et al., 2007).

Así mismo, el metabolismo fotosintético está sujeto a grandes cambios diurnos (Geiger & Servaites, 1994), siendo la alteración más obvia la que tiene lugar entre la fotosíntesis en la luz y la respiración en la oscuridad. La cual desencadena un ciclo de acumulación y movilización de almidón, que permite que el carbono asimilado sea almacenado temporalmente en la hoja para facilitar su exportación durante la noche, como sacarosa (Heineke et al., 1994). El balance de exportación y acumulación cambia, incluso durante el propio periodo luminoso; de manera que en etapas tempranas del periodo luminoso la actividad SPS es elevada (Stitt, 1996), y al final del fotoperiodo, la actividad SPS disminuye, a la vez que aumenta la velocidad de síntesis de almidón. Cambios diurnos análogos tienen lugar en el metabolismo del nitrógeno. La actividad NR es máxima en las primeras horas de luz, disminuye en la última parte del periodo luminoso, siendo baja o insignificante durante la noche (Galangau et al., 1988; Scheible et al., 1997b). Cambios en los niveles de nitrato y compuestos nitrogenados contribuyen también a la regulación diurna de la expresión de la NR, habiéndose mostrado que la expresión del enzima es inducida por nitrato (Cheng et al., 1992) y reprimida por glutamina o metabolitos generados en su metabolismo posterior (Vincentz et al., 1993; Hoff et al., 1994). De manera que los transcritos de la NR son máximos al final de la noche y disminuyen

drásticamente durante el periodo luminoso, mientras que la proteína alcanza un máximo en etapas tempranas del comienzo de la iluminación, disminuyendo a medida que avanza el periodo luminoso y durante la primera parte de la noche (Scheible et al., 1997b). Los cambios diurnos de transcritos coinciden con un descenso de nitrato y acumulación de glutamina durante la noche (Galangau et al., 1988; Scheible et al., 1997b); y son atenuados o abolidos en mutantes y transformantes con baja actividad NR (Vaucheret et al., 1990; Scheible et al., 1997b); demostrando que esta regulación diurna es dependiente de señales derivadas del nitrato y su posterior metabolismo. Durante transiciones luz-oscuridad, los cambios rápidos en la actividad NR se deben a la fosforilación de un residuo serina y posterior unión de una proteína inhibitoria 14-3-3 (Bachmann et al., 1996a; Moorhead et al., 1996). Esta inactivación post-traducciona es favorecida por niveles elevados de glutamina (Morcuende et al., 1998). La expresión de otros enzimas del metabolismo posterior del nitrato y amonio, caso de la nitrito reductasa, glutamina sintetasa -citosólica y plastidial- y la glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina es también inducida por nitrato (Scheible et al., 1997b). Estos cambios en la transcripción se acompañaron de los consiguientes aumentos de las actividades NR (Galangau et al., 1988; Lin et al., 1994), nitrito reductasa (Scheible et al., 1997a), glutamina sintetasa y Fd-GOGAT (Hayakawa et al., 1992).

La asimilación de nitrato es también regulada en respuesta a la disponibilidad de carbohidratos (Klein et al., 2000; Stitt et al., 2002). Son varias las líneas de evidencia que establecen que niveles bajos de azúcares conducen a la inactivación post-traducciona de la NR (Kaiser & Huber, 1994; Botrel & Kaiser, 1997; Morcuende et al., 1998); y que los carbohidratos directa o indirectamente afectan a la transcripción de la misma, ya que se ha observado que la expresión del enzima aumenta tanto en hojas cortadas incubadas con sacarosa (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993), como en aquellas en las que la inhibición del transporte del floema conduce a una acumulación de carbohidratos foliares (Krapp & Stitt, 1995); acompañándose de un aumento de actividad del enzima. Por el contrario, los transcritos de la NR desaparecen cuando los niveles foliares de carbohidratos descienden por debajo de un nivel umbral (Klein et al., 2000), superando las propias señales derivadas del nitrato o su metabolismo posterior. Además, la asimilación de nitrato conduce a cambios marcados en el metabolismo del carbono, que incluyen un descenso de la síntesis de almidón (Fichtner & Schulze, 1992) y aumento de la síntesis de ácidos orgánicos (Foyer & Ferrario, 1994). La disminución de carbohidratos (Fichtner & Schulze, 1992) facilita que el carbono sea convertido vía glicólisis en PEP, que entra en el

metabolismo de los ácidos orgánicos (Foyer & Ferrario, 1994). Este metabolismo permite, por una parte, la síntesis de malato, mediada por la PEPCasa junto a la malato deshidrogenasa, que permitirá contrarrestar la carga, previniendo la alcalinización durante la asimilación de nitrato (Martinoia & Rentsch, 1994); y por otra, la síntesis de 2-oxoglutarato y otros ácidos orgánicos, que actúan como aceptores de carbono durante la asimilación de amonio y síntesis de aminoácidos (Stitt & Krapp, 1999). Estos cambios derivan de la inducción por nitrato de la expresión de los genes que codifican la PEP carboxilasa, piruvato quinasa citosólica, citrato sintasa e isocitrato deshidrogenada citosólica dependiente de NADP (ICDH1-NADP) (Scheible et al., 2000). El nitrato, a su vez, disminuye la expresión del gen que codifica la subunidad regulatoria de la AGPasa (Scheible et al., 1997a). Esta reprogramación de la expresión génica conduce a un aumento de actividad PEPCasa, acumulación de 2-OG, malato, y otros ácidos orgánicos (ver apartado 1.6). Además, la fosforilación de la proteína permite la regulación coordinada de la PEPCasa (Duff & Chollet, 1995; Li et al., 1996) y la SPS (Champigny et al., 1992; Mahn et al., 1993) después de la adición de nitrato o amonio. De manera, que la estimulación del flujo del carbono a la síntesis de ácidos orgánicos, provoca un descenso de los niveles de PEP y 3PGA, que se acompaña posteriormente de una inhibición de la síntesis de almidón, consecuencia de una alteración en la regulación alostérica de la AGPasa (Scheible et al., 1997a, Stitt et al., 2002). Estos cambios de transcritos y niveles de intermediarios metabólicos se han observado en mutantes de tabaco con baja actividad NR, cuyos niveles de nitrato fueron similares a los de las plantas de tipo silvestre (Scheible et al., 2000). En hojas de tabaco incubadas con sacarosa únicamente, o bien sacarosa junto con nitrato, ó sacarosa junto con glutamina, tuvo lugar una activación coordinada de las asimilaciones de nitrato y amonio, de la biosíntesis de aminoácidos y la síntesis de 2-OG. La sacarosa actuó aditivamente junto al nitrato, y antagónicamente al efecto de la glutamina, para aumentar la actividad NR y la asimilación de nitrato; y complementó la acción del nitrato y la glutamina para aumentar el flujo del nitrógeno desde el amonio hacia la síntesis de aminoácidos y el flujo del carbono hacia la síntesis de ácidos orgánicos (Morcuende et al., 1998). Finalmente, la observación de que plantas transformadas de tabaco con baja actividad Rubisco, muestren niveles bajos de carbohidratos y una baja actividad NR, que se acompaña de una mayor acumulación de nitrato y unos menores niveles de aminoácidos que los controles no transformados (Stitt & Schulze, 1994) proporciona evidencias de que la asimilación de nitrato disminuye cuando los carbohidratos son bajos.

1.7. Efectos del cambio climático sobre las plantas

Las previsiones climatológicas señalan un aumento de la concentración de CO₂ atmosférico junto a una elevación de la temperatura de la superficie terrestre (Albritton et al., 2001). Por lo que la evaluación de los efectos del cambio climático en las plantas requerirá considerar conjuntamente tanto la elevación de los niveles atmosféricos de CO₂ como de la temperatura, debido a que pueden existir interacciones entre ambos factores ambientales que podrían afectar a la productividad de los cultivos (Morison & Lawlor, 1999).

El incremento en los niveles de CO₂ genera una incertidumbre crítica sobre la absorción de carbono por los ecosistemas terrestres y la producción de alimentos. Es, por tanto, importante considerar el impacto potencial del CO₂ sobre la fotosíntesis en las plantas superiores terrestres C₃ (Curtis & Wang, 1998; Stitt & Krapp, 1999; Ainsworth et al., 2002; Long et al., 2004). La fijación fotosintética del carbono es el proceso clave por el cual las plantas sienten y responden a los cambios en los niveles atmosféricos de CO₂. Aunque existen varios procesos metabólicos que utilizan y/o responden al CO₂, la respuesta primaria a una [CO₂] de relevancia (240-1000 μmol·mol⁻¹) tiene lugar en la Rubisco y en la apertura estomática (Long et al., 2004). A corto plazo, en las plantas C₃, el aumento en los niveles de CO₂ conduce a un incremento de la **tasa fotosintética** (Drake et al., 1997; Norby et al., 1999; Nowak et al., 2004; Long et al., 2004; Ainsworth & Long 2005; Rogers et al., 2006a) y una reducción en la **apertura estomática** (Bunce, 2004; Leakey et al., 2006; Ainsworth & Rogers, 2007). El primero de los efectos indicados favorecería la estimulación de la fotosíntesis con la consiguiente producción de carbohidratos y ganancia en biomasa vegetal, que se traduciría en un aumento de productividad de los cultivos (Idso & Kimball, 1992; Gunderson et al., 1993; Teskey, 1995; Drake et al., 1997; Stitt & Krapp, 1999; Norby et al., 1999; Long et al., 2004; Nowak et al., 2004; Ainsworth & Long, 2005). La concentración actual de CO₂ no es suficiente para saturar la Rubisco (Woodrow & Berry, 1988), y en ausencia de otros factores limitantes, como la disponibilidad hídrica o de nutrientes, la fotosíntesis se vería aumentada. La eficiencia de la carboxilación por la Rubisco aumentaría con respecto a la oxigenación dando como resultado una reducción de la fotorrespiración (Stitt, 1991). El segundo de los efectos mencionados conduciría a un cierre de los estomas, que inicialmente se traduciría en una menor conductancia estomática que mejoraría la eficiencia en el uso del agua en la planta por reducción de la transpiración (Wall et al.,

1994, 2000; Roumet et al., 2000; Tognetti et al., 2000; Ainsworth & Long, 2005). A pesar del cierre parcial de los estomas al aumentar los niveles de CO₂, la limitación que éstos imponen sobre la fotosíntesis parece disminuir en CO₂ elevado (Long et al., 2004).

Como se ha comentado, un incremento de los niveles de CO₂ estimularía la fotosíntesis en plantas C₃, sin embargo, al aumentar el periodo de exposición al CO₂, la estimulación inicial, es a menudo parcial o totalmente revertida (Nie et al., 1995a; Drake et al., 1997; Stitt & Krapp, 1999), conduciendo a un fenómeno conocido como “**aclimatación fotosintética**” (Sage et al., 1989; Stitt, 1991) que involucra un descenso en la capacidad de asimilación del CO₂ (Stitt & Krapp, 1999; Martínez-Carrasco et al., 2005). Este fenómeno se acompaña de alteraciones en las características de intercambio gaseoso que son indicativas de una disminución en la capacidad de carboxilación (Makino et al., 1997; Rogers & Humphries, 2000; Oren et al., 2001; Ainsworth et al., 2004) y una reducción en la actividad y cantidad de proteína Rubisco (Sicher & Kremer, 1994; Nie et al., 1995b; Sicher & Bunce, 1997; Vu et al., 1997; Stitt & Krapp, 1999; Long et al., 2004; Pérez et al., 2005; Martínez-Carrasco et al., 2005), y en los transcritos de proteínas fotosintéticas, tales como Rubisco, proteínas unidas a clorofila y Rubisco activasa (Van Oosten et al., 1994; Van Oosten & Bedford, 1995; Nie et al., 1995a; Cheng et al., 1998; Moore et al., 1998).

La aclimatación de la fotosíntesis a [CO₂] elevadas posee un grado de respuesta muy variable y parece depender de varios factores, como la especie vegetal (Bazzaz & McConnaughay, 1992; Baker & Allen, 1993; Poorter, 1993), el estado de desarrollo de la planta (Besford et al., 1990; Kelly et al., 1991; Coleman et al., 1993), la duración de la exposición al CO₂ (Sionit & Kramer, 1986), la concentración de CO₂ aplicada (Allen et al., 1990), la temperatura (Baker et al., 1993), la disponibilidad de agua (Chaudhuri et al., 1990) y nutrientes (Roberntz & Linder, 1999) o, más en general, de la capacidad de los sumideros de fotoasimilados (Herold, 1980; Stitt, 1991; Arp, 1991; Miller et al., 1997; Moore et al., 1999).

Son varias las **hipótesis** propuestas para explicar el mencionado fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado. Una de ellas asocia este fenómeno a la represión de la Rubisco y de otras proteínas necesarias en la fotosíntesis mediada por la **acumulación de carbohidratos** (Van Oosten et al., 1994; Jang & Sheen, 1994; Nie et al., 1995a; Van Oosten & Besford, 1996; Sheen, 1990; Moore et al., 1998,1999). Una disminución de la expresión de genes fotosintéticos ha sido observada al acumularse azúcares en las hojas, bien por inhibición de la descarga

floemática en plantas transgénicas (Stitt, 1991; Krapp et al., 1993; Riesmeier et al., 1994; Lerchl et al., 1995; Geingerberger et al., 1996), enfriamiento del pecíolo (Krapp & Stitt, 1995), o incubación con azúcares (Krapp et al., 1991; Paul & Stitt, 1993; Van Oosten & Besford, 1995; Nielsen et al., 1998), similitudes que afianzan dicha hipótesis. La acumulación de carbohidratos, especialmente en forma de sacarosa y almidón, actuaría como un mecanismo de retroinhibición sobre la asimilación fotosintética (Stitt, 1991; Long et al., 2004), que afectaría al metabolismo del carbono y a la expresión de genes fotosintéticos a nivel foliar. Se ha propuesto un modelo que implicaría un sistema de sensibilización por la hexoquinasa (Moore et al., 1998; Jang et al., 1997; Long et al., 2004), aunque probablemente no sea la única justificación de la aclimatación fotosintética (Ainsworth et al., 2004).

Otra posible explicación a dicho fenómeno de aclimatación parece estar asociada a una **limitación en la disponibilidad de nitrógeno**, pues se han mostrado evidencias de que la aclimatación de la fotosíntesis a concentraciones elevadas de CO₂ suele ser más acusada en plantas crecidas con bajo aporte de nitrógeno que aquellas que reciben una adecuada fertilización nitrogenada (Wong, 1979; Oberbauer et al., 1986; Arp, 1991; Radoglou et al., 1992; Tissue et al., 1993; Petterson et al., 1993; Sage, 1994; Petterson & MacDonald, 1994; El-Kohen & Mousseau, 1994; Miglietta et al., 1996; Bowler & Press, 1996; Geiger et al., 1999; Pérez et al., 2005), sugiriendo que la disponibilidad de nitrógeno juega un papel importante en el mantenimiento de la capacidad fotosintética. La atenuación observada se ha asociado a menudo con la incapacidad de la planta para adquirir nitrógeno en la cantidad requerida, dado que una activación sostenida del crecimiento previsible a [CO₂] elevadas requerirá la adquisición de nitrógeno adicional en proporción al carbono extra fijado, lo que conduciría a una reducción en el contenido de nitrógeno foliar en plantas que crecen a [CO₂] elevadas (Conroy & Hocking, 1993; Tissue et al., 1993; Delgado et al., 1994; Fonseca et al., 1997; Ferrario-Mery et al., 1997; Geiger et al., 1999) y la consiguiente limitación de nitrógeno para la adquisición del carbono (Drake et al., 1997; Peterson et al., 1999; Luo et al., 2004). Ésto reflejaría un cambio en el balance carbono-nitrógeno de la planta derivado de una mayor velocidad de fijación de carbono, y se manifestaría por cambios de parámetros metabólicos indicativos de un agotamiento de nitrógeno (Geiger et al., 1999). Por ello, algunos autores han concluido que la disminución de la capacidad fotosintética en CO₂ elevado se debe a una reducción del contenido de nitrógeno y proteínas en las hojas, y más específicamente de la Rubisco, que representa del orden del 50% del nitrógeno foliar (Ellis, 1979; Evans & Seemann, 1989). Que podría ser

atribuido a un efecto de dilución del nitrógeno consecuencia de la aceleración del crecimiento en CO₂ elevado; habiéndose propuesto que el aporte de nitrógeno en proporción directa al crecimiento, evitaría el proceso de aclimatación de la fotosíntesis (Farage et al., 1998).

No obstante, junto a la limitación del nitrógeno agravada por el rápido crecimiento (Coleman et al., 1993; Farage et al., 1998; Stitt & Krapp, 1999; Bernacchi et al., 2007), se han indicado otros mecanismos diferentes para explicar la disminución en la disponibilidad de nitrógeno en plantas expuestas a [CO₂] elevadas (Taub & Wang, 2008), incluyendo el escaso suministro de nitrógeno a los órganos sumideros (Rogers et al., 1996; Long et al., 2004), una capacidad alterada en la absorción radicular (Berntson & Bazzaz, 1996; Pritchard & Rogers, 2000; BassiriRad et al., 2001; Lynch & St.Clair, 2004), aumento de la inmovilización del nitrógeno por microorganismos, o secuestro del mismo en la biomasa vegetal (Diaz et al., 1993; Zak et al., 2000; Hungate et al., 2003; Luo et al., 2004), incremento de la competencia por reductores que inhiben la asimilación de nitrato (Bloom et al., 2002; Shaw et al., 2002), o disminución en la absorción de nitrógeno por la reducción de la transpiración (Conroy & Hocking, 1993; Van Vuuren et al., 1997; McDonald et al., 2002; Del Pozo et al., 2007).

En definitiva, el descenso en la capacidad fotosintética a exposiciones prolongadas de CO₂ podría asociarse a diferentes causas, tales como, la señalización por carbohidratos, una interacción entre señalización por carbohidratos y nitrógeno, o un efecto indirecto debido a la limitación del nitrógeno.

No sólo el aumento de la concentración de CO₂ ejerce su influencia en el crecimiento vegetal sino también la **temperatura**, que afecta de manera significativa a la velocidad de los procesos fisiológicos, lo que repercutirá en última instancia en la productividad de los cultivos. La temperatura de crecimiento modifica el óptimo de temperatura para la asimilación de CO₂, respiración y el transporte electrónico fotosintético (Berry & Björkman, 1980; Bunce, 2000a,b; Yamasaki et al., 2002; Yamori et al., 2005), procesos cuya velocidad disminuye cuando las temperaturas aumentan por encima del óptimo térmico (Kobza & Edwards, 1987; Salvucci & Crafts-Brandner, 2004). Además, se sabe que la ontogenia de la planta y la morfogénesis son dependientes de la temperatura (Morison & Lawlor, 1999) y se han mostrado evidencias de que las temperaturas elevadas incrementan la velocidad de desarrollo ontogénico que conduce a un acortamiento del periodo de crecimiento (Mitchell et al., 1993).

En las plantas C_3 , el proceso fotosintético es modificado por la temperatura a través de su influencia sobre la capacidad de transporte electrónico de la membrana tilacoidal, cambios en las actividades enzimáticas del Ciclo de Calvin, junto con su acción sobre la cinética de la Rubisco y la eficiencia carboxilatoria (Berry & Björkman, 1980; Berry & Raison, 1981; Bunce 2000a,b; Yamasaki et al., 2002, Yamori et al., 2005). La Rubisco tiene una mayor velocidad de carboxilación a temperaturas elevadas, pero la oxigenación de la RuBP aumenta en relación a la carboxilación, debido a una reducción de la especificidad de la Rubisco por el CO_2 y a la disminución de la solubilidad del CO_2 con respecto al O_2 , dando como resultado una pérdida mayor de CO_2 por la fotorrespiración y una disminución en la eficiencia de la fijación de CO_2 a altas temperaturas (Hall & Keys, 1983; Jordan & Ögren, 1984; Brooks & Farquhar, 1985; Sage et al., 1995). Por lo tanto, hay una tasa óptima de la fotosíntesis que se consigue dentro de un rango dado de temperatura (Long, 1991).

Los aumentos en la temperatura y en la $[CO_2]$ atmosférica tendrían efectos opuestos sobre la fotosíntesis neta e interactuarían fuertemente (Sage & Sharkey, 1987; Long, 1991; Morison & Lawlor, 1999). El CO_2 elevado inhibe competitivamente la oxigenación y, en consecuencia, la fotorrespiración, mostrándose clave a la hora de aumentar la fotosíntesis neta con la temperatura. De esta forma, se observa un progresivo incremento de la fotosíntesis neta máxima (a saturación de luz) con la temperatura, conforme la concentración de CO_2 es aumentada (Long, 1991). Igualmente, el óptimo de temperatura para la fotosíntesis se ve incrementado con el aumento de la concentración de CO_2 , de lo que se deriva que el CO_2 , más allá de ser un factor que facilita la fotosíntesis, también modifica la respuesta a la temperatura (Long, 1991; Gifford, 1992) siendo el efecto estimulador del aumento de CO_2 sobre la actividad fotosintética neta mayor en condiciones de temperatura elevada (Lawlor & Keys, 1993). Otro factor que contribuiría a aumentar las tasas fotosintéticas en condiciones de CO_2 y temperatura elevadas sería el de la mayor demanda de fotoasimilados por los órganos sumideros conforme aumenta la temperatura (Farrar & Williams, 1991). En un rango de temperaturas no estresantes, el metabolismo de los órganos sumideros aumentaría con la temperatura (Farrar & Williams, 1991), y esto tendería a reducir la acumulación de carbohidratos en las hojas y la aclimatación de la fotosíntesis en condiciones de CO_2 elevado.

En general, existen evidencias de que tiene lugar una mayor estimulación del crecimiento y de la fotosíntesis a $[CO_2]$ elevadas a medida que aumenta la temperatura (Kimball, 1986; Rawson, 1992; Wolfe, 1994), aunque se han mostrado excepciones y

variaciones considerables en la respuesta (Mitchell et al., 1995; Delgado et al., 1994; Van Oijen et al., 1998; Batts et al., 1998; Burkart et al., 2000; Laurila, 2001; Assenga et al., 2004).

2. OBJETIVOS

Las plantas tienen que hacer frente a un ambiente cambiante y adaptar su metabolismo a dichos cambios. Tanto el CO₂ como la temperatura son factores clave que afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas, ambos han aumentado en los últimos años y es predecible que lo hagan en el futuro, pudiendo tener importantes consecuencias en la productividad agrícola.

Aunque son numerosas las investigaciones realizadas sobre el efecto del aumento del CO₂, resultan escasas aquellas que estiman su interacción con la temperatura elevada. Por lo que la evaluación de las implicaciones del cambio climático en la respuesta de las plantas requiere el reconocimiento de que las interacciones entre varios factores ambientales pueden causar efectos que no pueden predecirse en un análisis separado de los mismos, siendo recomendable su análisis conjunto. El empleo de cámaras de gradiente de temperatura y control del CO₂ del aire sobre cultivos de campo en este estudio ha permitido abordar estas interacciones en condiciones próximas a las naturales, facilitando el aumento de temperatura y nivel de CO₂, además de modificar el suministro de nitrógeno para el desarrollo de las plantas de trigo.

Se sabe que las plantas, en su respuesta al ambiente, deberán alterar el balance entre asimilación de carbono y otros nutrientes, especialmente nitrógeno, el almacenaje de estos compuestos y la redistribución de los mismos entre órganos dentro de la planta para permitir que el crecimiento y la producción se mantengan bajo las nuevas condiciones ambientales. Además, las investigaciones sobre la respuesta de las plantas al CO₂ elevado advierten de la importancia de la disponibilidad de nitrógeno, lo que nos insta a analizar el metabolismo del nitrógeno en paralelo con cambios en la fotosíntesis, metabolismo del carbono y crecimiento con objeto de distinguir entre efectos directos por un aumento del suministro de fotosintatos en condiciones de CO₂ elevado y efectos indirectos derivados de una limitación en nitrógeno. Por ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido:

Obtener una visión global de la integración de la asimilación fotosintética del carbono y nitrógeno en la hoja bandera del trigo en distintos estadios de desarrollo -emergencia de la espiga y días después de la anthesis-, por su implicación en el crecimiento del cultivo, en respuesta a los aumentos de CO₂ y temperatura del aire y a la disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

Con este objeto en plantas de trigo en el campo, y con el empleo de cámaras de gradiente de temperatura y control del CO₂ del aire, se ha analizado la respuesta de aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado en interacción con la temperatura y la

disponibilidad de nitrógeno. Con la finalidad de investigar (i) si el crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado comporta una pérdida de capacidad fotosintética.

(ii) Si el fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis se asocia a la represión de genes fotosintéticos mediada por la acumulación de carbohidratos foliares. Evaluándose con este objeto los cambios en la partición del carbono y los niveles de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco codificada en el núcleo.

(iii) La regulación de la actividad nitrato reductasa -enzima clave en la asimilación de nitrógeno- en respuesta a los factores ambientales, con objeto de vislumbrar si (a) la concentración de nitrato, que es un potente inductor de la expresión del enzima desempeña un papel importante en dicha regulación, (b) esclarecer si la glutamina o metabolitos relacionados con el aumento de la fotorrespiración a temperatura elevada conducen a una inhibición del enzima y (c) si la acumulación de carbohidratos, en especial sacarosa, podría aumentar la actividad del enzima en plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂, dado que los azúcares modulan la expresión, la actividad y el estado de activación de la NR.

(iv) Si la absorción de nitrógeno desde el suelo, o su distribución en la planta, es responsable del descenso de proteína total y proteína Rubisco en condiciones de CO₂ elevado. Estudio que se realizará a dos niveles diferentes: (a) a nivel celular, con el propósito de valorar los cambios en la distribución foliar del nitrógeno entre proteínas y otros compuestos nitrogenados, y (b) a nivel de planta entera, para evaluar los cambios en el reparto del nitrógeno entre los diferentes órganos.

Para alcanzar los objetivos concretos propuestos el estudio se ha realizado durante dos anualidades con plantas de trigo cultivadas en condiciones naturales en el campo, dentro de cámaras de gradiente de temperatura, con concentraciones de CO₂ y temperatura ambientales o elevadas, plantas que experimentan las fluctuaciones naturales diarias y estacionales de la temperatura y la intensidad luminosa; y en las que ha variado la disponibilidad de nutrientes en cada una de las anualidades. Para ello se ha analizado el intercambio gaseoso, los cambios en la actividad NR, los niveles de transcritos del gen *rbcS*, los niveles de carbohidratos, intermediarios fosforilados, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados en fases contrastadas del crecimiento de la planta y la hoja entre las que puede variar el efecto del CO₂.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En los secanos Mediterráneos, el trigo es uno de los cereales más ampliamente cultivado, siendo también uno de los cultivos agrícolas más importantes del mundo por contribuir sustancialmente a la nutrición humana como fuente de proteínas. Por ello, el trigo (*Triticum aestivum* L.) ha sido el material vegetal utilizado en la experimentación asociada al desarrollo de esta labor investigadora (para una descripción más detallada, ver apartado 1.2).

Los experimentos del presente trabajo de investigación fueron realizados con el cultivar Gazul (*Triticum aestivum* L., cv. Gazul), un trigo blando de primavera de ciclo corto, que posee aristas en la espiga, con una altura de la planta media y en el que el inicio del encañado es precoz; el espigado, entre precoz y muy precoz; y la madurez, de media a precoz. Su resistencia a enfermedades es media para el oidio y la septoria, alta a la roya parda y entre media-alta a la roya amarilla y encamado. La productividad de este cultivar es aceptable entre los trigos de primavera aunque la capacidad de ahijamiento oscila de media a baja, lo que obliga a incrementar la dosis de semilla. Su espiga posee alta fertilidad y una buena calidad del grano, incluyéndose entre los llamados trigos de fuerza por su elevada calidad harinera (Datos aportados por GENVCE- Grupo para la Evaluación de Nuevas Variedades de Cereales).

3.2. Condiciones de cultivo

Con objeto de evaluar el impacto del cambio climático global en la productividad del trigo, la experimentación se desarrolló en condiciones naturales lo más próximas posible a las propias de los cultivos de trigo en áreas Mediterráneas, caracterizadas por una escasa disponibilidad de agua, temperaturas cálidas e intensidades luminosas elevadas. Este estudio pudo ser abordado gracias al empleo de cámaras de gradiente de temperatura y control del CO₂ del aire (Rawson et al., 1995) que permitieron aumentar la temperatura y el nivel de CO₂ de crecimiento, además de modificar el suministro de nitrógeno para el desarrollo de las plantas, cámaras disponibles en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC) para su uso sobre los cultivos de trigo (Pérez et al., 2005). La utilización de dicha metodología permitió la investigación de aquellos factores que fluctúan de forma conjunta sobre los ecosistemas agrícolas en condiciones naturales, desde la perspectiva de que la interacción entre varios factores ambientales podría causar efectos que no podrían predecirse en un análisis separado de los mismos.

En una parcela de unos 2600 m² de la finca experimental de Muñovela, perteneciente al IRNASA localizada a 41°95'N, 5°5'W y 800m sobre el nivel del mar, durante dos anualidades -2004 y 2006-, se sembró el trigo de primavera (*Triticum aestivum* L. cv. Gazul) con las prácticas agrícolas habituales, en un suelo arenoso-arcilloso de pH alcalino (pH=7,7) con niveles de fósforo, potasio y calcio de 22, 140 y 280 ppm, respectivamente, a razón de 200 kg·ha⁻¹ y 13,6 cm de espaciado entre hileras el 29 de Enero del 2004 y 24 de Enero del 2006. Antes de la siembra, había sido aplicado un abonado de fondo con fertilizantes que contenían nitrógeno (NH₄NO₃), fósforo (P₂O₅) y potasio (K₂O) (32, 60 y 60 kg·ha⁻¹, respectivamente) en la anualidad del 2004; si bien en la anualidades del 2006 se evitó la adición previa de fertilizante nitrogenado al suelo, abonándose únicamente con fósforo y potasio en cantidad de 60 kg·ha⁻¹ cada uno. Con posterioridad se realizó una aplicación manual de fertilizante nitrogenado disuelto en agua (Ca(NO₃)₂·4H₂O), en cantidades abajo descritas, el día 21 de Abril del 2004 y 27 de Marzo del 2006. Los cultivos se regaron semanalmente con un sistema de goteo aportando cantidades de agua equivalentes a la precipitación media en la zona durante el periodo de experimentación (el cálculo se realizó con la media de los últimos 20 años, 198 mm, entre los meses de Febrero a Junio). Se aplicaron también insecticidas y herbicidas cuando las condiciones del cultivo lo requirieron.



Figura 1. Fotografía de la finca experimental de Muñovela (Salamanca) en una de las anualidades de la presente experimentación. Se muestra la disposición de las seis cámaras de gradiente de temperatura y control del CO₂ del aire sobre los cultivos de trigo.

Después de la emergencia de las plántulas, se montaron sobre el cultivo, en sitios diferentes cada año, seis cámaras de gradiente de temperatura y control del CO₂ del aire, el día 6 de Mayo en el 2004 y el 12 de Abril en el 2006. Las cámaras se colocaron en dos

hileras paralelas, con tres cámaras cada una y una separación entre las cámaras, tanto en sentido longitudinal como transversal, de unos 10 metros para evitar el sombreado entre ellas (Figura 1).

Tres de las cámaras se mantuvieron a la concentración de CO₂ ambiental (370 μmol·mol⁻¹) y las otras tres, al doble de dicha concentración (700 μmol·mol⁻¹) durante las horas de luz, ya que el enriquecimiento en CO₂ durante la noche podría considerarse irrelevante debido a la carencia de efectos directos del CO₂ en la respiración foliar en la oscuridad (Jahnke & Krewitt, 2002; Davey et al., 2004). Cada cámara, a su vez, estaba dividida en tres módulos, estableciéndose una diferencia de temperatura entre los módulos extremos que nos permitieron comparar temperaturas ambientales con temperaturas más elevadas según los pronósticos de cambio climático. Se establecieron dos niveles de suministro de nitrógeno añadiendo a cada una de las mitades longitudinales de cada módulo de las cámaras, y con una distribución al azar, los aportes de nitrato cálcico necesarios para conseguir cantidades totales de dicho nutriente de 140 y 32 kg·ha⁻¹ en 2004 y 140 y 15 kg·ha⁻¹ en 2006, en las fechas arriba indicadas. El seguimiento del cultivo se realizó desde la siembra hasta la madurez.

Este diseño experimental permitió investigar las combinaciones factoriales de dos niveles de CO₂ de crecimiento (370 y 700 μmol·mol⁻¹ de CO₂), dos temperaturas (ambiente y ambiente más 2 °C) y dos niveles de suministro de nitrógeno (deficiencia y abundancia en dicho nutriente).

3.3. Cámaras de gradiente de temperatura y control del CO₂ del aire

Las cámaras de gradiente de temperatura colocadas sobre el cultivo (Pérez et al., 2005), basadas en las descritas por Rawson et al. (1995), poseían unas dimensiones de 9 m de largo, 2,2 m de ancho y 1,7 m de altura en el centro. Cada una de las cámaras constaba de tres módulos (con una longitud de 3 m cada uno) separados por septos horizontales de policarbonato de unos 15 cm de ancho con una separación entre septos de unos 10 cm, los cuales generaban unas ranuras con la finalidad de reducir el mezclado de aire por convección (Figura 2). El armazón de cada cámara era de aluminio, con paredes transparentes de policarbonato que filtraban la radiación UV y prevenían del posible efecto que las ráfagas de aire pudieran tener en el gradiente de temperatura establecido en su interior; el techo, de película de polietileno, facilitaba la transmisión de la radiación tanto

la fotosintéticamente activa como la ultravioleta. Las cámaras se encontraban fijadas a tablones de madera, y éstos a su vez, anclados al suelo con picas metálicas.

Dos ventiladores de entrada (90 W , $0,5\text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) colocados en el módulo inicial y un ventilador de salida (140 W , $0,54\text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) situado en el techo del módulo final, permitían que el aire circulase continuamente en el interior de la cámara a la velocidad necesaria para mantener la diferencia de temperatura requerida entre los dos módulos extremos. La velocidad mínima de los ventiladores se fijó en un 40% de su velocidad máxima. Para mantener la diferencia de temperatura durante la noche y en aquellos momentos en los que la radiación solar por si misma era insuficiente, se colocaron tres calefactores pequeños ($250\text{-}500\text{ W}$) en el módulo final. En definitiva, el conjunto de ventiladores y calefactores mantuvieron el módulo inicial a temperatura similar a la del aire exterior y el módulo final a temperatura $2\text{ }^\circ\text{C}$ más elevada, dejándose el módulo central como un espaciador.

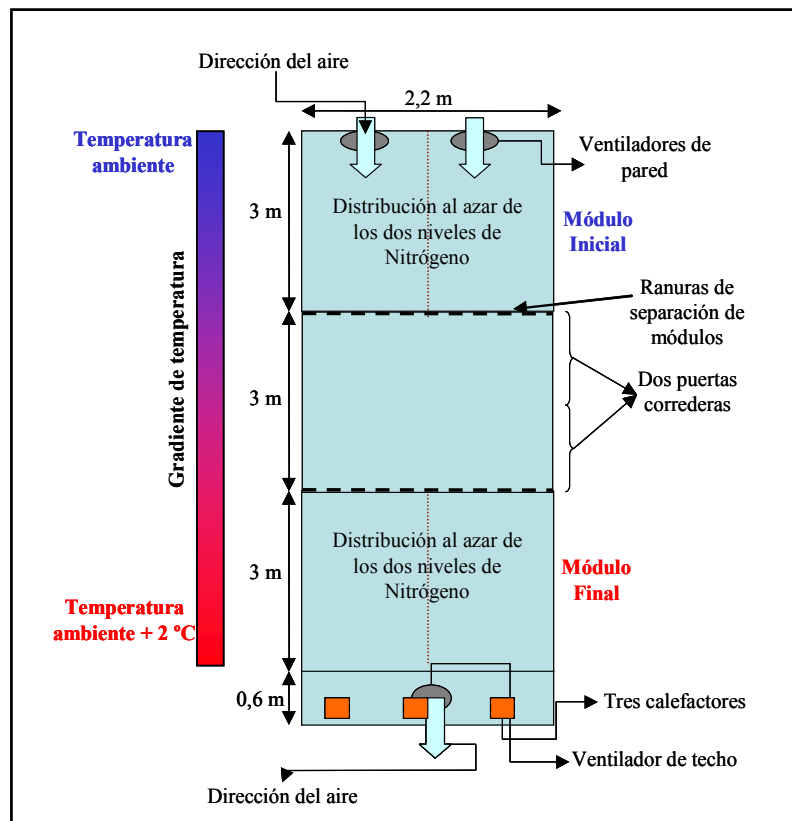


Figura 2. Esquema de una de las cámaras de gradiente de temperatura y control de CO_2 del aire utilizada en el experimento.

Para el mantenimiento de la temperatura y el control del funcionamiento de los ventiladores y calefactores, los termopares del diseño original propuesto por Rawson et al. (1995) fueron sustituidos por dos sondas Pt-100. Una de ellas, se colocó fuera de la cámara, cercana a los ventiladores de entrada para aproximar la temperatura del módulo

inicial lo máximo posible a la temperatura del exterior; mientras que la otra sonda se colocó en el centro del módulo final y un comparador de ambas sondas fue conectado a un controlador programable integrador diferencial derivador (PID) que regulaba la puesta en marcha y la velocidad de los ventiladores y calefactores situados en el interior de las cámaras.

Como se ha indicado en el apartado anterior, la mitad de las cámaras se mantuvieron con concentración ambiental de CO₂ y en la otra mitad, el CO₂ del aire se aumentó hasta 700 μmol·mol⁻¹ durante las horas de luz, inyectando CO₂ junto a los ventiladores del módulo de entrada, para facilitar que la mezcla lateral de CO₂ en las cámaras fuese completa. Para el control del CO₂ dentro de las cámaras se empleó un analizador de infrarrojos (IRGA) que medía continuamente el CO₂ en el módulo final de la cámara, medida que era enviada al controlador (PID) para abrir más o menos las electroválvulas que inyectaban CO₂ (en ciclos de 10 segundos el PID controlaba su apertura). Sensores de humedad y temperatura (HMD50, Vaisala, Helsinki, Finlandia) y una sonda de aire conectada a otro analizador de gases infrarrojo fueron colocados en el centro de cada módulo. Sensores de luz (LI-190SB, LI-COR, NE, USA) localizados en el interior de las cámaras y en el exterior, sobre el techo de las mismas, permitieron registrar la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR).

En la figura 3 se muestran los valores medios de temperatura y humedad en las cámaras comparadas con el aire exterior, así como las concentraciones de CO₂ en las cámaras, durante el muestreo de las hojas, entre los estadios de desarrollo de emergencia de la espiga y anthesis, en los dos años experimentales. Las temperaturas en las horas de luz en 2004 y 2006 fueron, respectivamente, 2,5 y 2,1 °C más altas en el módulo caliente de salida que en el fresco de entrada de las cámaras. Las diferencias de temperatura entre el módulo de entrada y el aire externo en las horas de luz fueron -0,6 y -1,5 en 2004 y 2006, respectivamente. La humedad del aire en las cámaras fue mayor en la noche y similar en el día para los módulos fríos que los cálidos de las cámaras. En 2006, la humedad del aire en las cámaras fue mayor que en el aire externo tanto durante las horas de luz como la noche.

El registro de todas las variables controladas se realizó automáticamente y de forma continuada en un ordenador mediante convertidores analógico-digitales (Microlink 751, Biodata Ltd, Manchester, UK) y el empleo del software Windmill con la herramienta de programación Test-Seq (Biodata Ltd). A su vez una de las subrutinas del mencionado software controlaba las electroválvulas que mantenían abierta o cerrada cada una de las dos

rampas disponibles en el sistema para el suministro de CO₂ a las cámaras de CO₂ elevado, cada una de las cuales constaba de siete botellas cuya presión se controlaba con un manómetro. Cuando la concentración de CO₂ descendía por debajo del nivel fijado, era indicativo de que la rampa con el grupo de botellas de CO₂ en uso se había agotado, cerrándose la válvula correspondiente; para abrirse, a continuación y de manera automática la correspondiente a la otra rampa con el restante grupo de botellas de CO₂ disponibles para insuflar el gas en las cámaras correspondientes.

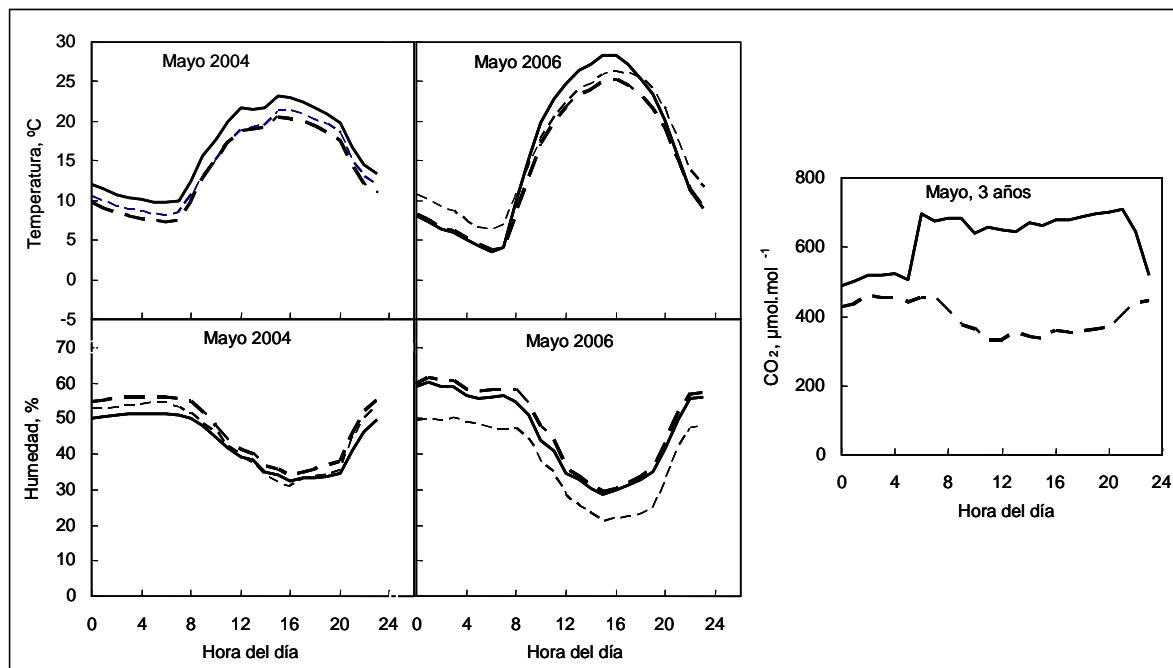


Figura 3. Valores promedio durante el mes de Mayo, a lo largo del día, de la temperatura, humedad y concentración de CO₂ en las cámaras de gradiente de temperatura, bien a temperatura ambiente (línea de trazado grueso discontinuo) o temperatura 2 °C más elevada (línea de trazado grueso continuo); y CO₂ ambiente (línea de trazado grueso discontinuo) o CO₂ elevado (línea de trazado grueso continuo). Las líneas de trazado fino discontinuo representan la temperatura o la humedad en el exterior de las cámaras.

El ordenador junto al IRGA, los controladores y demás equipamiento necesario para el funcionamiento de las cámaras de gradiente de temperatura se encontraban situados en el interior de una caseta metálica en la proximidad de las cámaras. Mientras que las rampas con las botellas de CO₂ se encontraban en otra caseta de dimensiones mayores, en la proximidad del cultivo.

3.4. Recogida y preparación de muestras foliares

En diferentes estadios del desarrollo de los cultivos de trigo -emergencia de la espiga y después de la anthesis-, al igual que se ha indicado previamente en la descripción de las medidas de intercambio gaseoso; se recogieron muestras foliares, correspondientes a la

última hoja completamente desarrollada -hoja bandera-, entre las 4-6 horas después de comenzar el periodo luminoso, momento de máxima fotosíntesis. A la emergencia de la espiga, las muestras foliares se recogieron el 26 de Mayo de 2004 y el 17 de Mayo en 2006. La segunda muestra se recogió unos días después de la antesis (dda) coincidiendo en las diferentes anualidades con las fechas siguientes: el 9 de Junio de 2004 (12 dda) y 30 de Mayo de 2006 (15 dda).

La recogida de muestras se realizó en las mismas condiciones de iluminación, nivel de CO₂ y temperatura empleadas durante el crecimiento de las plantas; hojas que fueron cortadas a la altura de la lígula, *in situ*, e inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido para inmovilizar el metabolismo, siendo transferidas con posterioridad a sobres de aluminio convenientemente etiquetados para su identificación posterior. Con objeto de disponer de material vegetal suficiente para la realización de los diferentes análisis, se cortaron cuatro hojas por tratamiento y se almacenaron juntas, recogándose a su vez una nueva submuestra por tratamiento, en cantidad y representatividad similares. Dicho material vegetal fue posteriormente trasladado desde el campo al laboratorio en nitrógeno líquido, y las muestras se conservaron en congeladores a -80 °C, hasta su uso en los diferentes análisis bioquímicos y moleculares asociados al desarrollo de este trabajo de investigación: valoración de actividades enzimáticas, análisis de intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno y estudios de expresión génica.

Esta recogida de muestras se realizó paralelamente a medidas de la asimilación fotosintética del carbono con un IRGA (CIRAS-2, PP systems, Hitchin, Herts., UK) y de fluorescencia de la clorofila con un fluorímetro modulado (PAM 2000), en la hoja bandera del trigo. También se llevaron a cabo estudios de crecimiento del cultivo en diferentes fases de desarrollo desde la emergencia de la espiga hasta la madurez. Con este objeto en cada uno de los tratamientos experimentales se contó el número de tallos en 0,5 metros de dos hileras adyacentes, cortándose a continuación 5 tallos de cada uno de los extremos opuestos de las dos hileras consideradas. Dichas plantas fueron introducidas en sacos convenientemente etiquetados y transportadas al laboratorio, donde se separaron las diferentes partes de la planta, la hoja bandera, resto de hojas, tallos (primer entrenudo y resto tallo), y en su caso, espiga y granos, determinándose el peso fresco, la superficie verde con un planímetro electrónico (Li-3000 A, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) y el peso seco -después de secar en estufa a 60 °C durante 48 horas-, con objeto no sólo de conseguir una estimación de la velocidad de crecimiento y desarrollo del cultivo sino también de la acumulación de biomasa.

Las muestras foliares de los diferentes tratamientos experimentales y estadios de desarrollo, recogidas y almacenadas como se ha indicado anteriormente, fueron maceradas y homogeneizadas en un mortero preenfriado en nitrógeno líquido. Alícuotas de pesos diferentes (indicadas en la descripción de cada uno de los métodos utilizados en este capítulo) se transfirieron con espátula congelada a eppendorfs de seguridad mantenidos en nitrógeno líquido que habían sido previamente tarados en una balanza de precisión (Precisa, XT 220 A). Una vez colocada la muestra vegetal macerada en su interior, se pesaron nuevamente, con objeto de obtener el peso fresco exacto utilizado para cada una de las extracciones realizadas. Lo cual permitió con posterioridad la conversión de los resultados obtenidos y su expresión en las unidades convenientes, considerando los gramos de peso fresco empleados en los diferentes análisis.

3.5. Extracción de metabolitos del carbono y nitrógeno

En las muestras foliares arriba indicadas se realizaron extracciones de los diferentes metabolitos, adoptándose métodos descritos en la bibliografía, con ligeras modificaciones, ajustándolos a las características del material vegetal empleado, a los recursos disponibles en el laboratorio y a los límites de detección del espectrofotómetro empleado.

3.5.1. Carbohidratos, aminoácidos y clorofila

Los carbohidratos solubles (glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos), aminoácidos y clorofila se extrajeron con etanol al 80% (v/v) y temperatura elevada (Stitt et al., 1978), método sencillo aunque tedioso, por requerir varias extracciones secuenciales. Con este fin, 150 mg del material vegetal macerado fueron transferidos a un eppendorf de seguridad, el cual se homogeneizó con 1 ml de etanol al 80% tamponado con HEPES-KOH 10 mM (pH=7,5) mediante agitación con un vortex (Heidolph); la muestra homogeneizada fue incubada en un bloque térmico (P Selecta) a 60 °C durante 30 minutos. Con posterioridad, se centrifugó a máxima velocidad en una centrífuga para eppendorfs (Heraeus, Biofuge pico) a 13000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se transfirió a un matraz de 10 ml que se mantuvo en oscuridad y a una temperatura de 4 °C, para evitar la degradación de las clorofilas por la luz durante las extracciones sucesivas. Este mismo proceso se repitió otras dos veces más, siendo los sobrenadantes de ambas extracciones transferidos al matraz que contenía el extracto inicial. El precipitado obtenido tras las tres extracciones etanólicas, fue homogeneizado nuevamente con 1 ml de HEPES-KOH 10 mM e incubado en bloque térmico a 80 °C durante 30 minutos, con objeto de extraer los fructanos de alto grado de

polimeración contenidos en la muestra. Tras la incubación del extracto, se centrifugó en las condiciones arriba indicadas, y el sobrenadante fue recogido y transferido junto a los extractos etanólicos contenidos en el matraz almacenado en la oscuridad. Dicho proceso se repitió secuencialmente, dos veces más, y los extractos unidos a los anteriores. La mezcla de extractos, etanólicos y acuosos, se llevó en el matraz a un volumen de 10 ml con etanol al 40% tamponado con Hepes-KOH 10 mM (pH=7,5); tras ser homogeneizada la mezcla, una alícuota de 200 μ l se recogió en un vial para la valoración del contenido de clorofilas en el extracto. El sobrenadante restante fue transferido a eppendorfs y almacenado a -20 °C hasta su empleo para la valoración de los carbohidratos solubles (glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos) y el contenido en aminoácidos. La fracción insoluble fue utilizada para el análisis de almidón.

3.5.2. Almidón

El almidón se analizó en el residuo insoluble obtenido de la extracción etanólica-acuosa del material vegetal, según el método propuesto por ap Rees et al. (1977). Residuo que fue homogenizado con 1 ml de agua y autoclavado durante 2 horas a 120 °C y 1,06 Kg·cm⁻² de presión en un autoclave (P Selecta Autester, 437-G), dejándose enfriar con posterioridad a temperatura ambiente. Una vez atemperado, se agitó y una alícuota de 200 μ l, recogida con punta de pipeta cortada, se transfirió a un nuevo vial que contenía 300 μ l de mezcla de digestión constituida por 75 U de amiloglucosidasa (Roche, 1202332) y 100 U de α -amilasa (Roche, 102814) en 25 ml de CH₃COONa 76 mM (pH=4,8); la mezcla fue homogeneizada e incubada a 37 °C en un bloque térmico (P Selecta) durante un mínimo de 16 horas. Finalmente, la glucosa procedente de la digestión del almidón fue valorada enzimáticamente, como se indica con posterioridad.

3.5.3. Intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos

La extracción de los diferentes intermediarios fosforilados [glucosa-6-fosfato (G6P), fructosa-6-fosfato (F6P), glucosa-1-fosfato (G1P), uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), adenosina trifosfato (ATP), 3-fosfoglicerato (3PGA)] y ácidos orgánicos [2-oxoglutarato (2-OG) y malato] presentes en el tejido foliar se realizó con ácido perclórico (Morrel & ap Rees, 1986), lo que permitió la inactivación de los enzimas y la precipitación de las proteínas del tejido vegetal, pudiéndose valorar en el sobrenadante de la extracción los diversos metabolitos.

Para la extracción, material vegetal congelado y almacenado a -80 °C fue macerado en un mortero enfriado en nitrógeno líquido y unos 100 mg de muestra fueron transferidos a

ependorfs de seguridad mantenidos en nitrógeno líquido. Añadiéndose al material macerado 400 μ l de HClO₄ 1,5 M con EGTA 5 mM, que fue homogeneizado por agitación y mantenido en hielo durante 30 minutos para facilitar la inactivación de los enzimas foliares y la precipitación de las proteínas. Después se centrifugó a máxima velocidad, 13000 rpm, en una centrífuga refrigerada para ependorfs (Heraeus, Biofuge Primo R) a 4 °C durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante sobre un nuevo vial. El precipitado de la extracción perclórica se lavó con 200 μ l de agua, se centrifugó en las mismas condiciones y el sobrenadante se recogió con pipeta y se añadió al extracto anterior, descartándose el precipitado de la extracción. Posteriormente, el extracto ácido se neutralizó por adición de KOH 5 M con trietanolamina (TEA) 1 M en cantidades variables que oscilaron entre 120-130 μ l dependiendo de la naturaleza y cantidad de muestra, comprobándose el pH con papel indicador (anotándose la cantidad exacta añadida para computarse en el volumen final de muestra en el proceso de transformación de los datos). El extracto neutralizado fue centrifugado en las condiciones indicadas con anterioridad, recogiendo el sobrenadante en un nuevo vial. El precipitado se lavó con 50 μ l de agua, que tras su centrifugación, fue recogido y añadido al sobrenadante anterior. Finalmente, el extracto perclórico obtenido fue homogeneizado y clarificado con carbón activo durante unos 5 minutos en hielo y centrifugado en las mismas condiciones; recogiendo en ependorf de seguridad que fueron congelados por inmersión en nitrógeno líquido. Siendo posteriormente almacenados a -80 °C, hasta su utilización en la valoración de los diferentes metabolitos.

3.5.4. Proteínas

Para la extracción de las proteínas totales, aproximadamente 50 mg de material vegetal congelado fueron macerados en un mortero enfriado en nitrógeno líquido y homogeneizado con 1 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 aminocaproico 5 mM, benzamidina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,14% (v/v) y PMSF 1mM (Morcuende et al., 2005). Una alícuota del homogeneizado (700 μ l) se usó para la precipitación de las proteínas con un volumen de acetona al 100% (700 μ l) que contenía β -mercaptoetanol 0,07% (v/v) y ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). Tras la incubación de la mezcla a -20 °C durante 2 horas, el extracto fue centrifugado a 20000 g durante 15 minutos a 4 °C para precipitar las proteínas, y el sobrenadante fue eliminado. El precipitado se lavó tres veces con 1 ml de acetona al 100% con β -mercaptoetanol 0,07% (v/v), tras su precipitación a -20 °C durante 30 minutos y posterior centrifugación en las condiciones anteriormente

indicadas, hasta que estuvo completamente blanco (libre de cualquier pigmento o contaminante). Los restos de acetona del precipitado se eliminaron por calentamiento en estufa a 40 °C durante 30 minutos. Las proteínas fueron solubilizadas con posterioridad en 500 µl de tampón formado por Tris-HCl (pH=8), sacarosa 100 mM, SDS 3,5% (p/v), EDTA 1 mM y β-mercaptoetanol 0,07% (v/v), por incubación a temperatura ambiente, y agitación durante 20 minutos, y posteriores incubaciones en bloques térmicos a 95 °C por un periodo de 5 minutos y a 70 °C durante 20 minutos en agitación continua. Tras el enfriamiento de las muestras, se centrifugaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en las mismas condiciones anteriormente indicadas, decantándose el sobrenadante a un nuevo vial, para la valoración en el mismo del contenido en proteínas totales. Las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta proceder a su valoración.

3.6. Valoración de metabolitos del carbono y nitrógeno

Los carbohidratos, aminoácidos totales, nitrato, clorofilas, proteínas totales y malato se analizaron en un espectrofotómetro UV/visible (Hewell-Packard, 8452A Diode Array). Los análisis se realizaron en cubetas de vidrio (Hellma, 6040, 1cm) o cuarzo (Hellma, 6040-UV, 10 mm) según la longitud de onda de medida necesaria en el análisis. Los intermediarios fosforilados y el 2-oxoglutarato, con niveles foliares notablemente inferiores a los anteriores, se valoraron en extractos perclóricos; empleándose un espectrofotómetro de doble longitud de onda Sigma ZFP 22 (Sigma Instruments, FRG) a 334 nm y 405 nm como longitudes de onda de medida y referencia, respectivamente (Figura 4). El aparato permitió la amplificación de la señal mediante un fotomultiplicador, facilitando la cuantificación de aquellos metabolitos con niveles foliares muy bajos. Los análisis se realizaron en un volumen total de 600 µl, utilizándose cubetas semi-micro 10x4 mm de poliestireno desechables (Sarstedt, 67.742, optical pathway 10 mm). El seguimiento de la reacción se realizó con un registrador o impresora acoplado al aparato.

La valoración de algunos intermediarios metabólicos -carbohidratos, intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos- se realizó mediante ensayos enzimáticos acoplados a la oxidación-reducción de piridin nucleótidos (Lowry & Passonneau, 1972). Las cantidades de extracto empleadas en los análisis de los diferentes metabolitos variaron en función del tratamiento, la anualidad y el estadio de desarrollo foliar de las plantas de trigo. Algunos de los enzimas empleados en los diferentes ensayos, se encontraban en suspensión en sulfato amónico 3,5 M por razones de estabilidad, siendo necesaria su eliminación con

anterioridad a la realización de los análisis enzimáticos. Con este objeto, fueron desprovistos de dicho compuesto por centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos, eliminándose el sobrenadante y siendo nuevamente resuspendidos en el tampón de análisis empleado en la valoración del metabolito en cuestión.

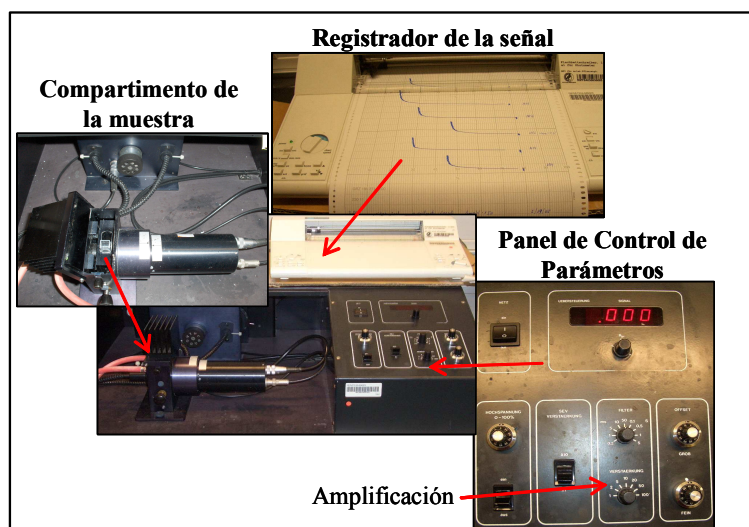


Figura 4. Espectrofotómetro de doble longitud de onda Sigma ZFP 22 (Sigma Instruments, FRG). Se muestran los distintos componentes externos, el compartimento para la colocación de la cubeta durante el análisis, el registrador de la señal, y el panel de control de los parámetros, entre los que se encuentra el amplificador de la señal.

El seguimiento de las reacciones enzimáticas tuvo lugar por observación de los cambios de absorbancia acontecidos en el transcurso de la reacción y hasta que se alcanzó la linealidad, indicativa del punto final de la misma. Dichos cambios se manifestaron bien con un incremento de absorbancia por reducción del NAD(P) a NAD(P)H, o con un descenso de absorbancia asociado a la oxidación del NAD(P)H a NAD(P). Los cambios de absorbancia registrados espectrofotométricamente en la valoración de los metabolitos pudieron ser fácilmente transformados a concentraciones, teniendo en consideración los coeficientes de extinción molar del NAD(P)H a la $\lambda=340$ nm (ϵ_M : $6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y $\lambda=334$ nm (ϵ_M : $6,18 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) dependiendo del espectrofotómetro empleado en los análisis. Lo que unido a la consideración de los gramos de peso fresco empleados en las diferentes extracciones y sus volúmenes totales, junto a la alícuota de los extractos empleados en los diferentes análisis nos permitió la expresión final de los resultados como se indica en cada apartado.

3.6.1. Carbohidratos solubles

Los carbohidratos se midieron espectrofotométricamente -con una longitud de onda de medida de 340 nm y referencia de 400 nm- mediante un análisis enzimático acoplado,

empleando hexoquinasa (HK) (Jones et al., 1977; Stitt et al., 1989). El sobrenadante obtenido por extracción etanólica-acuosa del material vegetal, almacenado a -20 °C como se indicó en el apartado 3.5.1, fue descongelado a 4 °C y homogeneizado, tomándose una alícuota de 500 µl en un nuevo vial que fue concentrada a sequedad con un concentrador a vacío (Telstar, Lioalfa 60) a 70 °C durante 1 hora y 45 minutos. La muestra concentrada fue resuspendida en 500 µl de agua y centrifugada a 13000 rpm durante 5 minutos, pudiéndose valorar en el extracto los carbohidratos solubles: glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos.

3.6.1.1. Glucosa y fructosa

La valoración de la glucosa y fructosa libres de la muestra, se realizó en una alícuota del extracto arriba indicado usando un método específico de análisis de glucosa comercial (test D-glucose, Boehringer Mannheim-R-biopharm, Roche, Cat. N° 10716251035) compuesto por tampón TEA 86 mM (pH=7,6), NADP 3 mM, ATP 10 mM y cantidades adecuadas de una sal divalente Mg₂SO₄. La adición de 1 U de HK al medio de reacción permitió la transformación de ambas hexosas -glucosa y fructosa- en sus hexosas fosfato -G6P y F6P- (Figura 5), por fosforilación en presencia de ATP, formándose ADP.

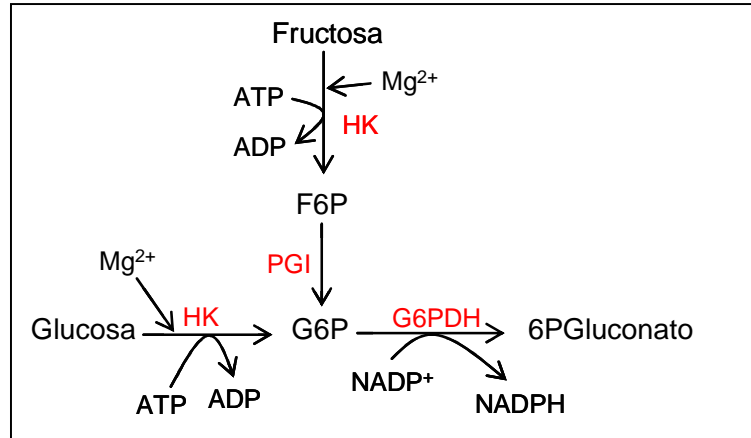


Figura 5. Secuencia de reacciones que tienen lugar en la valoración enzimática de la fructosa y glucosa en presencia de HK, G6PDH y PGI.

La incorporación de 0,5 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) permitió la oxidación de la G6P a gluconato-6-fosfato (6PGluconato), reduciéndose un equivalente de NADP, con la consiguiente formación de NADPH. El incremento de absorbancia asociado al NADPH fue proporcional a la cantidad de glucosa libre de la muestra. Pudiendo determinarse a continuación, la fructosa, por conversión de la F6P en su isómero G6P (Figura 5) en presencia de 2,5 U de fosfoglucoisomerasa (PGI) y transformación

posterior de dicho sustrato en 6Pgluconato por la G6PDH presente en el medio de reacción.

En la Figura 6 se muestran los cambios de absorbancia asociados a la reducción del NAD(P) a NAD(P)H durante la valoración enzimática de glucosa y fructosa, cuyo seguimiento se realizó en un espectrofotómetro (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array) en las condiciones indicadas en el apartado de valoración de metabolitos. Se añadieron inicialmente en cubeta todos los componentes del ensayo junto a una alícuota del extracto acuoso generado para la valoración de carbohidratos, que tras ser homogeneizados con una varilla, se colocó en el espectrofotómetro para proceder a la lectura de la absorbancia inicial de la muestra; que fue registrada durante varios minutos (línea base del gráfico mostrado en la Figura 6). A continuación, la adición de los enzimas HK y G6PDH permitió la transformación de la glucosa en 6Pgluconato, con el consiguiente incremento de absorbancia, cuyo seguimiento se realizó hasta alcanzarse la linealidad de la reacción, indicativa de la consecución del punto final de la misma (tramo final del primer incremento de absorbancia mostrado en la Figura 6). La diferencia de absorbancia entre el tramo final de dicha reacción y la absorbancia inicial de la muestra, se asoció a la glucosa libre de la muestra. La adición final del enzima PGI, permitió un incremento secuencial de absorbancia, cuyo seguimiento se realizó hasta alcanzarse la linealidad de la reacción (tramo final del segundo incremento de absorbancia mostrado en la Figura 6). La diferencia de absorbancia del punto final de la segunda reacción y el de la primera, se correspondió al incremento de absorbancia de la fructosa libre de la muestra.

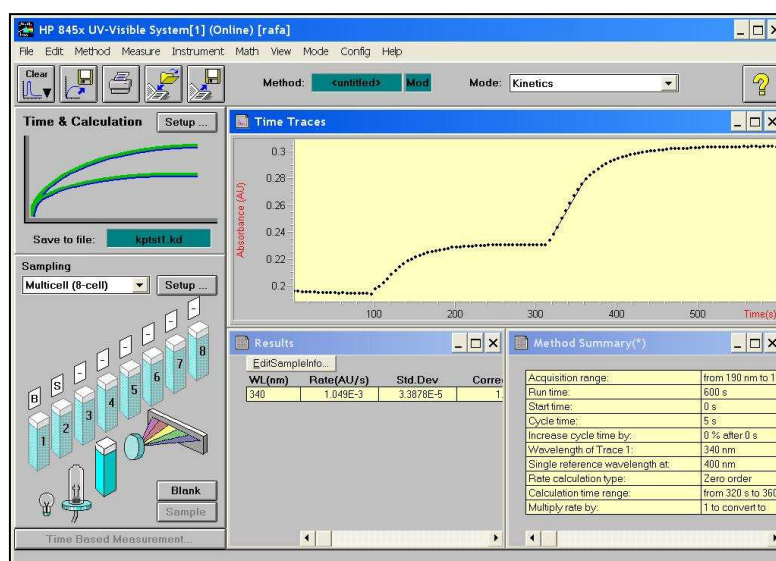


Figura 6. Seguimiento de la valoración enzimática de glucosa y fructosa en el espectrofotómetro de diodos. Se muestran los cambios de absorbancia, siendo el primer tramo asociado a la glucosa libre y el segundo a la fructosa libre presentes en la muestra.

Paralelamente a las valoraciones de las muestras frente al blanco de aire, se realizó otro análisis en cubeta con todos los componentes del ensayo, salvo que el volumen de extracto utilizado en el análisis de las hexosas de la muestra, fue sustituido por agua, lo que nos permitió conocer los incrementos de absorbancia asociados a la simple adición de los enzimas durante el ensayo. Éstos fueron convenientemente sustraídos a los incrementos de absorbancia correspondientes a la glucosa y la fructosa de la muestra, lo que permitió finalmente su conversión a concentración teniendo en consideración el coeficiente de extinción molar del NAD(P)H. Expresándose los resultados de cada uno de los dos azúcares valorados en micromoles por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$).

3.6.1.2. Sacarosa

Se sabe que la mayoría de las invertasas comerciales hidrolizan oligofructanos o fructanos de bajo peso molecular (Koroleva et al., 1998), por lo que para la valoración de la sacarosa por hidrólisis previa del disacárido en sus correspondientes monosacáridos, glucosa y fructosa, se utilizó un enzima específico –sacarasa (maltasa)-, que hidroliza de manera rápida y específica la sacarosa, y su actividad sobre la 1-cestosa y otros fructo-oligosacáridos es prácticamente inapreciable (McClearly, 1999).

Para la determinación de la sacarosa en las muestras foliares, se colocó en cubeta una alícuota del extracto acuoso generado para la valoración de carbohidratos junto a 8 U de sacarasa (maltasa) (Megazyme) en tampón maleato sódico 100 mM (pH=6,5); la mezcla se agitó, e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para facilitar la hidrólisis de la sacarosa. Con posterioridad se analizó enzimáticamente la glucosa y fructosa generadas, en el mismo medio de reacción empleado en la valoración de la glucosa y fructosa libres de la muestra, indicado en el apartado anterior.

A las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas en el análisis se les restó las concentraciones de glucosa y fructosa libres de la muestra, obteniéndose las concentraciones reales de glucosa y fructosa procedentes de la hidrólisis de sacarosa. Los resultados del contenido foliar de sacarosa se refirieron a la glucosa de este modo obtenida y se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

3.6.1.3. Fructanos

Los fructanos de las muestras se hidrolizaron con una mezcla de fructanasas altamente purificadas (Megazyme), obteniéndose glucosa y fructosa, las cuales se valoraron con posterioridad según el método habitual.

Para la hidrólisis de los fructanos, se añadieron en cubeta una alícuota del extracto acuoso generado para la valoración de carbohidratos solubles junto a 2 U de fructanasa en tampón acetato sódico (pH=4,5), mezcla que fue agitada e incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se valoró espectrofotométricamente la glucosa y fructosa mediante los análisis enzimáticos descritos con anterioridad en el correspondiente medio de reacción.

A las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas en el análisis se les restó las concentraciones de glucosa y fructosa libres de la muestra, y las de la glucosa y fructosa procedentes de la hidrólisis de sacarosa, obteniéndose las concentraciones reales de glucosa y fructosa procedentes de la hidrólisis de fructanos presentes en la muestra. Considerando que los fructanos son polímeros lineales o ramificados de fructosa, los resultados del contenido foliar de fructanos se refirieron a la fructosa obtenida de este modo, expresándose en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

3.6.2. Almidón

El almidón fue valorado como glucosa en el extracto procedente de la digestión en medio ácido en presencia de α -amilasa y amiloglucosidasa (ap Rees et al., 1977).

Con este objeto se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos el extracto procedente de la incubación a 37 °C durante al menos 16 horas con los enzimas responsables de la digestión del almidón; valorándose en el sobrenadante la glucosa generada, empleándose el medio de reacción indicado con anterioridad en presencia de HK y G6PDH. El incremento de absorbancia asociado a la glucosa fue proporcional a la cantidad de almidón presente en la muestra foliar. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

3.6.3. Intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos

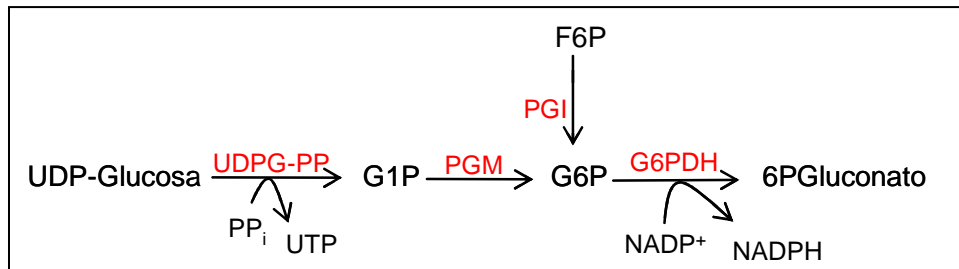
Dichos metabolitos se valoraron en alícuotas de los extractos perclóricos obtenidos a partir del material vegetal, teniendo en cuenta análisis enzimáticos específicos para cada uno de ellos (Stitt et al., 1984; Stitt et al., 1989).

3.6.3.1. Hexosas fosfato y uridina difosfato glucosa

Las hexosas fosfato: G6P, F6P y G1P se analizaron junto a la UDP-glucosa, en base a un método enzimático secuencial fundamentado en el propuesto por Stitt et al. (1984).

Para el análisis conjunto de las hexosas-P y la UDP-glucosa se transfirió una alícuota del extracto perclórico, obtenido para el análisis de los intermediarios metabólicos, a una cubeta junto a los siguientes componentes: Hepes-KOH 50 mM (pH=7,5), MgCl_2 5 mM y

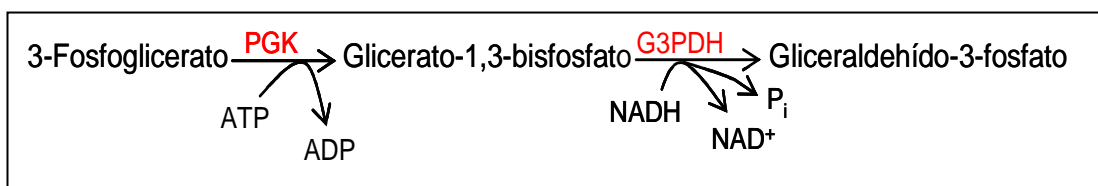
NADP 0,35 mM. La adición inicial de 0,7 U de G6PDH (Roche, 127655) permitió la oxidación de la G6P en 6Pgluconato y la incorporación de 0,8 U de PGM (Roche, 108375) facilitó la conversión de la G1P en G6P y su posterior conversión en 6Pgluconato en presencia de la G6PDH; siendo la F6P valorada a continuación por incorporación de 1,4 U de PGI (Roche, 128139) transformándose en su isómero G6P y ésta en 6Pgluconato por la G6PDH.



Finalmente, la UDP-glucosa presente en el extracto foliar fue valorada al añadir $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,35 mM junto a 0,8 U de uridina-difosfato pirofosforilasa (UDPG-PP) (Sigma, U8501) transformándose en G1P, que continuó la secuencia de conversiones hasta el 6Pgluconato por la presencia de los enzimas correspondientes en el medio de reacción. Los cálculos finales permitieron expresar las concentraciones de G6P, F6P, G1P y UDP-glucosa en $\text{nmol} \cdot \text{g PF}^{-1}$.

3.6.3.2. 3-Fosfoglicerato

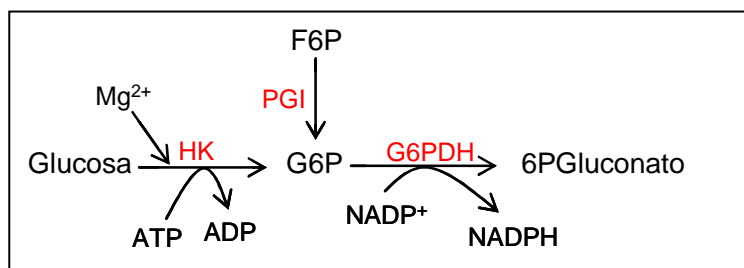
El 3PGA se determinó según el método indicado por Stitt et al. (1989), conforme a la siguiente secuencia de reacciones:



Este metabolito se valoró en una alícuota del extracto perclórico utilizando un medio cuya composición fue: Hepes-KOH 50 mM (pH= 7,5), MgCl_2 5 mM, ATP 1 mM y NADH 50 μM . La incorporación de 7 U del enzima 3-fosfoglicerato quinasa (PGK; Sigma, P7634) facilitó la fosforilación del 3PGA formándose glicerato-1,3-bisfosfato, el cual fue posteriormente reducido a gliceraldehído-3-fosfato por la adición de 7 U de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Roche, 10568620). La concentración final del 3-PGA se expresó como $\mu\text{mol} \cdot \text{g PF}^{-1} \cdot 10^{-1}$.

3.6.3.3. Adenosina trifosfato

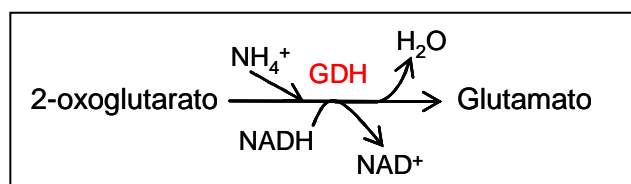
La valoración del ATP se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Stitt et al. (1984), en base a la secuencia de reacciones indicada a continuación:



La composición del medio empleado para la valoración de dicho intermediario en una alícuota del extracto perclórico fue: Tris-HCl 100 mM (pH=7,5), MgCl₂ 5 mM, NADP 0,35 mM, glucosa 1 mM, 0,7 U de G6PDH (Roche, 127655) y 1,4 U de PGI (Roche, 128139). Los componentes de la mezcla se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, lo que permitió eliminar la posible interferencia en el análisis de la G6P y F6P presentes en la muestra foliar debido a que la cantidad excedente de F6P respecto a G6P podría inhibir la actividad G6PDH. La G6P endógena presente en el extracto se eliminó por adición de G6PDH que permitió su transformación en 6Pgluconato; y la F6P, por adición de PGI que catalizó la conversión en su isómero G6P y su oxidación posterior a 6Pgluconato por la G6PDH. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la valoración del ATP se inició con la adición de 0,9 U de HK (Roche, 1426362) al medio de reacción, facilitándose la fosforilación de la glucosa y posterior conversión de la G6P formada en 6Pgluconato mediante la G6PDH presente en el medio de incubación. Los niveles de ATP se expresaron en nmol·g PF⁻¹.

3.6.3.4. Ácido 2-oxoglutarato

La valoración del 2-oxoglutarato se realizó según el método descrito por Burlina (1984), fundamentado en la siguiente reacción:

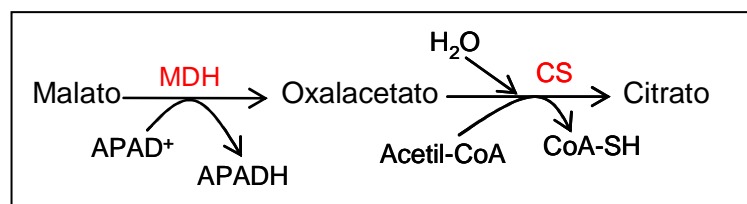


El mencionado ácido orgánico se valoró en un medio de reacción compuesto por: Hepes-KOH 50 mM (pH=7,5), NH₄Cl 20 mM y NADH 50 μM, junto a una alícuota del

extracto perclórico generado para la valoración de intermediarios metabólicos. La incorporación de 1,5 U de glutamato deshidrogenasa (GDH; Sigma, G2626) facilitó la aminación reductiva del 2-oxoglutarato con la consiguiente formación de glutamato. La concentración final del 2-OG se expresó en $\text{nmol} \cdot \text{g PF}^{-1}$.

3.6.3.5. Malato

El malato se determinó empleándose 3-acetilpiridina adenina dinucleótido (APAD), como piridin nucleótido, cuya valoración se realizó espectrofotométricamente a la longitud de onda de 366 nm, según el método propuesto por Stitt (1984) basado en la siguiente secuencia de reacciones:



Este ácido orgánico se valoró utilizando una alícuota del extracto perclórico en un medio que contenía TEA 100 mM (pH=8,5), APAD 0,33 mM, acetil-coenzima A 0,33 mM junto a 0,4 U de citrato sintasa (CS; Roche, 103381). La reacción se inició por adición de 6 U de malato deshidrogenasa (MDH; Roche, 127256) que permitió la oxidación del malato en oxalacetato y su posterior conversión, en presencia de acetil-CoA, a citrato mediada por el enzima citrato sintasa.

La concentración de malato se expresó en $\mu\text{mol} \cdot \text{g PF}^{-1}$ considerando el coeficiente de extinción molar del APADH a la $\lambda=366 \text{ nm}$ ($\epsilon_M: 9,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) junto a la cantidad de extracto empleado en el análisis, el volumen total de extracto perclórico y los gramos de peso fresco del material vegetal empleado en dicha extracción.

3.6.4. Aminoácidos

La valoración de los aminoácidos en el extracto etanólico-acuoso se llevó a cabo mediante dos métodos de análisis; con uno de ellos se realizó una valoración colorimétrica empleando el método de la ninhidrina (Hare, 1977) con objeto de obtener una estimación del contenido total de aminoácidos; y con el otro, los aminoácidos fueron analizados individualmente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), mediante el método propuesto por Gollan et al. (1992), valoración que permitió determinar la contribución de cada uno de ellos al total de aminoácidos valorados.

(i) Método de la ninhidrina

Los aminoácidos totales se valoraron en el extracto etanólico-acuoso procedente de la extracción de carbohidratos solubles, utilizando el método de la ninhidrina (Hare, 1977); oxidante fuerte que provoca la descarboxilación oxidativa y desaminación de los aminoácidos. Método basado en la reacción de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrinteno) con los α -aminoácidos a temperaturas elevadas, formándose amoniaco y anhídrido carbónico por reducción de la ninhidrina a hidrindantina. La cual reacciona a su vez con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina generando un compuesto de coloración azul-púrpura, denominado púrpura de Ruthermann. Cromóforo que tiene su máxima absorción a 570 nm.

El reactivo de ninhidrina se preparó mezclando *in situ* las siguientes soluciones: 50 mg de Cd (CH_3CO_2)₂ en 1 ml de acético glacial y 5 ml de agua, junto a la ninhidrina 0,1% (p/v) en acético glacial (50 ml). Para la valoración del contenido de aminoácidos en las muestras, una alícuota del extracto etanólico-acuoso fue transferida a un eppendorf de seguridad junto a 500 μl de reactivo de ninhidrina, añadiéndose agua hasta completar un volumen final de 1 ml. La mezcla se homogeneizó por agitación e incubó en un bloque térmico a 70 °C durante 10 minutos, se dejó atemperar a temperatura ambiente durante 15 minutos; valorándose con posterioridad la coloración a 570 nm en un espectrofotómetro (Hewell Packard, 8452A Diode Array), frente a un blanco con ninhidrina y agua. Paralelamente a la medida de las muestras se realizó una recta de calibración con diferentes cantidades de glutamina, a partir de una solución estándar de glutamina 1 mM (Sigma, G3126). La medida de absorbancia obtenida fue proporcional a la concentración de dicho aminoácido, lo que permitió la transformación de los resultados como $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

(ii) Cromatografía líquida de alta presión

Todos los aminoácidos individuales, a excepción de prolina y cisteína, se midieron en el extracto etanólico-acuoso según el método de Gollan et al. (1992), usando cromatografía líquida de alta presión. En la que la separación de aminoácidos se realizó por cromatografía en fase reversa, consistente en un disolvente fundamentalmente polar, como fase móvil, y una cadena hidrocarbonada ligada, como fase estacionaria; y la detección y cuantificación tuvo lugar previa conversión del grupo amino primario de los aminoácidos en un derivado fluorescente con el agente derivatizante oftalaldehído (OPA), que fue posteriormente medido con un fluorímetro.

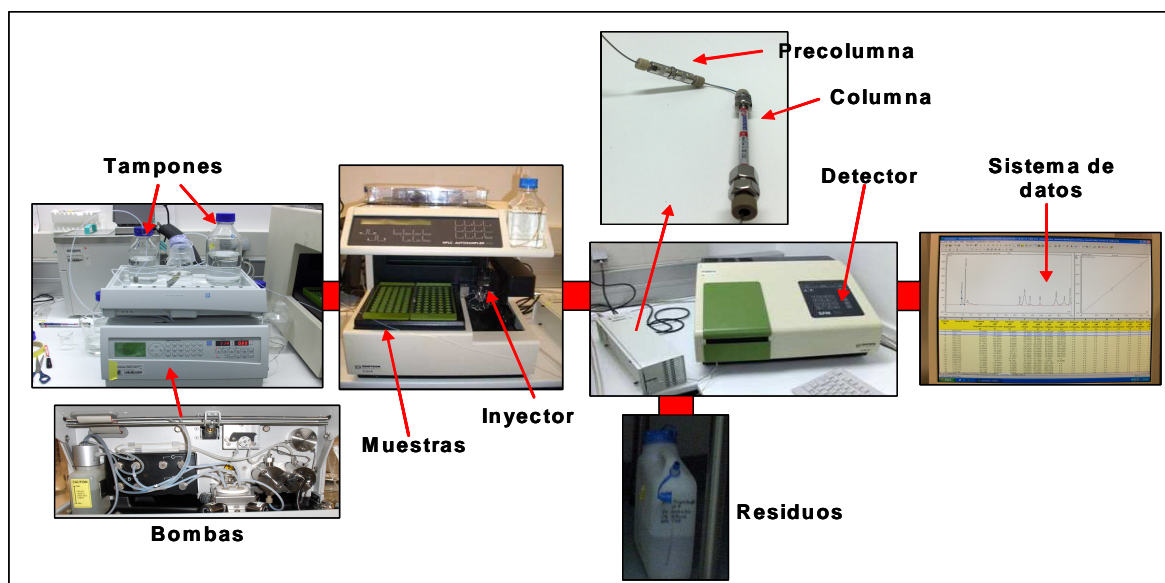


Figura 7. Se muestran los diferentes componentes del sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El sistema de bombas con un operador de gradiente integrado que permite el control de la presión del sistema y la velocidad de flujo de los tampones. El equipo de colocación de muestras refrigerado a 4 °C (Autosampler 460), que permite la inyección automática de las muestras junto a OPA en el HPLC. Se muestra también la columna -Hyperclone- que facilita la separación de los aminoácidos, a la que previamente se une una precolumna (las cuales se introducen en una cámara refrigerada para mantener la temperatura a 18 °C) ; junto al detector (SFM 25 Kontron), el registrador y el sistema de recogida de residuos.

El equipo de HPLC utilizado para la valoración de aminoácidos se componía de un inyector de muestras automatizado (Autosampler 460), refrigerado a 4 °C (Figura 7), en el que 35 µl del extracto etanólico fueron derivatizados con 35 µl de una mezcla del reactivo OPA, constituido por 25 mg de OPA en 0,5 ml de metanol, 4,5 ml de tampón borato-KOH 0,8 M (pH=10,4) y 50 µl de ácido mercaptopropiónico, siendo cada 62 minutos inyectada una nueva muestra; junto a un sistema de bombas con un operador de gradiente integrado, necesario para mover la fase móvil a través de la columna (Figura 7). Fase móvil constituida por el tampón A (un litro de Na₂HPO₄ 12 mM (pH= 6,8) con 4 ml de tetrahidrofurano) y tampón B (250 ml de Na₂HPO₄ 12 mM (pH= 6,8), 150 ml de metanol y 105 ml de acetonitrilo), en los que las fases acuosas se filtraron previamente con un sistema de vacío a través de filtros de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 µm (Sartorius, Goettingen); siendo finalmente desgasificados con un ultrasonido (Sonorex super 10P, Bandelin) durante 45 minutos. La fase estacionaria se componía de una columna rellena con partículas de sílice (Hypersil) junto a una capa de octadecil silano (C18) fijadas mediante enlaces covalentes, con un tamaño de partícula de 3 µm y dimensiones de 150x4,60 mm (Hyperclone 3 µm ODS). Para prolongar la vida media de la columna analítica, previa a la misma, se colocó una precolumna, cuyo relleno (Phenomenex, Luna 10u-PREP C18(2)), poseía características semejantes a los de la columna, pero con un tamaño de partícula algo mayor con objeto de facilitar la retención

de pigmentos o componentes que pudieran interferir en la separación de las muestras o bien pudieran unirse irreversiblemente a la fase estacionaria (la precolumna se renovaba con frecuencia, una vez valoradas un cierto número de muestras). La columna y precolumna se mantuvieron a una temperatura constante de 18 °C, por introducción de las mismas en una cámara refrigerada (Figura 7).

El proceso de separación cromatográfica se inició tras la inyección automática del volumen adecuado de extracto junto con el agente derivatizante, continuando la separación de los componentes mientras los analitos y la fase móvil fueron bombeados a través de la columna a una velocidad de flujo de 0,8 ml/minuto. Tras la derivatización del primer grupo amino con OPA se generó un compuesto fluorescente que se midió con un fluorímetro. Las señales generadas por el fluorímetro (Fluorometer SFM 25, Kontrons Instrument), a una λ de excitación de 330 nm y de emisión de 450 nm, fueron cuantificadas e identificadas por comparación de estándares de aminoácidos originales (Sigma, Deisenhofen, FRG), usando un sistema de datos (D 450, kontron). Considerando los tiempos de retención y la definición de los picos obtenidos en el cromatograma de las muestras junto al factor de calibración obtenido con los estándares a concentraciones de 10 y 20 μM de aminoácidos, se transformaron los resultados obtenidos para los diferentes aminoácidos en cada muestra, siendo su expresión final $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Mediante el software de datos cromatográficos Chromeleon 6.3 (Dionex) se controlaba el sistema completo de HPLC, siendo también empleado para la valoración de los cromatogramas y la cuantificación.

3.6.5. Nitrato

El nitrato se determinó por espectrofotometría según el método propuesto por Cawse (1967). Unos 200 mg de material vegetal macerado y congelado fueron transferidos a un vial (de peso exacto conocido) mantenido en nitrógeno líquido. El material vegetal se secó en una estufa a 60 °C durante 48 horas, una vez enfriado a temperatura ambiente, el vial conteniendo la muestra seca fue pesado en una balanza de precisión (Precisa, XT 220 A); la sustracción del peso final obtenido tras la desecación en estufa al peso fresco de muestra junto al peso del vial obtenido inicialmente nos permitió obtener el peso seco de la muestra vegetal. A continuación, el material vegetal fue homogeneizado con 1 ml de agua y autoclavado durante 1 hora a 120 °C y $1,06 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de presión en un autoclave (P Selecta Autester, 437-G). Tras enfriarse la muestra, se centrifugó a máxima velocidad -13000 rpm- durante 10 minutos; del sobrenadante obtenido se transfirió una alícuota de 100 μl a un nuevo vial junto a 900 μl de agua. El extracto homogeneizado fue clarificado con carbón

activo durante 10 minutos y posteriormente centrifugado en las condiciones indicadas anteriormente. Del extracto clarificado se tomaron 75 µl en un nuevo vial, añadiéndose 125 µl de agua y 400 µl de ácido sulfámico 1,5% (para eliminar el nitrito de la muestra), junto a 400 µl de HClO₄ 10% (para eliminar interferencias por materia orgánica). La mezcla fue homogeneizada por agitación e incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue centrifugada durante 5 minutos a máxima velocidad y la absorbancia del extracto medida a 210 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Hewell-Packard, 8452A Diode Array), empleándose cubetas de cuarzo (Hellma, 6040-UV, 10 mm) frente a un blanco compuesto por 200 µl de agua, 400 µl de ácido sulfámico 1,5% y 400 µl HClO₄ 10%.

Paralelamente a la valoración del nitrato en las muestras foliares se realizó una recta de calibración con diferentes cantidades de KNO₃, a partir de una solución estándar de KNO₃ 1 mM. La regresión obtenida nos permitió determinar la concentración de nitrato, teniendo en consideración tanto las diluciones realizadas durante el proceso de valoración como el peso fresco de muestra, o el peso seco de la misma; lo que nos permitió expresar los resultados en micromoles de nitrato por gramo de peso fresco (µmol·g PF⁻¹) o micromoles de nitrato por gramo de peso seco (µmol·g PS⁻¹).

3.6.6. Clorofilas

El método empleado para la valoración de clorofilas en los extractos etanólicos obtenidos para la determinación de carbohidratos solubles fue el de Arnon (1949), basado en la medida de absorbancia de la clorofila a las longitudes de onda de 663 y 645 nm en acetona al 80% (v/v).

Una alícuota de 200 µl del extracto etanólico-acuoso homogeneizado, y mantenido en oscuridad y frío durante el proceso de extracción de los carbohidratos, fue transferida a un eppendorf con 800 µl de acetona al 100%. La mezcla fue agitada y transferida a 4 °C en oscuridad durante un periodo de 10 minutos, siendo posteriormente centrifugada a 13000 rpm durante 5 minutos. La absorbancia del extracto obtenido se midió espectrofotométricamente (Hewell-Packard, 8452A Diode Array) a 663 y 645 nm, empleándose como blanco acetona al 80%. Las absorbancias obtenidas a ambas longitudes de onda nos permitieron obtener el contenido total de clorofilas en los extractos foliares, realizando la siguiente conversión:

$$\text{Clorofila total (mg/ml)} = (8,02 \times A_{663}) + (20,2 \times A_{645})$$

Los resultados se expresaron en mg de clorofila por gramo de peso fresco ($\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$), considerando las diluciones durante el proceso de valoración de clorofilas junto al volumen total del extracto etanólico-acuoso y el peso fresco de muestra foliar empleado en la extracción de carbohidratos.

3.6.4. Proteínas totales

El contenido en proteínas totales en el sobrenadante se determinó colorimétricamente usando el método de Lowry et al. (1951) con ligeras modificaciones según Peterson (1977). Con este objeto, 25 μl del extracto procedente de la solubilización de las proteínas totales se transfirieron a un tubo pyrex junto a 975 μl de agua y 200 μl de desoxicolato de sodio (DOC) 0,15% (p/v). La mezcla homogeneizada se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente, añadiéndose a continuación 200 μl TCA 72% (p/v), que tras su agitación, fue transferida a 4 °C durante 15 minutos para facilitar la precipitación de las proteínas. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 3000g en una centrífuga basculante (Heraeus Sepatech, Labofuge Ae), descartándose el sobrenadante. Al precipitado, se añadió 1 ml de agua y 1 ml del reactivo cobre-tartrato-carbonato (CTC) constituido por una mezcla de volúmenes iguales de las siguientes soluciones (CuSO_4 0,1%, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0,2%, Na_2CO_3 10%), NaOH 0,8 N, SDS 10% y agua, que tras su homogenización se dejó a temperatura ambiente 10 minutos, para facilitar la interacción del cobre con las proteínas, en medio alcalino, formando complejos Cu^{2+} -proteína. Posteriormente, se añadieron 500 μl del reactivo Fenol Folin Ciocalteu (Sigma, F9252) en agua en proporción 1:5 (v/v), el cual reacciona con las proteínas dando un complejo de coloración azul intenso, cuya intensidad dependerá del número de aminoácidos aromáticos presentes, en especial la tirosina y el triptófano, tras un periodo de incubación de 45 minutos a temperatura ambiente. La coloración de las muestras se valoró a 750 nm en un espectrofotómetro (Hewell-Packard, 8452A, Diode Array), usándose albúmina bovina (BSA) como estándar.

Para determinar el contenido proteico en las muestras foliares se realizó una curva patrón, preparándose diferentes soluciones de albúmina bovina en un rango de concentraciones entre 0 y 120 $\mu\text{g/ml}$, a partir de una solución estándar en concentración (BSA, 0,50 mg/ml); de las que se tomó 1 ml para cada concentración en tubos pyrex, y se sometió al mismo protocolo detallado con anterioridad para la obtención de la coloración. Se recogieron las lecturas de absorbancia según la concentración de albúmina, ajustándose a una curva de regresión de segundo grado, a partir de la cual fácilmente pudieron referirse

los datos de absorbancia obtenidos en las muestras procedentes del material vegetal de los diferentes tratamientos experimentales, expresándose en miligramos de proteína por gramo de peso fresco ($\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$).

3.7. Determinación de la actividad nitrato reductasa

Se ha valorado la actividad nitrato reductasa como enzima clave regulador de la asimilación de nitrógeno. La medida se realizó según el método propuesto por Mackintosh et al. (1992), con ciertas modificaciones introducidas por Scheible et al. (1997c), basado en la cuantificación del nitrito formado en la reacción catalizada por el enzima. Dicha actividad se valoró en la ausencia o presencia de cationes divalentes, realizándose dos análisis paralelos; uno en ausencia de magnesio (EDTA 5 mM), que permitió la estimación de la actividad nitrato reductasa máxima y otro en presencia de dicho catión ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 10 mM), que permitió la estimación de la actividad nitrato reductasa selectiva, por valoración de la forma fosforilada del enzima (Huber et al., 1992; Scheible et al., 1997c). El estado de activación del enzima se expresó como la razón de su actividad en la presencia o ausencia de Mg^{+2} 10 mM, multiplicado por 100 (Mackintosh et al., 1995).

Muestras foliares congeladas y almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ fueron maceradas en un mortero preenfriado en nitrógeno líquido, y del orden de 150 mg del material vegetal pulverizado, fue mezclado y extraído con cuatro volúmenes (p/v) de tampón enfriado en hielo compuesto por Hepes-KOH ($\text{pH}=7,5$) 100 mM, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 5 mM, BSA 1% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v), PMSF 0,5 mM, FAD 20 μM , leupeptina 25 μM , Na_2MoO_4 5 μM , PVPP 1% (p/v). En el extracto homogeneizado la actividad nitrato reductasa máxima y selectiva fue valorada inmediatamente, mezclando un volumen de dicho extracto con cinco volúmenes de un tampón de ensayo precalentado a $30\text{ }^\circ\text{C}$, en un bloque térmico, con los siguientes componentes: Hepes-KOH ($\text{pH}=7,5$) 100 mM, KNO_3 5 mM, EDTA 5 mM, leupeptina 15 μM , FAD 10 μM , NADH 0,5 mM, DTT 0,25 mM y Na_2MoO_4 5 μM para la valoración de la actividad nitrato reductasa máxima; o bien en el tampón de ensayo Hepes-KOH ($\text{pH}=7,5$) 100 mM, KNO_3 5 mM, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 10 mM, leupeptina 15 μM , FAD 10 μM , NADH 0,5 mM, DTT 0,25 mM y Na_2MoO_4 5 μM para la valoración de la actividad nitrato reductasa selectiva. El extracto de ambas reacciones realizadas en paralelo, fue rápidamente homogeneizado, y transferido de nuevo al bloque térmico para su incubación a $30\text{ }^\circ\text{C}$, y a diferentes tiempos, con intervalos de 2 minutos cada uno, una alícuota de 300 μl de la mezcla de ensayo fue recogida y transferida a un nuevo eppendorf con 25 μl de

$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ 0,6 M para paralizar la reacción; por formación de complejos del Zn^{+2} con los grupos SH de las cisteínas de las proteínas, generando un cambio en la conformación de las proteínas, que facilitó su agregación y precipitación final. En paralelo a las valoraciones de actividad máxima y selectiva, se realizaron controles (en el momento de comenzar la reacción), en presencia o ausencia de 10 nmoles de nitrito, incorporándose también acetato de zinc con anterioridad al extracto.

A cada una de las alícuotas obtenidas a diferentes tiempos, tanto en los análisis de actividad máxima y selectiva como en los controles de tiempo cero, se añadieron 75 μl de metosulfato de fenazina (PMS) 250 μM , siendo homogeneizadas junto al extracto, e incubadas a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos, para facilitar la oxidación del NADH que pudiera quedar en exceso y evitar interferencias en la determinación de nitrito (Scholl et al., 1974). Finalmente, se añadieron 300 μl de sulfanilamida 1% (p/v) en HCl 3N junto a idéntica cantidad de N-naftiletildiamina (NNEDA) 0,02% (p/v) en agua (Snell & Snell, 1949; Beevers & Hageman, 1980); la mezcla se agitó y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para asegurar la interacción del diazo-compuesto, generado por reacción de la sulfanilamida con el nitrito, con una amina aromática del NNEDA dando un compuesto coloreado cuyo máximo de absorción se presenta a 540 nm. Compuesto que fue valorado espectrofotométricamente a dicha longitud de onda, en el sobrenadante obtenido, tras la centrifugación de la muestra a 13000 rpm durante 5 minutos. En ambos ensayos de actividad, el seguimiento de la reacción se realizó durante 6 minutos a intervalos de 2 minutos cada uno, generándose seis análisis, que junto a los dos controles de tiempo cero hicieron un total de ocho análisis por muestra.

La diferencia en absorbancia entre los controles de tiempo cero, con o sin nitrito añadido, fue establecida como el equivalente a 10 nmoles de nitrito para calcular la actividad nitrato reductasa de las muestras, que junto a la consideración del peso fresco de muestra empleado en el ensayo de actividad enzimática y el tiempo de reacción permitió la expresión de los resultados finales como micromoles de nitrito por gramo de peso fresco y por hora ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Es destacable mencionar, la realización de seguimientos de linealidad del ensayo con el tiempo y de proporcionalidad de la actividad nitrato reductasa con la cantidad de extracto incluida en el análisis.

3.8. Valoración de los niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco

Como enzima regulador de la asimilación de carbono se han determinado los niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco codificada en el núcleo (*rbcS*). La valoración se realizó mediante northern blot, un método estándar para la detección y cuantificación de los niveles de ARN mensajero (Sambrook et al., 1989). Éste permite una comparación directa de la abundancia de mensajeros entre muestras en una membrana. El método comprende varios procesos, tales como, el aislamiento de ARN total, la separación del ARN por tamaño electroforéticamente en geles de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes, la transferencia a un soporte sólido y su posterior inmovilización, la prehibridación e hibridación con la sonda radioactiva, el lavado y detección.

(i) Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de las muestras foliares de trigo se empleó un método rápido de aislamiento basado en los propuestos por Logemann et al. (1987) y Sambrook et al. (1989).

Aproximadamente 100 mg de material vegetal, pulverizado y congelado, fue transferido a un eppendorf de seguridad estéril, siendo homogeneizado con 450 μ l de tampón guanidina (EDTA 20 mM, MES 20 mM, β -mercaptoetanol 50 mM y guanidina 8 M (pH=7)); y posteriormente extraído, con 450 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma, P3803), en proporción (25:24:1). La mezcla tras ser agitada vigorosamente, se mantuvo en hielo hasta su centrifugación a 4 °C, en una centrífuga refrigerada para eppendorfs (Heraeus Biofuge Primo R) a 14000 rpm durante 5 minutos. Tras la separación de fases, el sobrenadante se recogió y transfirió a un nuevo eppendorf estéril, y los ácidos nucleicos se precipitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con ácido acético y etanol, por adición de 1/20, del volumen de guanidina empleado, de CH₃COOH 1 M y 0,7 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado, después de la centrifugación durante 20 minutos en las condiciones anteriormente descritas, fue resuspendido en 450 μ l de CH₃COONa 3 M (pH=5,5) y centrifugado nuevamente a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 450 μ l de etanol al 70% (v/v); el cual fue retirado por centrifugación. Los restos de etanol se eliminaron por evaporación y el ARN precipitado se resuspendió en 50 μ l de agua DEPC (Dietileno Pirocarbonato) estéril con inhibidor de ARNasas en proporción 0,5% (v/v) (Promega, N2111).

La pureza del ARN se comprobó por medida de la absorción a 230, 260 y 280 nm, siendo la absorbancia a 260 nm la empleada para la cuantificación (Logemann et al., 1987). La integridad, calidad y cantidad del ARN aislado según el método descrito, se valoró en un espectrofotómetro UV-visible Nanodrop ND-1000 frente a un blanco de H₂O DEPC, por selección del programa de concentración y calidad de los ácidos nucleicos, y en éste, el de cuantificación del ARN. La calibración del cero del aparato se realizó con 2 µl de H₂O DEPC, lo que permitió con posterioridad cuantificar la cantidad de ARN en 2 µl, resultado que automáticamente estima el aparato expresándolo en nanogramos por microlitro (ng·µl⁻¹). Unas razones 260/280 y 260/230 en torno a 2 o superiores fueron indicativas de una buena calidad del ARN aislado.

(ii) Electroforesis

Una vez que el ARN ha sido aislado, el primer paso en el análisis por northern es la electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes, empleándose formaldehído como agente desnaturalizante (Sambrook et al., 1989).

Para los northern blots, 10 µg de ARN se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5% (p/v) con formaldehído al 7% (v/v) en una cubeta horizontal de tamaño mediano Midicell primo EC330. Con este objeto, 3 gramos de agarosa se disolvieron en 150 ml de agua estéril por ebullición en el microondas, dejándose enfriar a 60 °C en un baño de agua a dicha temperatura, añadiéndose 20 ml de tampón 10xMEN (MOPS 0,2 M, CH₃OONa 50 mM, EDTA 10 mM (pH=7)) y 35 ml de formaldehído, justo en el momento previo al vertido de la mezcla convenientemente homogenizada sobre la bandeja de la cubeta de electroforesis con los delimitadores del gel y el peine para la colocación de muestras. Dejándose solidificar a temperatura ambiente durante 45 minutos, debajo de la campana extractora de gases, para la obtención del gel de agarosa con la consistencia adecuada para la separación electroforética.

Entre tanto, 15 µg de ARN fueron transferidos a un eppendorf estéril junto a 31,5 µl de un tampón de muestra (5 µl de 10xMEN, 20 µl formamida, 6 µl formaldehído y 0,5 µl de bromuro de etidio), e incubados a 56 °C en un bloque térmico durante 15 minutos, para su desnaturalización, siendo posteriormente enfriados en hielo durante al menos 5 minutos.

Una vez solidificado el gel de agarosa, se colocó en la cubeta de electroforesis, tras ser retirados tanto el peine de colocación de muestras como los delimitadores, añadiéndose el tampón de corrido -1xMEN- a ambos lados de la cubeta, pero sin cubrir completamente el gel. Cargándose las muestras de ARN desnaturalizadas en sus respectivas celdillas,

dejándose a continuación una vacía, para colocar en la siguiente el marcador de corrido de gel con azul de bromofenol (1 μ l de azul de bromofenol 1 μ M junto a 31,5 μ l del tampón de muestra). La separación del ARN desde el polo negativo al positivo, se comenzó por aplicación de un voltaje de 120 voltios con una fuente de alimentación (Bio-Rad, powerpac 200) durante 5 minutos, lo que permitió la integración de las muestras en el gel, facilitando con posterioridad una mejor separación y definición de las bandas de los diferentes tipos de ARN. Tras este voltaje inicial, se paralizó el corrido del gel, abriéndose la cámara cuidadosamente para rellenar con tampón de corrido cada una de las celdillas de colocación de muestras, continuándose con posterioridad la electroforesis a un voltaje constante de 120 voltios durante una hora y media aproximadamente, o hasta que el marcador hubiera migrado al menos unos 2/3 en el gel.

Una vez finalizada la electroforesis, se comprobó la uniformidad en el cargado de las muestras y la definición de las bandas bajo la luz UV mediante un transiluminador con cámara fotográfica incorporada (Chemi Doc, Bio-Rad), obteniéndose la correspondiente foto del gel de agarosa.

(iii) Blotting

El ARN separado electroforéticamente fue transferido a membranas de nylon (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotec) por capilaridad con 20xSSC (NaCl 3 M, citrato sódico 300 mM (pH=7)), lo que permitió su posterior fijación a la misma.

Para el blotting se prepararon dos papeles 3MM Whatman de dimensiones 14x25 cm para utilizarlos sobre la base en contacto con la solución de transferencia sobre la que se colocará el gel, una membrana Hybond N de dimensiones exactas al gel de agarosa, 4 papeles 3MM Whatman de dimensiones idénticas a la membrana y papeles de filtro de dimensiones similares en cantidad suficiente para tener un espesor de 8 a 10 cm que serán colocados sobre la membrana y los papeles 3MM Whatman.

El proceso consistió en tomar una bandeja de 40 cm de largo x 30 cm de ancho y 5 cm de profundidad, en cuyo interior se colocó un soporte de 2 cm de espesor y dimensiones algo superiores al gel de agarosa, sobre el cual se colocaron los dos papeles 3MM Whatman de 14x25 cm humedecidos en 20xSSC, incorporándose a la bandeja un litro y medio de solución 20xSSC de manera que los extremos del papel se encontrasen inmersos en la solución de transferencia (Figura 8). Sobre el papel se colocó el gel con los huecos de las celdillas empleadas en el cargado de muestras de ARN hacia abajo, en contacto con el papel; poniéndose a continuación la membrana Hybond N sobre el gel, y dos de los papeles

3 MM Whatman humedecidos en 20xSSC sobre la membrana, con sumo cuidado, siendo los otros restantes papeles 3 MM Whatman colocados con posterioridad, facilitándose la transferencia de la solución por el simple contacto. Para evitar la formación de burbujas durante el proceso de transferencia a la membrana, se pasó por deslizamiento una pipeta de vidrio desde un extremo del gel al otro. Finalmente, se colocaron los papeles de filtro para generar un bloque de unos 8 a 10 cm de espesor, sobre el que se puso un peso aproximado de medio kilo junto a un soporte de cristal para mantener la estabilidad del sistema. Facilitándose por presión el ascenso de la solución 20xSSC a través del gel y, en definitiva, la transferencia del ARN a la membrana. Los bordes del gel sobre el papel Whatman y el soporte se delimitaron con parafilm, para mejorar el paso de la solución por las zonas en contacto con el 20xSSC. El proceso de blotting se mantuvo durante unas 16 horas, para asegurar una transferencia completa a la membrana en las condiciones descritas.

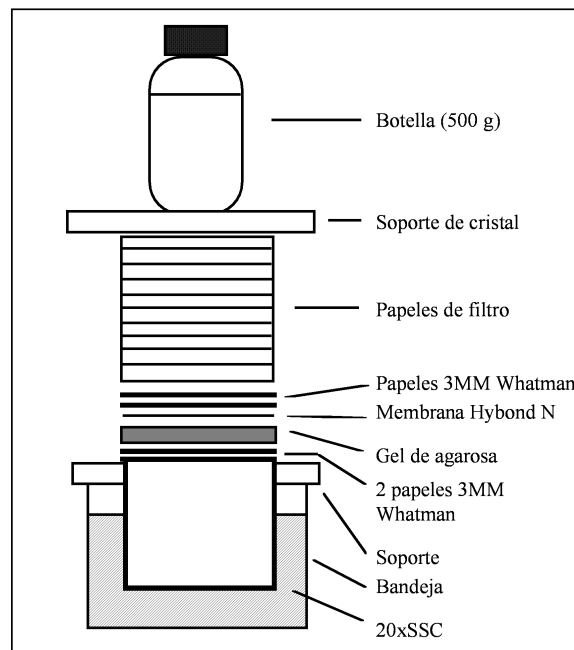


Figura 8. Esquema de la preparación del blotting para la transferencia del gel de agarosa a la membrana.

Una vez finalizado el proceso de transferencia se recogió la membrana sobre dos papeles 3MM Whatman, cortándose uno de los extremos de la misma, como indicación del orden de colocación de muestras en el gel. Observándose en el transiluminador con luz UV la transferencia completa del ARN a la membrana, así como la carencia de señales en el gel (obteniéndose una foto en dichas condiciones).

El método empleado para la fijación del ARN a la membrana de nylon fue el UV-crosslinking, basado en el empleo de lámparas ultravioletas de longitud de onda corta, las cuales permiten que las bases nitrogenadas del ARN, principalmente el uracilo, lleguen a

ser altamente reactivas y formen uniones covalentes con los grupos amino en la superficie de la membrana. La inmovilización se realizó por exposición de la membrana durante un minuto a luz de 254 nm en un crosslinker (Auto-Crosslink Modus, Stratalinker 1800 UV, Stratagene). Este método presenta la ventaja de aumentar significativamente las señales de hibridación frente al método tradicional por calentamiento a 80 °C durante 2 horas en un horno.

(iv) Hibridación

El proceso de hibridación se basa en la incubación de la membrana con una sonda de ADN de cadena única, lo que permite la formación de pares de bases complementarios a la secuencia de ARN, que se unirán formando moléculas ARN-ADN de doble cadena (Sambrook et al., 1989).

Inicialmente se llevó a cabo la prehibridación de la membrana mediante la colocación de ésta en el interior de un cilindro de un horno de hibridación (Techne Hybridiser HD-10) junto con 20 ml de tampón fosfato (Herby) constituido por $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 250 mM (pH=7,5), BSA 1% (p/v), SDS 7% (p/v), EDTA 1 mM, a temperatura de 60 °C durante 4 horas. Después se procedió a la hibridación de la membrana con la sonda radioactiva, con este objeto, 50 ng de ADN (correspondiente al gen que codifica la subunidad pequeña de la rubisco, *rbcS*, amablemente cedido por la Dra. Christine Raines -Department of Biological Sciences, John Tabor Laboratories, University of Essex, UK-) se llevaron a un volumen de 45 μl con H_2O DEPC estéril, desnaturalizándose por calentamiento a 95 °C durante 10 minutos, para ser rápidamente enfriado en hielo.

El marcaje de la sonda se realizó con isótopos radioactivos, ^{32}P , empleándose el Kit de Amersham, Rediprime II DNA Labelling System que presenta la ventaja de proporcionar una premezcla de componentes liofilizados, asegurando su estabilidad a temperatura ambiente, dispensados individualmente en eppendorfs (mezcla de nucleótidos -dATP, dGTP, dTTP-, random nanomers [d(N)9], FPLC fragmento del enzima klenow y control de ADN) y listos para su empleo por simple adición del ADN y Redivue [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP. El marcaje se realizó según el protocolo indicado por el fabricante. Los 45 μl de la sonda desnaturalizada se transfirieron al eppendorf con la mezcla de componentes proporcionada en el kit de marcaje, tras su homogenización por centrifugación breve, se incorporaron 5 μl del nucleótido Redivue [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (50 μCi) generándose un cambio de coloración una vez homogeneizados los componentes de la mezcla. La reacción se inició por calentamiento a 37 °C durante 30 minutos, paralizándose por incubación a 65 °C durante

10 minutos. A continuación, la sonda marcada radioactivamente se purificó, empleando una columna de Sephadex G50 (Amersham), previamente equilibrada con agua estéril. Con este objeto, la sonda radioactiva se colocó en la columna y se eluyó con 1 ml de agua estéril, separándose el eluido en cinco fracciones de 200 µl cada una. Para verificar la incorporación de radioactividad en la sonda, se midió la radioactividad en cada una de las fracciones obtenidas con un contador de radioisótopos (Bioscan QC 2000, Washington DC); tomándose la fracción que mostró una mayor integración de la radioactividad. La sonda radioactiva purificada se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C.

Para la hibridación, se descartó el tampón fosfato (Herby) empleado durante la prehibridación, incorporándose tampón fresco previamente calentado a 60 °C junto a la sonda desnaturalizada; manteniéndose la hibridación a dicha temperatura durante al menos unas 16 horas.

(iii) Lavado de la membrana

Concluida la hibridación de la membrana con la sonda radioactiva, se procedió a su lavado por eliminación del medio de hibridación del cilindro, y adición de 20 ml de 5xSSC/0,5%SDS durante 30 minutos a la temperatura de hibridación. Lavándose de nuevo con la solución 2xSSC/0,5%SDS a 60 °C durante 15 minutos.

La membrana lavada se extrajo del cilindro y se colocó sobre un plástico de dimensiones superiores a la propia membrana para facilitar que fuera completamente cubierta por el plástico, lo que permitió estimar con el contador Geiger la radioactividad remanente en la membrana tras su lavado. En casos en los que la radioactividad era aún elevada se introdujo un nuevo paso de lavado con 0,5xSSC/0,5%SDS durante 5-10 minutos (repetiéndose el paso de recuperación de la membrana del cilindro de hibridación) y finalmente, la membrana fue sellada en el interior del plástico con un sellador eléctrico (Polystar 242, Rischet & Herfurth GMBH).

(iv) Detección

La comprobación de la abundancia de ARN mensajero se realizó por autoradiografía, tras la exposición de la membrana sobre una película (Kodak BioMax MS Film) en el interior de un cassette (Cassette Kodak BioMax intensifying screen) a -80 °C, durante un periodo de tiempo dependiente de la cantidad de radioactividad integrada.

El revelado se realizó en la cámara oscura del laboratorio fotográfico empleándose luz roja, tras la descongelación de la membrana junto a la película en el interior del cassette a

temperatura ambiente. El revelado consistió en la inmersión de la película durante un par de minutos en el revelador (Developer/Replenisher P-7042, Sigma), lavándose a continuación en agua durante unos minutos, para ser finalmente introducida en el fijador (Fixer/Replenisher P-1767, Sigma) hasta que la película adquirió un aspecto transparente. Los restos de fijador en la membrana se eliminaron por lavado con agua, dejándose secar al aire. La autoradiografía obtenida permitió estimar la abundancia de transcritos en los diferentes tratamientos, según las intensidades de manchas conseguidas.

Posteriormente, la membrana hibridada con una sonda de ADN marcada radioactivamente pudo ser reutilizada para su marcaje con una nueva sonda, tras la eliminación previa de dicha sonda. Dicho proceso se realizó por incubación de la membrana en 0,1% SDS a 95 °C durante 10 minutos, tiempo que tarda en enfriarse la solución.

3.9. Diseño de los experimentos y análisis estadístico de los resultados

Para realizar los diferentes análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico Genstat versión 6.2. Los experimentos llevados a cabo tenían un diseño de bloques al azar en strip-plot con tres bloques, las dos concentraciones de CO₂ (una cámara cada una) adscritas a las parcelas completas dentro de los bloques, la temperatura y el nitrógeno como hileras y columnas dentro de las parcelas completas, y las submuestras en un estrato dentro de temperatura y nitrógeno.

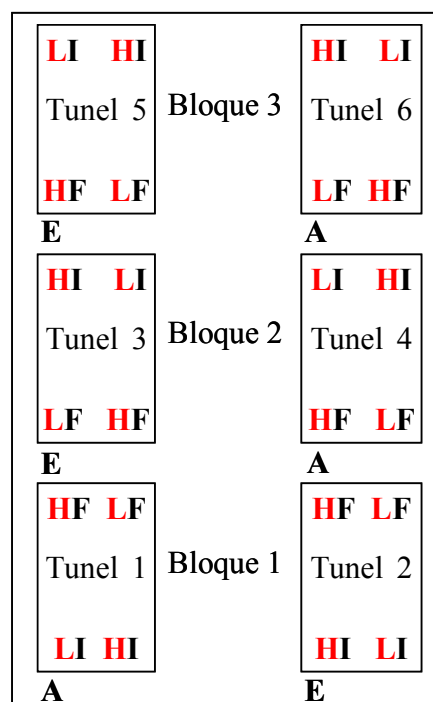


Figura 9. Diseño experimental aplicado para una de las anualidades.

La comparación de los datos obtenidos para cada estadio de desarrollo y anualidad se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). El criterio utilizado para analizar las diferencias entre tratamientos fue la diferencia mínima significativa (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. Debido a que sólo hay tres bloques, el nivel de significación elegido fue < 0.09 para evitar el posible error de Tipo II.

El diseño experimental utilizado (Figura 9) permitió investigar las combinaciones factoriales de dos niveles de CO₂ de crecimiento (370-A- y 700-E- $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂), dos temperaturas (ambiente-I- y ambiente más 2 °C-F-) y dos niveles de suministro de nitrógeno (deficiencia-L- y abundancia-H- en dicho nutriente).

4 . RESULTADOS

4.1. Introducción

En la experimentación desarrollada en el campo, durante dos anualidades, con cultivos de trigo sembrados con las prácticas agrícolas habituales y el empleo de cámaras de gradiente de temperatura, en diferentes estadios del desarrollo de los cultivos **-emergencia de la espiga y después de la antesis-** se realizaron medidas de intercambio gaseoso y se recogieron muestras foliares tanto para la valoración de actividades enzimáticas e intermediarios del metabolismo del carbono y nitrógeno, como para el desarrollo de estudios de expresión génica.

Las muestras foliares correspondían a la última hoja completamente desarrollada del trigo, es decir, la **hoja bandera**. Su recogida se efectuó entre las 4 y 6 horas después de comenzar el periodo luminoso, coincidiendo con el momento de máxima fotosíntesis. En la emergencia de la espiga, las fechas de recogida de muestras fueron el 26 y 17 de Mayo en el 2004 y 2006, respectivamente. La segunda muestra, correspondiente a unos días después de la antesis, se recogió el 9 de Junio de 2004 (12 dda) y 30 de Mayo de 2006 (15 dda).

De los datos obtenidos en cada una de las anualidades y en cada uno de los estadios de desarrollo del cultivo se realizó el análisis de la varianza, siguiendo un diseño de bloques al azar en strip-plot (ver apartado 3.9) cuyos resultados, efectos principales e interacciones significativas entre factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno, se detallan en los siguientes apartados. Para su descripción se tuvo en consideración que la existencia de alguna interacción significativa entre los factores mencionados prevalece sobre el efecto principal de los mismos, si los hubiera. Dichos resultados se representan en tablas con la estructura y nomenclatura que se detalla: la tabla **a** refleja los efectos principales y recoge la media del parámetro analizado, la probabilidad (*p*) y el error estándar de la diferencia (s.e.d.). La tabla **b** muestra la probabilidad (*p*) de las interacciones dobles y triple entre los factores experimentales. La tabla **c** corresponde a las interacciones significativas dobles y la **d** a la triple, ambos tipos de tablas muestran la media del parámetro analizado y el valor máximo del s.e.d para las interacciones. Los efectos significativos se resaltan en negrita y los no significativos se indican con la notación “ns”. La nomenclatura empleada para la descripción de los tratamientos experimentales incluidos en los ensayos es la siguiente: CO₂ (C), CO₂ ambiente (A, 370 μmol·mol⁻¹) y elevado (E, 700 μmol·mol⁻¹); temperatura (T), ambiente (I, referida a la temperatura del módulo inicial de las cámaras de gradiente de temperatura) y 2 °C superior a la ambiente (F, referida a la temperatura del módulo final

de las cámaras de gradiente de temperatura); nitrógeno (N), deficiente (L, low) y abundante (H, high) cuyas cantidades se indicarán para cada anualidad (ver apartado 3.2).

De la misma manera se representan los gráficos indicativos del efecto del CO₂, temperatura y nitrógeno sobre el contenido de los metabolitos y actividades enzimáticas analizadas. La combinación de tratamientos se anota con las siglas AIL, AIH, AFL, AFH, EIL, EIH, EFL y EFH, correspondiendo la primera letra al nivel de CO₂, la segunda, a la temperatura de crecimiento y la tercera, a la adición de nitrógeno al suelo. La nomenclatura se describe en el párrafo anterior.

4.2. Experimento de campo correspondiente a la anualidad 2004

4.2.1. Estudio de la hoja bandera del trigo en la emergencia de la espiga

4.2.1.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (*rbcS*)

Los cambios en los niveles de ARN mensajero del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco (*rbcS*) fueron valorados por northern-blots en la hoja bandera del trigo en la emergencia de la espiga, entre las 4 y 6 horas después del comienzo del fotoperiodo, empleándose dos de las repeticiones disponibles para cada uno de los tratamientos experimentales incluidos en el ensayo (Figura 1). A temperaturas ambientales (I), el crecimiento en CO₂ elevado (E) redujo los niveles de transcritos de *rbcS* en plantas de trigo crecidas con deficiencia en nitrógeno (L) y no afectó a la expresión de aquellas crecidas con abundancia de nitrógeno (H). A temperaturas elevadas (F), el crecimiento en CO₂ elevado indujo la expresión del enzima tanto en abundancia como en deficiencia en nitrógeno (Figura 1).



Figura 1. Niveles de ARNm del gen *rbcS* en la emergencia de la espiga en la hoja bandera de plantas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, bien a nivel de CO₂ ambiental (A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) o elevado (E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), temperaturas ambientales (I) ó 2 °C superiores (F) y deficiencia (L, 32 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) o abundancia (H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de nitrógeno correspondientes a la anualidad 2004. 1ª repetición (a) y 2ª repetición (b). Se aplicaron idénticas cantidades de ARN (15 μg) en cada una de las celdillas; el cargado de muestras fue comprobado por inspección de la señal ARNr (datos no mostrados). La intensidad de la señal indica la abundancia de transcritos relativa al total de ARN.

En condiciones ambientales de CO₂ (A) la expresión del gen *rbcS* fue menor en plantas crecidas a temperatura elevada comparada con aquellas crecidas a temperaturas ambientales tanto en abundancia como deficiencia de nitrógeno. En condiciones de CO₂ elevado, el aumento de temperatura indujo la expresión de la Rubisco en plantas crecidas con deficiencia en nitrógeno; efecto que no tuvo lugar en las plantas crecidas con abundancia de nitrógeno (Figura 1).

En niveles de CO₂ ambientales, tanto en las plantas crecidas a temperaturas elevadas como ambientales, la abundancia de nitrógeno no alteró la expresión de *rbcS*. Sin embargo, en CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno incrementó la expresión del enzima a temperaturas ambientales, pero no modificó los niveles de transcritos de *rbcS* en plantas crecidas a temperaturas elevadas (Figura 1).

4.2.1.2. Contenido de carbohidratos

El análisis de la varianza del contenido foliar de carbohidratos sólo alcanzó significación estadística para los efectos principales (Tabla 1a), no para las interacciones entre factores experimentales (Tabla 1b).

Tabla 1. Cambios en los niveles de glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (S), fructanos (Fru) y almidón (A) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Datos expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

1.a.

	CO ₂			s.e.d.	Temperatura			s.e.d.	Nitrógeno			s.e.d.
	A	E	<i>p</i>		I	F	<i>p</i>		L	H	<i>p</i>	
G	2.18	3.13	ns	0.507	2.60	2.72	ns	0.336	1.88	3.44	< 0.001	0.336
F	3.50	6.04	ns	1.012	4.87	4.67	ns	0.736	4.50	5.04	ns	0.736
S	26.36	32.26	0.012	0.643	31.34	27.28	0.010	1.32	31.34	29.6	ns	1.32
Fru	17.3	24.1	0.067	1.850	25.6	15.7	ns	5.98	22.9	18.4	ns	5.98
A	3.03	3.96	ns	0.971	4.39	2.59	0.024	0.697	3.63	3.36	ns	0.697

1.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G	ns	ns	ns	ns
F	ns	ns	ns	ns
S	ns	ns	ns	ns
Fru	ns	ns	ns	ns
A	ns	ns	ns	ns

El crecimiento en CO₂ elevado aumentó significativamente los niveles de sacarosa y fructanos, si bien no alteró los contenidos foliares de hexosas -glucosa y fructosa- y almidón (Tabla 1a). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales redujo los niveles foliares de sacarosa y almidón, y no modificó los de glucosa, fructosa y fructanos (Tabla 1a). Finalmente, la abundancia de nitrógeno únicamente aumentó el contenido foliar de glucosa, sin afectar al resto de carbohidratos analizados (Tabla 1a).

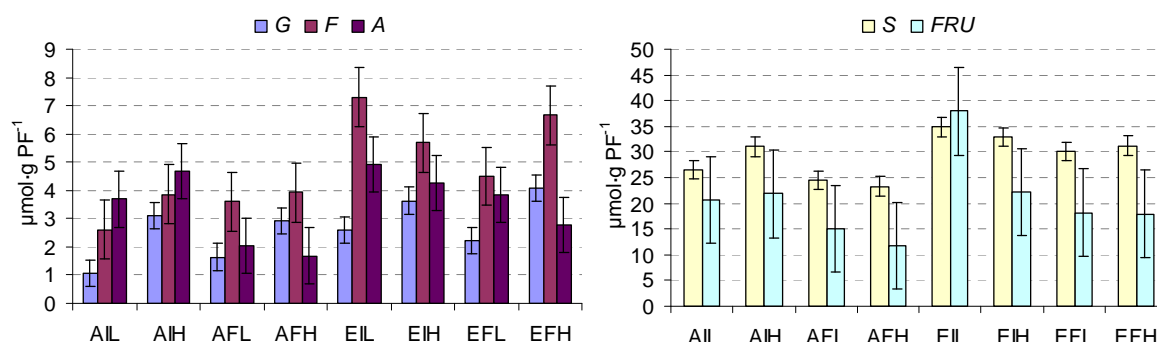


Gráfico 1. Concentración de glucosa (G), fructosa (F), almidón (A), sacarosa (S) y fructanos (Fru) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.1.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P

En referencia a los efectos principales se observó que el crecimiento en CO₂ elevado incrementó la razón G6P/F6P y no afectó a los niveles foliares de UDP-glucosa (Tabla 2a). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales redujo los niveles foliares de UDP-glucosa, y aumentó la razón G6P/F6P (Tabla 2a). Mientras que la abundancia de nitrógeno disminuyó significativamente el contenido foliar de G6P, incrementó la razón G6P/F6P, pero no afectó a los niveles foliares de UDP-glucosa (Tabla 2a).

Tabla 2. Cambios en los niveles de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Datos expresados en nmoles·g PF⁻¹.

	CO ₂			s.e.d.	Temperatura			s.e.d.	Nitrógeno			s.e.d.
	A	E	p		I	F	p		L	H	p	
G6P	115.6	130	ns	5.51	131.4	118.2	ns	7.79	131.4	114.2	0.047	7.79
G1P	8.64	11.15	0.068	0.691	10.54	9.26	ns	0.758	11.10	8.69	0.008	0.758
F6P	109.5	101.7	ns	4.8	114.6	96.5	0.002	4.7	117	94.1	<0.001	4.7
UDP-Glucosa	18.9	18.5	ns	0.92	21	16.5	0.022	1.7	20.1	17.4	ns	1.7
G6P/F6P	1.086	1.358	0.042	0.058	1.135	1.31	0.032	0.072	1.147	1.297	0.059	0.072

2.b

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G6P	0.013	ns	ns	ns
G1P	ns	ns	ns	0.084
F6P	0.026	ns	0.034	ns
UDP-Glucosa	ns	ns	ns	ns
G6P/F6P	ns	ns	ns	ns

2.c.

C.T				T.N		
	A	E	s.e.d.	H	L	s.e.d.
G6P F	122.3	113.9	11.01			
I	108.9	146.1				
F6P F	106.3	86.6	6.672	79.4	113.5	6.65
I	112.6	116.7		108.8	120.5	

2.d.

C.T.N					
F		I		s.e.d.	
	H	L	H	L	s.e.d.
G1P A	6.23	10.49	9.4	8.45	1.516
E	8.70	11.61	10.44	13.86	

Las interacciones entre los factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno no alcanzaron significación estadística en la razón G6P/F6P y el contenido en UDP-glucosa, mientras que las hexosas-P, G6P, G1P y F6P, si mostraron alguna interacción significativa (Tabla 2b). La G6P y F6P mostraron una interacción significativa CO₂xT (Tabla 2b), indicativa de que el CO₂ elevado incrementó el contenido foliar de G6P en plantas crecidas a temperaturas ambientales, y disminuyó los niveles de F6P en plantas crecidas a temperaturas elevadas (Tabla 2c). Además, la elevación de la temperatura redujo los niveles de G6P y F6P en plantas crecidas en CO₂ elevado (Tabla 2c). La interacción TxN mostró significación estadística en los niveles de F6P (Tabla 2b), poniendo de manifiesto que el aumento de la temperatura de crecimiento redujo los niveles de F6P en plantas crecidas con nitrógeno abundante (Tabla 2c); y en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, la abundancia de nitrógeno condujo también a un descenso de este metabolito (Tabla 2c).

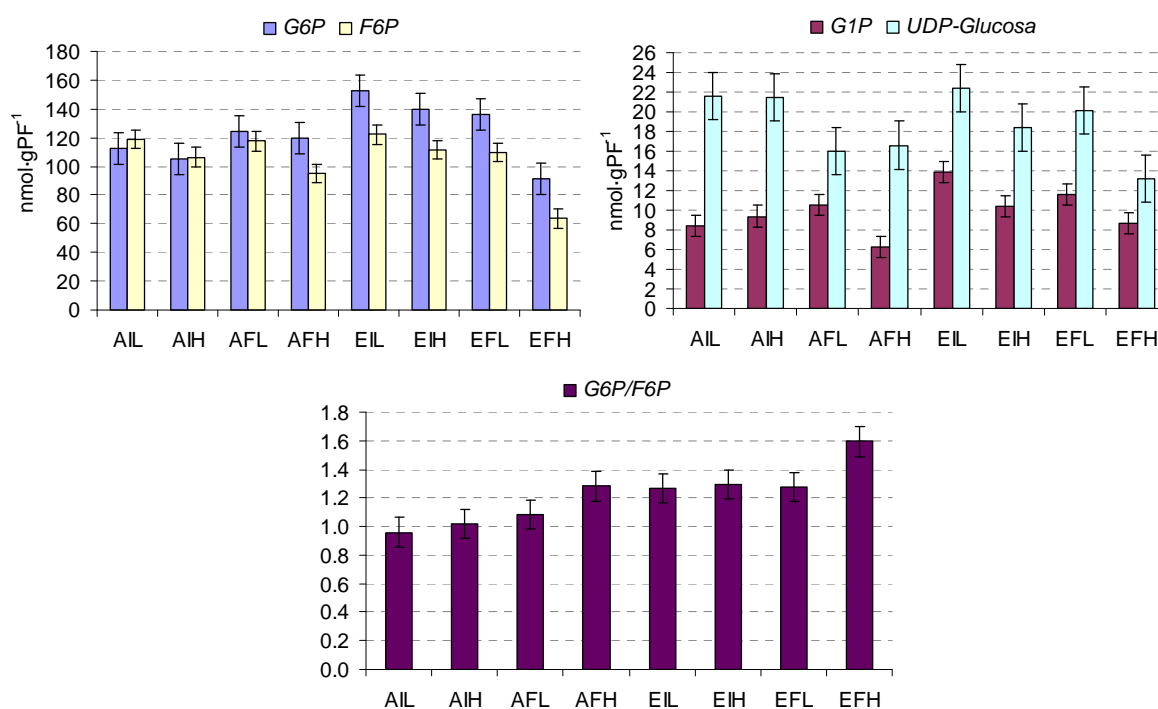


Gráfico 2. Concentración de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.1.4. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos

El crecimiento en CO₂ elevado no afectó a los niveles foliares de ATP, 2-oxoglutarato y malato (Tabla 3a), pero si que modificó significativamente los niveles de 3PGA en

Resultados

interacción con los restantes factores experimentales, temperatura y nitrógeno (Tabla 3b). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó significativamente los niveles de ATP y aumentó las concentraciones foliares de malato en la hoja bandera del trigo (Tabla 3a). Mientras que la disponibilidad de nitrógeno no alteró los niveles foliares de ATP y malato (Tabla 3a).

Tabla 3. Cambios en los niveles de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Datos de 3PGA expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}\cdot 10^{-1}$, de ATP y 2-OG en $\text{nmoles}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de malato en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

3.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	<i>p</i>	s.e.d.	I	F	<i>p</i>	s.e.d.	L	H	<i>p</i>	s.e.d.
3PGA	8.2	6.62	ns	0.611	7.85	6.97	0.013	0.305	7.59	7.23	ns	0.305
ATP	52.4	54.9	ns	3.51	62.6	44.7	0.032	7.4	56.6	50.7	ns	7.4
2-OG	68.3	68.9	ns	2.59	65.6	71.6	ns	5.88	61.3	75.9	0.029	5.88
Malato	15.37	13	ns	0.983	13.24	15.13	0.051	0.872	13.7	14.67	ns	0.872

3.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
3PGA	ns	ns	ns	0.007
ATP	ns	ns	ns	ns
2-OG	ns	ns	0.007	ns
Malato	ns	ns	ns	ns

3.c.

	T.N		
	H	L	s.e.d.
2-OG	F 69.2	73.9	8.32
	I 82.5	48.7	

3.d.

	C.T.N					
		F		I		
		H	L	H	L	s.e.d.
3PGA	A	7.82	7.35	8.39	9.26	0.808
	E	5.43	7.28	7.28	6.48	

Los niveles de 2-OG mostraron una interacción significativa TxN (Tabla 3b), que puso de manifiesto que en plantas crecidas en deficiencia en nitrógeno, la elevación de la temperatura 2 °C por encima de las temperaturas ambientales incrementó el contenido de éste ácido orgánico; y en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno también aumentó los niveles de dicho ácido orgánico (Tabla 3c).

El análisis de la varianza de los niveles de 3PGA mostró una interacción triple significativa de los factores experimentales CO₂xTxN (Tabla 3b), indicativa de que el CO₂ elevado disminuyó los contenidos foliares del 3PGA, tanto en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales y abundancia de nitrógeno, como aquellas crecidas a temperaturas ambientales y deficiencia en nitrógeno (Tabla 3d). La temperatura elevada redujo también los niveles de 3PGA en plantas de trigo crecidas en condiciones de CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno, así como en plantas mantenidas en niveles ambientales de CO₂ y deficiencia en nitrógeno (Tabla 3d). Por su parte, la abundancia de

nitrógeno únicamente disminuyó los niveles de 3PGA en plantas crecidas en CO₂ y temperatura elevados (Tabla 3d).

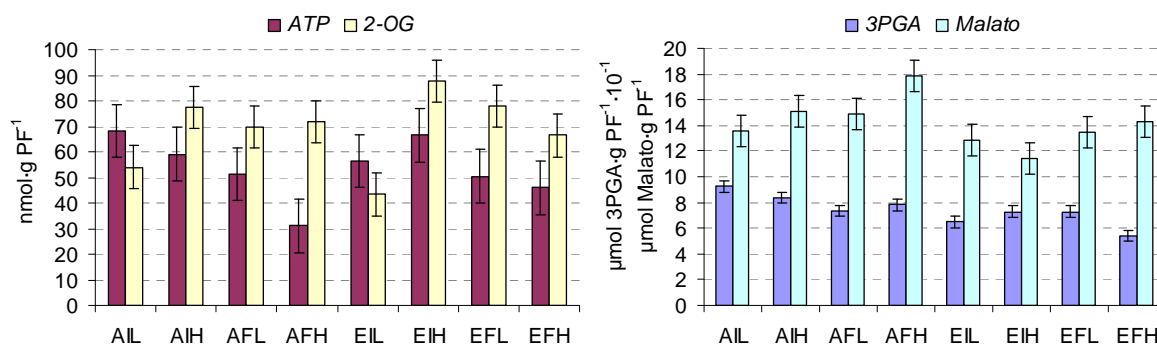


Gráfico 3. Concentración de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.1.5. Actividad nitrato reductasa

El efecto del CO₂ de crecimiento y la adición de nitrógeno al suelo no fue significativo en la actividad nitrato reductasa máxima, valorada en ausencia de magnesio (para más detalles, ver apartado 3.8); únicamente el efecto de la temperatura fue significativo, mostrando que la actividad NR disminuyó en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales comparadas con aquellas crecidas a temperatura ambiente (Tabla 4a). La interacción CO₂xT sobre el estado de activación de la NR alcanzó significación estadística (Tabla 4b), poniendo de manifiesto que en plantas crecidas en [CO₂] ambientales, la temperatura elevada disminuyó el estado de activación del enzima (Tabla 4c).

Tabla 4. Variaciones en la actividad nitrato reductasa máxima (NR) y su estado de activación (Activación) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Datos de la actividad NR expresados en μmol NO₂⁻·g·PF⁻¹·h⁻¹ y del estado de activación en %.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
NR	8.18	10.14	ns	0.889	9.93	8.39	0.087	0.822	8.51	9.81	ns	0.822
Activación	69.7	69.3	ns	10.97	70.7	68.3	ns	3.93	68.3	70.7	ns	3.93

	4.b.				4.c.			
	C.T	C.N	T.N	C.T.N	C.T			
NR	ns	ns	ns	ns	A E s.e.d.			
Activación	0.040	ns	ns	ns	F 64.0 72.7 11.65			
					I 75.4 66			

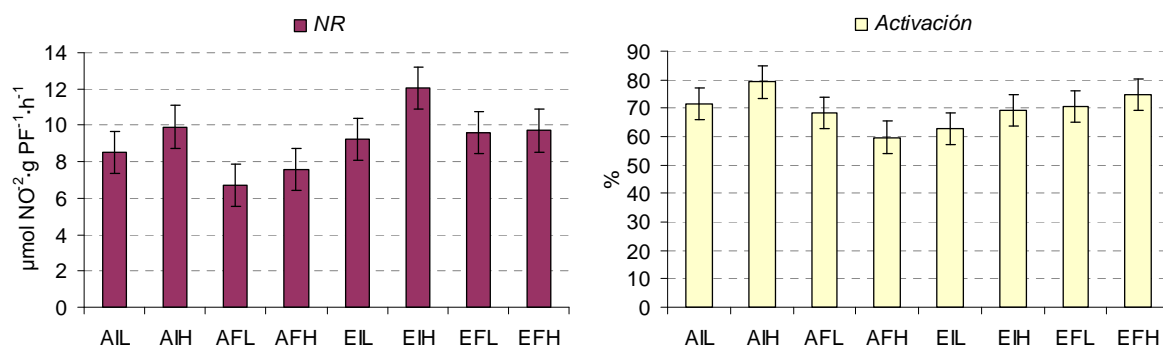


Gráfico 4. Actividad y estado de activación de la nitrato reductasa en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.1.6. Contenido de aminoácidos

Es importante mencionar que la valoración de los aminoácidos en los extractos foliares se realizó por dos métodos diferentes, con objeto de obtener tanto una estimación del contenido total de aminoácidos; así como, la contribución de cada uno de los aminoácidos individuales al total de aminoácidos valorados (ver apartado 3.6.4). El análisis de la varianza de los aminoácidos totales obtenidos por el método colorimétrico con ninhidrina mostró una estrecha similitud con los resultados obtenidos como sumatorio total de cada uno de los aminoácidos individualmente valorados por HPLC, aspecto que garantiza la fiabilidad de los datos obtenidos. Con objeto de evitar la posible repetición de información en la descripción de los resultados, se opta por detallar únicamente los datos referentes a los aminoácidos totales valorados por HPLC (expresados como sumatorio de los niveles obtenidos de glutamina, glutamato, aspartato, asparragina, alanina, serina, glicina, treonina, histidina, citrulina, β -alanina, arginina, GABA, tirosina, valina, metionina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, ornitina y lisina). Ello nos permitirá también diferenciar entre los aminoácidos mayoritarios (sumatorio de Gln, Glu, Asp, Asn, Ala, Ser y Gly), minoritarios (sumatorio de todos los aminoácidos indicados en los aminoácidos totales, con excepción de los mencionados previamente como aminoácidos mayoritarios) y los aromáticos (sumatorio de Phe, Tyr, Trp). Además, se analizarán los cambios en los niveles foliares de los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, así como las razones Gly/Ser, Gln/Glu y Asn/Asp. Finalmente, en la exposición de los resultados de los diferentes experimentos realizados, en este apartado, inicialmente serán descritas las variaciones en los niveles de aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos; describiéndose

a continuación aquellos cambios referentes a los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, junto a las razones anteriormente mencionadas.

Tabla 5. Cambios en los niveles de aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos, en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Datos expresados en µmoles·g PF⁻¹.

5.a.

	CO ₂			s.e.d.	Temperatura				s.e.d.	Nitrógeno			s.e.d.
	A	E	p		I	F	p	L		H	p		
Gly	1.057	0.419	0.009	0.060	0.844	0.631	0.002	0.055	0.720	0.755	ns	0.055	
Ser	5.11	3.90	0.014	0.144	4.76	4.26	0.066	0.247	3.92	5.09	<0.001	0.247	
Gln	3.73	2.64	ns	0.457	3.63	2.74	<0.001	0.181	2.89	3.48	0.007	0.181	
Glu	6.62	5.04	ns	1.02	5.93	5.73	ns	0.435	5.87	5.80	ns	0.435	
Asn	0.735	0.807	ns	0.110	0.827	0.715	0.006	0.034	0.654	0.888	<0.001	0.034	
Asp	3	2.78	ns	0.366	2.91	2.87	ns	0.128	2.87	2.91	ns	0.128	
Ala	0.973	1.393	0.002	0.021	1.269	1.096	0.039	0.075	1.162	1.204	ns	0.075	
Mayor.	21.22	16.98	0.067	1.158	20.17	18.03	0.011	0.715	18.08	20.12	0.014	0.715	
Minor.	3.88	2.84	0.006	0.084	3.57	3.15	ns	0.024	2.63	4.09	<0.001	0.238	
Arom.	0.337	0.273	ns	0.028	0.327	0.283	ns	0.027	0.255	0.356	0.033	0.027	
Totales	25.10	19.82	0.047	1.182	23.74	21.18	0.009	0.822	20.72	24.21	0.001	0.822	
Gly/Ser	0.216	0.110	0.028	0.018	0.179	0.146	0.065	0.016	0.182	0.149	0.036	0.016	
Gln/Glu	0.606	0.545	ns	0.146	0.659	0.492	0.008	0.053	0.532	0.619	ns	0.053	
Asn/Asp	0.254	0.304	ns	0.062	0.301	0.256	0.025	0.018	0.240	0.317	<0.001	0.018	

5.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Gly	0.044	ns	ns	ns
Ser	ns	ns	ns	ns
Gln	0.073	ns	ns	ns
Glu	ns	ns	ns	ns
Asn	ns	ns	ns	ns
Asp	ns	ns	0.018	0.08
Ala	ns	ns	ns	ns
Mayor.	ns	ns	ns	ns
Minor.	ns	ns	ns	ns
Arom.	ns	ns	ns	ns
Totales	ns	ns	ns	ns
Gly/Ser	ns	ns	ns	ns
Gln/Glu	ns	ns	ns	ns
Asn/Asp	ns	ns	ns	ns

5.c.

	C.T			T.N		
	A	E	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Gly	F	0.888	0.375	0.082		
	I	1.225	0.462			
Gln	F	3.10	2.37	0.492		
	I	4.36	2.91			
Asp	F			3.07	2.67	0.181
	I			2.76	3.06	

5.d.

	C.T.N					
	F			I		
	H	L	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Asp	A	2.95	2.81	3.08	3.15	0.427
	E	3.18	2.53	2.45	2.97	

El análisis de la varianza de los niveles de aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos en la hoja bandera en la emergencia de la espiga del trigo en la presente anualidad, únicamente mostró significación estadística en los efectos principales de los factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno (Tabla 5a), no en las interacciones entre los mismos (Tabla 5b). El crecimiento en CO₂ elevado redujo los niveles foliares tanto de los aminoácidos totales, como de los mayoritarios y minoritarios, pero no alteró el contenido foliar de aminoácidos aromáticos (Tabla 5a). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó la acumulación de aminoácidos totales y mayoritarios, si bien no modificó el contenido de minoritarios y aromáticos (Tabla 5a). Y por último, los niveles de todos ellos aumentaron en plantas crecidas con

abundancia de nitrógeno en comparación con aquellas deficientes en dicho nutriente (Tabla 5a).

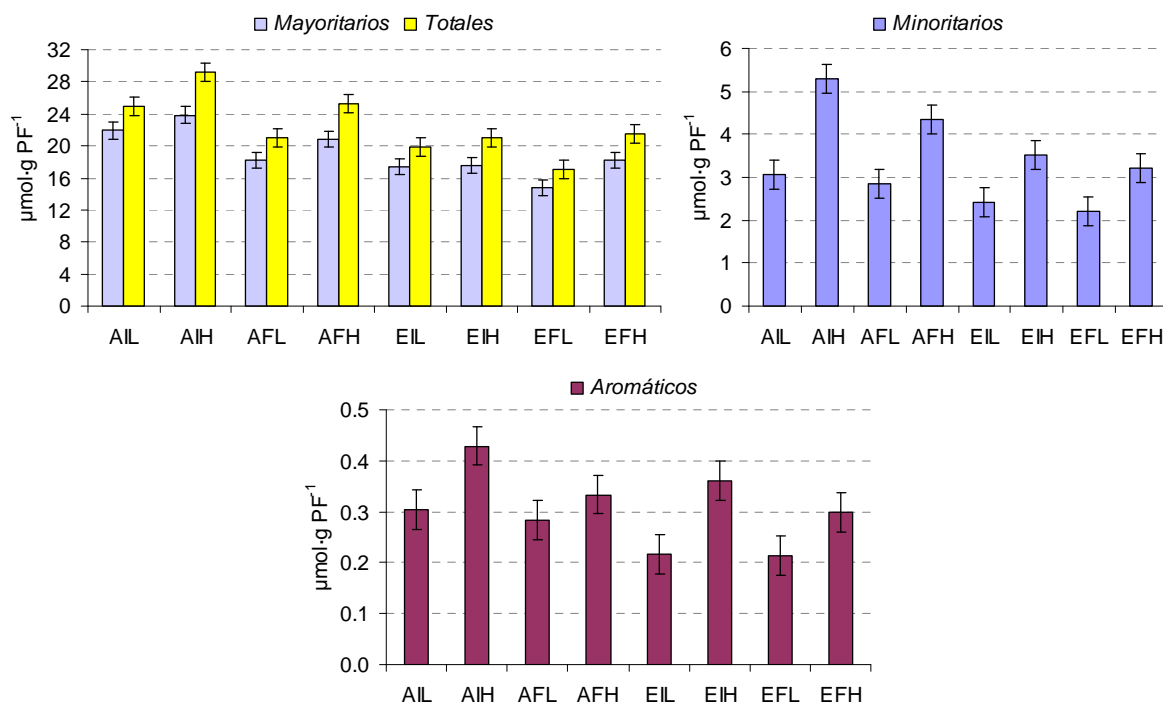


Gráfico 5a. Concentración de los aminoácidos mayoritarios, totales, minoritarios y aromáticos en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

En cuanto a los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente y las razones analizadas, el crecimiento en CO₂ elevado disminuyó significativamente los niveles foliares de Ser y la razón Gly/Ser, a su vez aumentó el contenido de Ala, pero no modificó los niveles de Glu y Asn, ni las razones Gln/Glu y Asn/Asp (Tabla 5a,b). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales redujo los niveles de Asn, Ser y Ala y las razones Gly/Ser, Gln/Glu y Asn/Asp, si bien no tuvo efecto significativo en los contenidos foliares de Glu (Tabla 5a). En plantas crecidas con abundancia de nitrógeno los niveles de Asn, Ser y Gln, así como la razón Asn/Asp, fueron mayores que en aquellas crecidas con deficiencia en dicho nutriente (Tabla 5a). Además, la abundancia de nitrógeno disminuyó la razón Gly/Ser, mientras que la razón Gln/Glu no fue modificada por la disponibilidad de este nutriente (Tabla 5a).

La interacción de los factores experimentales CO₂xT alcanzó significación estadística para la Gln y Gly (Tabla 5b), mostrando que tanto en plantas crecidas a temperaturas ambientales como a temperaturas elevadas, el CO₂ elevado redujo los niveles de Gly; dicha

reducción también tuvo lugar en los niveles de Gln, pero únicamente se observó en plantas crecidas a temperaturas ambientales (Tabla 5c). Además, en plantas crecidas a niveles ambientales de CO₂, la elevación de la temperatura redujo el contenido foliar de Gly; si bien la elevación de la temperatura disminuyó el contenido foliar de Gln, a ambos niveles de CO₂ de crecimiento, siendo más acusado el efecto en plantas crecidas a [CO₂] ambientales.

El Asp mostró una interacción triple significativa CO₂xTxN (Tabla 5b), indicativa de que en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno, la temperatura elevada aumentó el contenido foliar de Asp (Tabla 5d). En CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno incrementó los niveles de Asp en plantas crecidas a temperaturas elevadas, y los disminuyó en aquellas crecidas a temperatura ambientales (Tabla 5d).

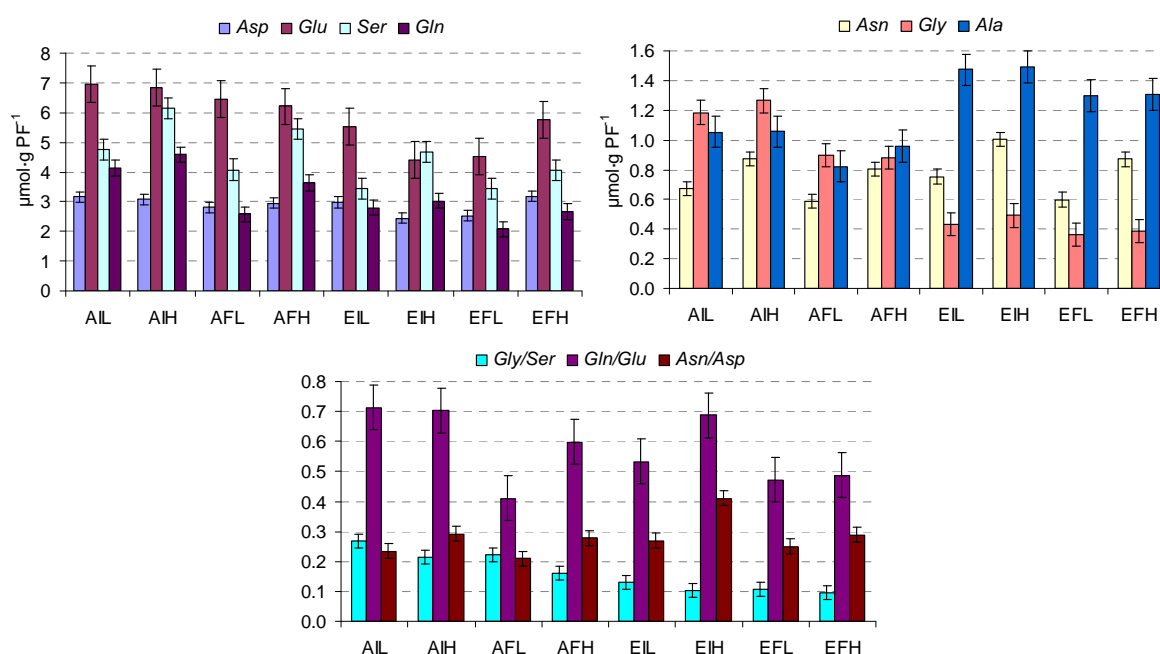


Gráfico 5b. Concentración de los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente (Gln, Glu, Asp, Asn, Ala, Ser y Gly) y las razones Gly/Ser, Gln/Glu y Asn/Asp en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 µmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 µmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.1.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas

(i) *Contenido de nitrato.* El análisis de la varianza de los niveles de nitrato en la hoja bandera del trigo en la emergencia de la espiga mostró una interacción triple significativa de los factores experimentales CO₂xTxN (Tabla 6b), que puso de manifiesto que el CO₂ elevado disminuyó el contenido foliar de nitrato tanto en plantas crecidas con nitrógeno

Resultados

abundante y temperatura elevada como en aquellas crecidas con deficiencia en nitrógeno y temperaturas ambientales (Tabla 6d). En condiciones de CO₂ ambiente, la temperatura elevada incrementó los niveles foliares de nitrato en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno, sin embargo los disminuyó en condiciones de deficiencia de dicho nutriente (Tabla 6d). Finalmente, en plantas crecidas a [CO₂] ambientales y temperatura elevada, la abundancia de nitrógeno aumentó el contenido foliar de nitrato (Tabla 6d).

Tabla 6. Cambios en los niveles de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Datos de nitrato expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$, de clorofila en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de proteínas totales en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

6.a

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
Nitrato	31.25	25.45	0.022	0.882	28.12	28.58	ns	1.772	27.92	28.78	ns	1.772
Clorofila	2.929	2.554	0.079	0.1123	2.760	2.723	ns	0.0695	2.604	2.878	0.002	0.0695
Proteína	52.54	44.04	ns	2.788	48.56	48.01	ns	1.683	46.03	50.55	0.020	1.683

6.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Nitrato	ns	ns	0.065	0.007
Clorofila	ns	0.075	0.047	ns
Proteína	ns	ns	ns	ns

6.c.

	C.N			T.N			
	A	E	s.e.d.	F	I	s.e.d.	
Nitrato	H			30.81	26.75	2.506	
	L			26.35	29.49		
Clorofila	H	3.133	2.624	0.1321	2.783	2.974	0.0983
	L	2.724	2.485		2.663	2.546	

6.d.

	C.T.N					
	F		I		s.e.d.	
	H	L	H	L		
Nitrato	A	38.17	25.7	27.45	33.67	3.544
	E	23.45	27	26.05	25.31	

(ii) *Contenido de clorofila.* Las interacciones CO₂xN y TxN alcanzaron significación estadística en el análisis de los resultados de clorofila (Tabla 6b). La primera de las interacciones, CO₂xN, mostró que el CO₂ elevado disminuyó los niveles foliares de clorofila tanto en condiciones de abundancia en nitrógeno como deficiencia del mismo, ahora bien, ésta reducción fue más acusada en plantas crecidas con nitrógeno abundante (Tabla 6c). En plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂, la abundancia de nitrógeno aumentó los niveles de clorofila (Tabla 6c). La segunda de las interacciones entre los factores experimentales TxN, puso de manifiesto que las temperaturas superiores a las ambientales disminuyeron los niveles de clorofila en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno (Tabla 6c); y en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno aumentó el contenido de clorofila (Tabla 6c).

(iii) *Contenido de proteínas totales.* El crecimiento en CO₂ elevado tendió a disminuir los niveles de proteínas, sin llegar a alcanzar significación estadística, y el crecimiento a temperaturas elevadas no afectó al contenido proteico (Tabla 6a). Sin embargo, en plantas

crecidas con abundancia de nitrógeno el contenido foliar de proteínas fue mayor que en plantas con deficiencia en dicho nutriente (Tabla 6a). Las interacciones entre factores experimentales no alcanzaron significación estadística (Tabla 6 b).

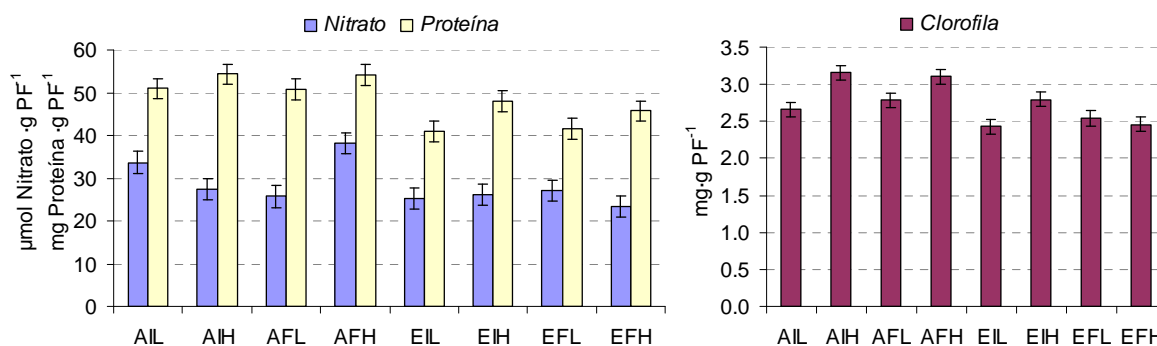


Gráfico 6. Concentración de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.2. Estudio de la hoja bandera del trigo días después de la antesis

4.2.2.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (*rbcS*)

A temperaturas elevadas y abundancia de nitrógeno, el crecimiento en CO₂ elevado redujo notablemente los niveles de transcritos de la Rubisco, mientras que en plantas crecidas con nitrógeno abundante y temperaturas ambientales, el CO₂ elevado disminuyó ligeramente la expresión del enzima (Figura 2).

En plantas deficientes en nitrógeno, a ambas temperaturas de crecimiento, el CO₂ elevado no alteró la expresión del enzima. A niveles ambientales de CO₂, en plantas deficientes en nitrógeno, el incremento de la temperatura de crecimiento aumentó los niveles de transcritos de la subunidad pequeña del enzima, aunque los transcritos no variaron en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno. Sin embargo, en condiciones de CO₂ elevado, en plantas crecidas con nitrógeno abundante, la elevación de la temperatura reprimió la expresión del enzima (Figura 2). Finalmente, en plantas crecidas en CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno redujo los niveles de transcritos de *rbcS* en plantas crecidas a temperaturas elevadas, aunque a temperaturas ambientales no modificó la expresión del enzima. Mientras que en plantas crecidas en CO₂ ambiente, la abundancia de nitrógeno incrementó la expresión de *rbcS* a temperaturas ambientales, y en cambio a temperaturas elevadas la expresión del enzima no fue modificada (Figura 2).

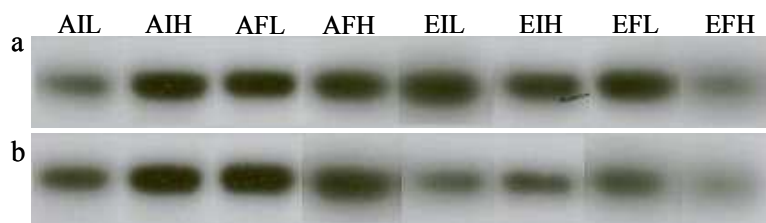


Figura 2. Niveles de ARNm del gen *rbcS* 12 días después de la antesis en la hoja bandera de plantas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, bien a nivel de CO₂ ambiental (A, 370 μmol·mol⁻¹) o elevado (E, 700 μmol·mol⁻¹), temperaturas ambientales (I) o 2 °C superiores (F) y deficiencia (L, 32 kg·ha⁻¹) o abundancia (H, 140 kg·ha⁻¹) de nitrógeno correspondientes a la anualidad 2004. 1ª repetición (a) y 2ª repetición (b). Se aplicaron idénticas cantidades de ARN (15 μg) en cada una de las celdillas; el cargado de muestras fue comprobado por inspección de la señal ARNr (datos no mostrados). La intensidad de la señal indica la abundancia de transcritos relativa al total de ARN.

4.2.2.2. Contenido de carbohidratos

El CO₂ elevado no alteró los niveles foliares de ninguno de los carbohidratos analizados, glucosa, fructosa, sacarosa, almidón y fructanos, en estadios avanzados del desarrollo del cultivo del trigo (Tabla 7a).

Tabla 7. Cambios en los niveles de glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (S), fructanos (Fru) y almidón (A) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 12 días después de la antesis, en el año 2004. Datos expresados en μmoles·g PF⁻¹.

7.a.

	CO ₂		<i>p</i>	s.e.d.	Temperatura		<i>p</i>	s.e.d.	Nitrógeno		<i>p</i>	s.e.d.
	A	E			I	F			L	H		
G	14.09	15.07	ns	2.704	15.14	14.02	ns	2.048	11.93	17.23	0.024	2.048
F	10.22	10.95	ns	1.712	11	10.17	ns	1.35	9.26	11.91	0.073	1.35
S	58.86	49.63	ns	6.449	54.21	54.28	ns	4.754	55.43	53.06	ns	4.754
Fru	30.1	19.1	ns	8.06	32.5	16.6	0.013	5.47	21.7	21.4	ns	5.47
A	5.31	6.67	ns	1.002	6.67	4.73	0.038	0.835	6.37	5.03	ns	0.835

7.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G	ns	ns	ns	ns
F	ns	ns	ns	ns
S	ns	ns	ns	ns
Fru	ns	ns	ns	ns
A	ns	ns	ns	ns

El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó significativamente el contenido foliar de fructanos y almidón, sin afectar a los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa (Tabla 7a). En plantas crecidas con nitrógeno abundante los niveles de las hexosas, glucosa y fructosa, aumentaron significativamente comparadas con aquellas crecidas con deficiencia en nitrógeno, sin embargo, el resto de carbohidratos, sacarosa, fructanos y almidón, no varió (Tabla 7a). Las interacciones entre factores experimentales no alcanzaron significación estadística para los niveles de carbohidratos (Tabla 7b).

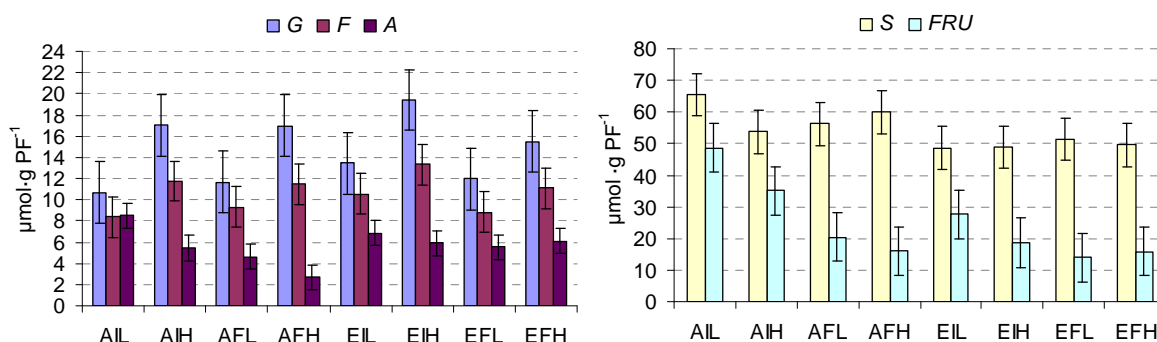


Gráfico 7. Concentración de glucosa (G), fructosa (F), almidón (A), sacarosa (S) y fructanos (Fru) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.2.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P

El crecimiento en CO₂ elevado aumentó la razón G6P/F6P y disminuyó los niveles foliares de F6P, pero no llegó a alterar el contenido del resto de hexosas-P y UDP-glucosa (Tabla 8a). Las temperaturas superiores a las ambientales no afectaron a los niveles de hexosas fosfato y la razón G6P/F6P (Tabla 8b). En plantas crecidas con abundancia de nitrógeno los niveles de G6P y F6P fueron menores que en aquellas crecidas con deficiencia en nitrógeno (Tabla 8a).

Tabla 8. Cambios en los niveles de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 12 días después de la antesis, en el año 2004. Datos expresados en nmoles·g PF⁻¹.

	CO ₂		p	s.e.d.	Temperatura		p	s.e.d.	Nitrógeno		p	s.e.d.
	A	E			I	F			L	H		
G6P	61.2	59.5	ns	6.31	62.1	58.7	ns	4.22	64.4	56.4	0.083	4.22
G1P	6.92	6.7	ns	1.027	6.64	6.98	ns	0.663	6.90	6.72	ns	0.663
F6P	67.1	48.9	0.047	4.11	59.7	56.3	ns	4.05	62	54	0.072	4.05
UDP-Glucosa	14.68	15.77	ns	1.839	14.4	16.05	ns	1.98	13.69	16.76	ns	1.98
G6P/F6P	0.942	1.281	0.038	0.068	1.097	1.126	ns	0.106	1.136	1.087	ns	0.106

8.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G6P	ns	ns	ns	ns
G1P	ns	ns	ns	ns
F6P	ns	ns	ns	ns
UDP-Glucosa	ns	ns	0.068	ns
G6P/F6P	ns	ns	0.061	ns

8.c.

	T.N		
	H	L	s.e.d.
UDP-Glucosa	F 19.58	12.53	2.801
	I 13.95	14.84	
G6P/F6P	F 0.991	1.260	0.149
	I 1.182	1.013	

Los niveles de UDP-glucosa mostraron una interacción significativa TxN (Tabla 8b), indicativa de que la elevación de la temperatura incrementó el contenido de UDP-glucosa en plantas crecidas con abundante nitrógeno (Tabla 8c); y la abundancia de nitrógeno también aumentó los niveles de UDP-glucosa en plantas crecidas a temperaturas elevadas

(Tabla 8c). Por último, la interacción TxN fue también significativa para la razón G6P/F6P (Tabla 8b), poniendo de manifiesto que la abundancia de nitrógeno disminuyó dicha razón en plantas crecidas a temperaturas elevadas (Tabla 8c).

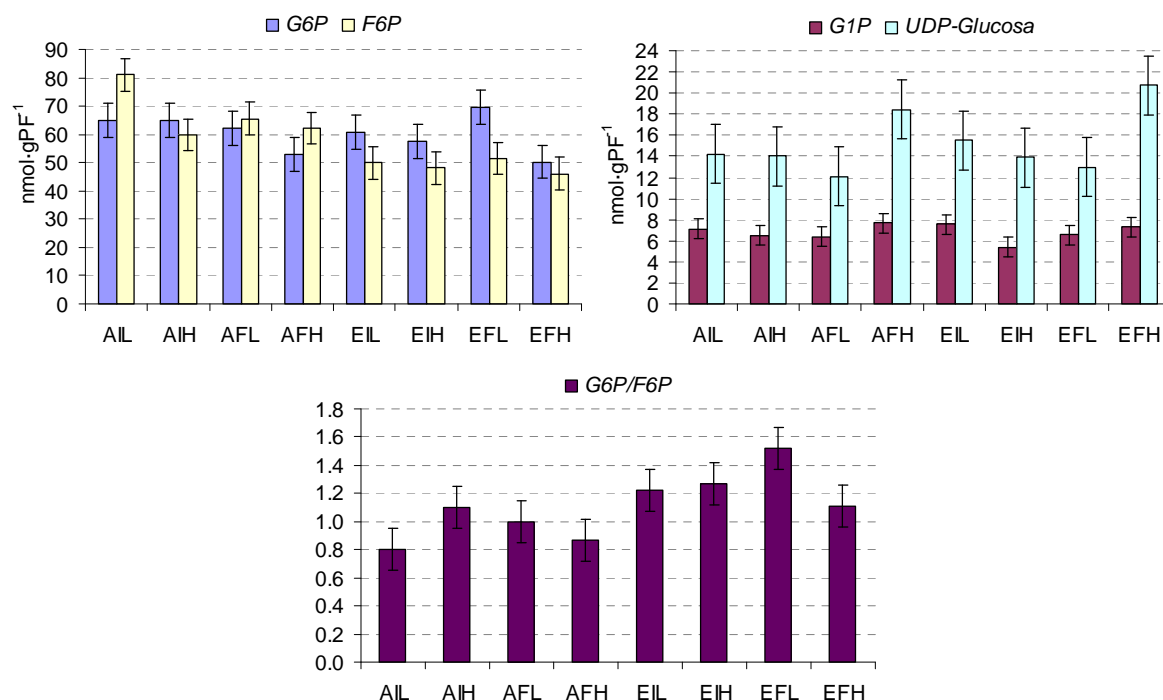


Gráfico 8. Concentración de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.2.4. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos

En estadios posteriores del desarrollo de los cultivos de trigo en el campo, 12 días después de la antesis, ni el CO₂ de crecimiento, ni la temperatura o la disponibilidad de nitrógeno modificaron los niveles foliares de 3PGA, ATP y malato (Tabla 9a). Sin embargo, hubo una interacción significativa entre los factores experimentales CO₂xTxN (Tabla 9b) en el análisis de los datos de 2-OG, que puso de manifiesto que el CO₂ de crecimiento no tuvo efecto sobre el contenido de 2-OG (Tabla 9d); si bien, en plantas crecidas en CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno, la temperatura elevada aumentó los niveles foliares de 2-OG (Tabla 9d); y en plantas crecidas en condiciones de CO₂ y temperatura elevados, la abundancia de nitrógeno redujo el contenido foliar de dicho ácido orgánico (Tabla 9d).

Tabla 9. Cambios en los niveles de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 12 días después de la antesis, en el año 2004. Datos de 3PGA expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}\cdot 10^{-1}$, de ATP y 2-OG expresados en $\text{nmoles}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de malato en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

9.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
3PGA	6.82	5.27	ns	0.814	6	6.08	ns	0.93	5.79	6.3	ns	0.93
ATP	37.2	45	ns	4.01	41.7	40.5	ns	7.36	41.7	40.5	ns	7.36
2-OG	84.9	86.1	ns	5.22	82.4	88.6	ns	7.32	86.4	84.6	ns	7.32
Malato	24.16	21.89	ns	2.96	22.79	23.27	ns	1.603	21.86	24.19	ns	1.603

9.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
3PGA	ns	ns	ns	ns
ATP	ns	ns	ns	ns
2-OG	ns	ns	0.058	0.050
Malato	ns	ns	ns	ns

9.c.

	T.N		
	H	L	s.e.d.
2-OG	F 80	97.2	10.32
	I 89.1	75.6	

9.d.

	C.T.N				
	F		I		s.e.d.
	H	L	H	L	
2-OG	A 90.7	84.8	84.4	79.7	14.63
	E 69.3	109.6	93.9	71.5	

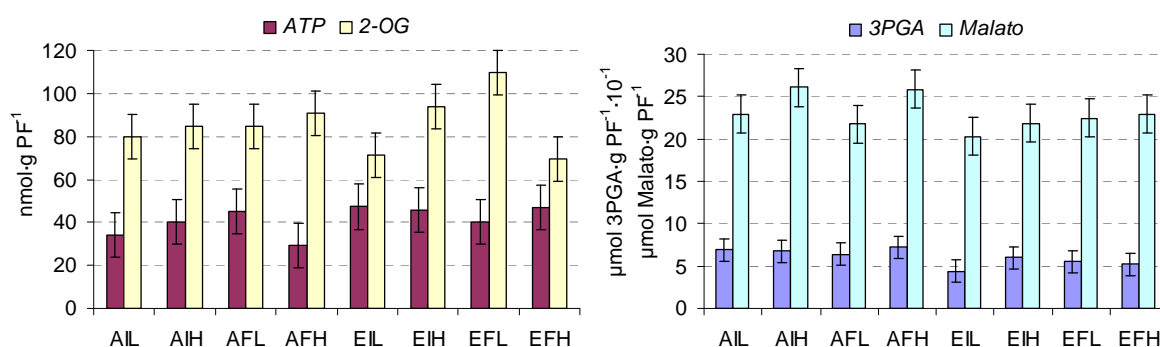


Gráfico 9. Concentración de los intermediarios fosforilados (3-PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.2.5. Actividad nitrato reductasa

Ninguno de los factores experimentales -CO₂, temperatura y nitrógeno- modificó el estado de activación del enzima (Tabla 10a,b). La temperatura de crecimiento tampoco produjo cambios de actividad NR (Tabla 10a), sin embargo, mostró una interacción significativa CO₂xN (Tabla 10b), indicativa de que el CO₂ elevado aumentó la actividad NR en plantas deficientes en nitrógeno, y la disminuyó en plantas con nitrógeno abundante (Tabla 10c); y en condiciones ambientales de CO₂, la abundancia de nitrógeno incrementó la actividad NR (Tabla 10c).

Resultados

Tabla 10. Variaciones en la actividad nitrato reductasa máxima (NR) y su estado de activación (Activación) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 12 días después de la antesis, en el año 2004. Datos de la actividad NR expresados en $\mu\text{mol NO}_2\text{-g PF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y del estado de activación en %.

10.a.

	CO ₂		p	s.e.d.	Temperatura		p	s.e.d.	Nitrógeno		p	s.e.d.
	A	E			I	F			L	H		
NR	7.49	7.64	ns	0.532	8.04	7.09	ns	0.843	7.50	7.64	ns	0.843
Activación	65	72.4	ns	10.65	65.5	71.9	ns	6.98	67.2	70.2	ns	6.98

10.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
NR	ns	0.024	ns	ns
Activación	ns	ns	ns	ns

10.c.

	C.N		
	H	L	s.e.d.
NR	A 8.65	6.34	1.192
	E 6.63	8.66	

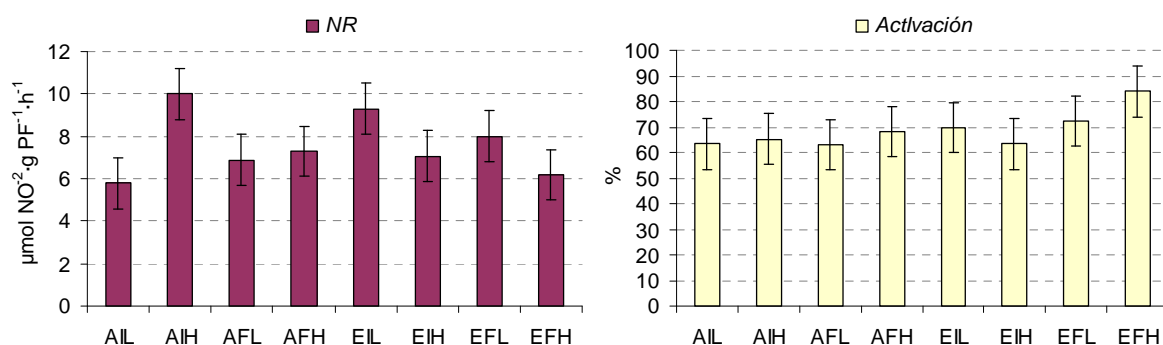


Gráfico 10. Actividad y estado de activación de la nitrato reductasa en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.2.2.6. Contenido de aminoácidos

Los niveles foliares de aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos mostraron varias interacciones significativas entre los factores experimentales (Tabla 11b). La interacción CO₂xT alcanzó significación para los aminoácidos totales, mayoritarios y minoritarios (Tabla 11b), poniendo de manifiesto que el CO₂ elevado condujo a un descenso del contenido foliar de aminoácidos mayoritarios y minoritarios, únicamente, a temperaturas ambientales; mientras que los aminoácidos totales disminuyeron en plantas crecidas a ambas temperaturas, aunque la reducción fue más acentuada a temperaturas ambientales (Tabla 11c). En plantas crecidas a niveles ambientales de CO₂, la elevación de la temperatura disminuyó también el contenido foliar de los aminoácidos totales, mayoritarios y minoritarios (Tabla 11c).

Tabla 11. Cambios en los niveles de aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos, en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 12 días después de la antesis, en el año 2004. Datos expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}$.

11.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
Gly	1.163	0.544	0.006	0.047	0.907	0.800	ns	0.085	0.845	0.862	ns	0.085
Ser	4.088	2.398	0.017	0.226	3.617	2.869	0.003	0.198	3.195	3.290	ns	0.198
Gln	1.91	1.13	0.061	0.202	1.77	1.27	0.008	0.158	1.28	1.76	0.011	0.158
Glu	6.213	4.996	0.056	0.3	5.880	5.329	0.085	0.294	5.744	5.464	ns	0.294
Asn	0.299	0.255	ns	0.0249	0.322	0.232	0.039	0.039	0.235	0.318	0.054	0.039
Asp	2.136	2.298	ns	0.124	2.273	2.161	ns	0.179	2.225	2.209	ns	0.179
Ala	0.685	0.972	0.028	0.049	0.845	0.812	ns	0.106	0.849	0.808	ns	0.106
Mayor.	16.49	12.59	0.051	0.913	15.62	13.47	0.024	0.828	14.38	14.71	ns	0.828
Minor.	4.92	2.95	0.053	0.471	4.46	3.41	0.012	0.357	2.83	5.05	<0.001	0.357
Arom.	0.505	0.253	0.08	0.076	0.421	0.337	ns	0.068	0.282	0.476	0.014	0.068
Totales	21.42	15.54	0.006	0.442	20.08	16.88	0.006	0.955	17.2	19.76	0.020	0.955
Gly/Ser	0.303	0.249	ns	0.026	0.260	0.292	ns	0.031	0.274	0.277	ns	0.031
Gln/Glu	0.303	0.229	0.025	0.012	0.294	0.237	0.016	0.021	0.222	0.309	0.001	0.021
Asn/Asp	0.136	0.111	0.076	0.007	0.141	0.106	0.040	0.015	0.106	0.141	0.038	0.015

11.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Gly	ns	ns	ns	ns
Ser	0.042	ns	ns	ns
Gln	0.012	0.031	0.033	ns
Glu	ns	ns	ns	ns
Asn	0.058	ns	ns	ns
Asp	ns	ns	ns	ns
Ala	ns	ns	ns	ns
Mayor.	0.072	ns	ns	ns
Minor.	0.037	0.004	ns	ns
Arom.	ns	0.060	ns	ns
Totales	0.024	0.058	ns	ns
Gly/Ser	ns	ns	ns	ns
Gln/Glu	0.018	0.020	0.032	ns
Asn/Asp	0.086	ns	ns	ns

11.c.

	C.T			C.N			T.N		
	F	I	s.e.d.	H	L	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Ser	A 3.489	4.687	0.300						
	E 2.248	2.547							
Gln	A 1.42	2.40	0.256	2.34	1.48	0.256	F 1.32	1.22	0.223
	E 1.11	1.15		1.18	1.09		I 2.2	1.35	
Asn	A 0.213	0.385	0.055						
	E 0.25	0.259							
Mayor.	A 14.6	18.38	1.233						
	E 12.34	12.85							
Minor.	A 3.98	5.87	0.591	6.67	3.17	0.591			
	E 2.84	3.06		3.42	2.48				
Arom.	A			0.672	0.339	0.102			
	E			0.279	0.226				
Totales	A 18.58	24.25	1.351	23.69	19.14	1.351			
	E 15.18	15.91		15.82	15.27				
Gln/Glu	A 0.246	0.36	0.029	0.374	0.232	0.291	F 0.255	0.219	0.038
	E 0.228	0.229		0.245	0.213		I 0.363	0.226	
Asn/Asp	A 0.105	0.168	0.021						
	E 0.108	0.114							

La interacción CO₂xN alcanzó significación estadística en el análisis de los resultados de aminoácidos totales, minoritarios y aromáticos, sin afectar a los mayoritarios (Tabla 11c). En ésta interacción se observó que en plantas con nitrógeno abundante, el CO₂ elevado disminuyó el contenido foliar de aminoácidos minoritarios y aromáticos; mientras que los totales disminuyeron tanto en plantas crecidas en abundancia como deficiencia de nitrógeno, siendo esta reducción más acusada en condiciones de nitrógeno abundante (Tabla 11c). En plantas crecidas en condiciones de CO₂ ambiente, la abundancia de nitrógeno incrementó los niveles de aminoácidos totales y aromáticos; mientras que los minoritarios aumentaron tanto a niveles de CO₂ ambientales como elevados (Tabla 11c).

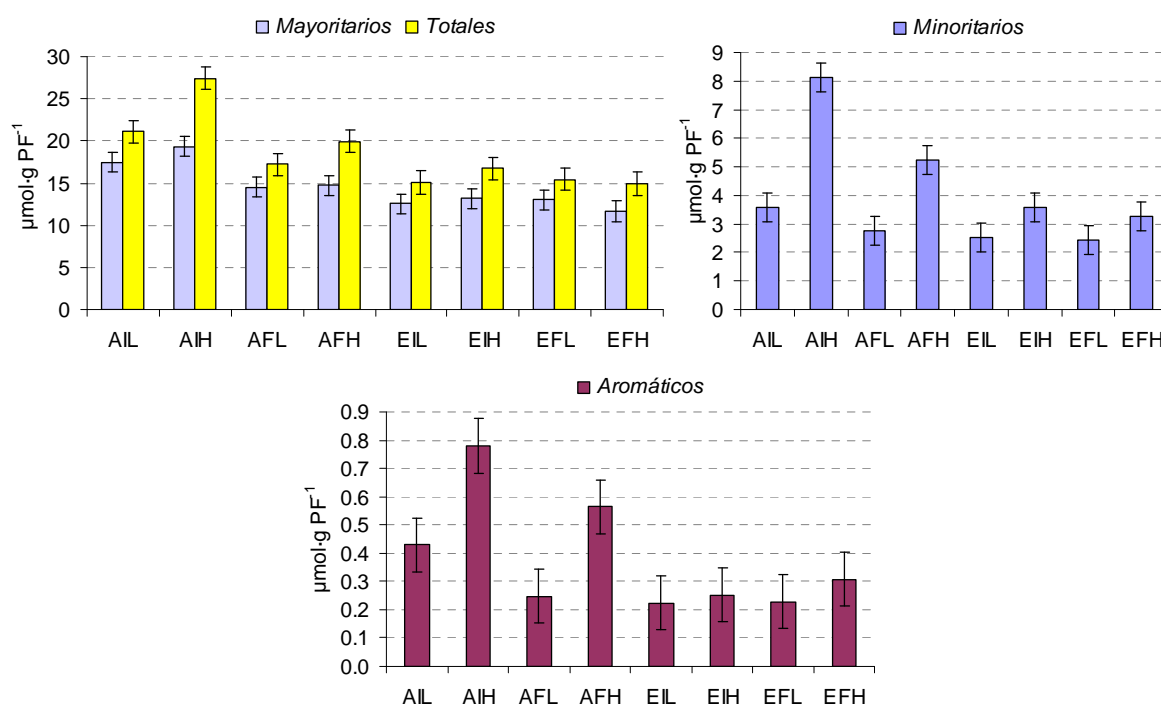


Gráfico 11a. Concentración de los aminoácidos mayoritarios, totales, minoritarios y aromáticos en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

En referencia a los aminoácidos mayoritarios, considerados individualmente y a las razones analizadas, ninguno de los factores experimentales ni sus interacciones afectaron al contenido foliar de Asp, ni a la razón Gly/Ser (Tabla 11a,b). El crecimiento en CO₂ elevado redujo notablemente los niveles de Gly, hasta un 50%, y los de Glu, mientras que aumentó los niveles de Ala. El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó ligeramente los niveles de Glu. Y la abundancia de nitrógeno aumentó el contenido foliar de Asn (Tabla 11a).

La interacción $\text{CO}_2 \times \text{T}$ alcanzó significación estadística para los aminoácidos Asn, Ser y Gln, así como las razones Gln/Glu y Asn/Asp (Tabla 11b). A temperaturas ambientales de crecimiento, el CO_2 elevado condujo a un descenso de las razones Gln/Glu y Asn/Asp y de los niveles de Asn y Gln; mientras que los niveles de Ser disminuyeron tanto en plantas crecidas a temperaturas ambientales como aquellas crecidas a temperaturas elevadas, siendo el descenso más acusado en condiciones de temperaturas ambientales (Tabla 11c). En plantas crecidas en condiciones de CO_2 ambiente, la temperatura elevada disminuyó significativamente los niveles foliares de Asn, Ser y Gln, además de las razones Gln/Glu y Asn/Asp (Tabla 11c).

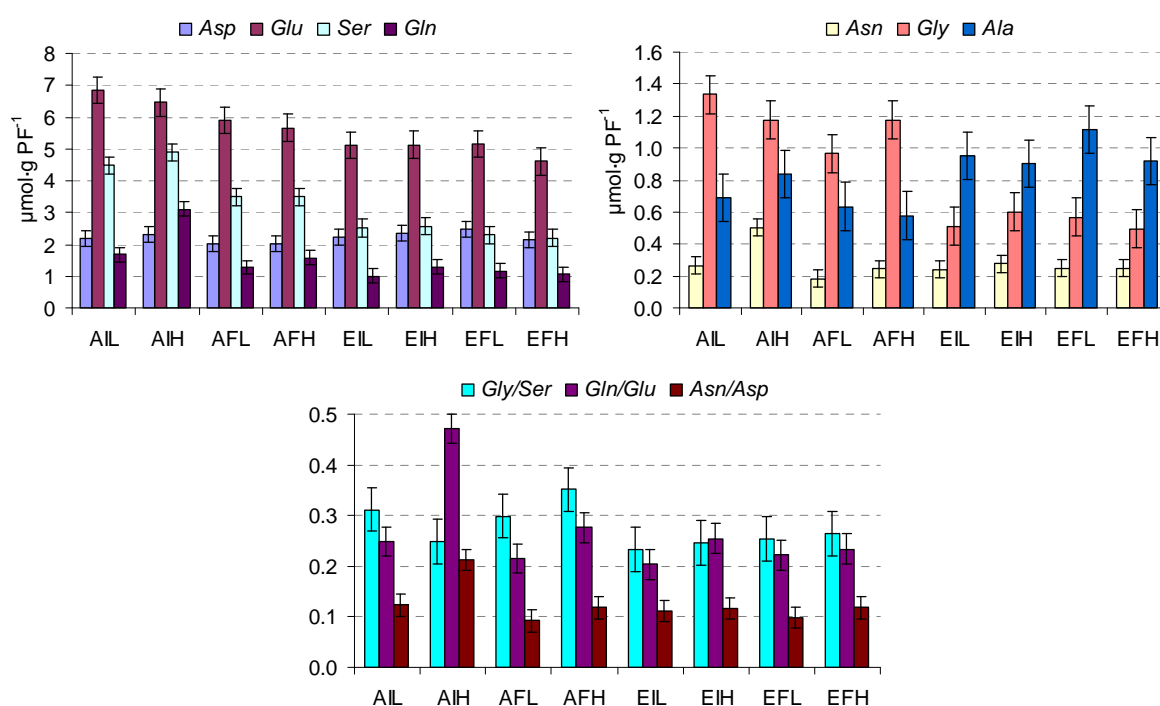


Gráfico 11b. Concentración de los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente (Gln, Glu, Asp, Asn, Ala, Ser y Gly) y las razones Gly/Ser, Gln/Glu y Asn/Asp en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO_2 (ambiente, A, $370 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; $2 \text{ }^\circ\text{C}$ superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, $32 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, $140 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos ($\text{CO}_2 \times \text{T} \times \text{N}$).

En cuanto al contenido foliar de Gln y la razón Gln/Glu, alcanzaron significación estadística las interacciones $\text{CO}_2 \times \text{N}$ y $\text{T} \times \text{N}$ (Tabla 11b). La primera de las interacciones, puso de manifiesto que el CO_2 elevado redujo los niveles de Gln y la razón Gln/Glu en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno (Tabla 11c). Mientras que en plantas crecidas con niveles de CO_2 ambientales, la abundancia de nitrógeno aumentó los niveles de éste aminoácido y de la razón Gln/Glu (Tabla 11c). La segunda de las interacciones, $\text{T} \times \text{N}$, mostró que en plantas crecidas con nitrógeno abundante, la temperatura elevada disminuyó

Resultados

el contenido foliar de Gln y la razón Gln/Glu; y en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno aumentó tanto los niveles de Gln como la razón Gln/Glu (Tabla 11c).

4.2.2.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas

(i) *Contenido de nitrato.* El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó los niveles foliares de nitrato (Tabla 12a). La interacción CO₂xN mostró significación estadística (Tabla 12b), observándose que en plantas crecidas con nitrógeno abundante, el CO₂ elevado disminuyó los niveles de nitrato (Tabla 12c); y la abundancia de nitrógeno los incrementó en [CO₂] ambientales (Tabla 12c).

Tabla 12. Cambios en los niveles de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 12 días después de la antesis, en el año 2004. Datos de nitrato expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$, de clorofila en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de proteínas totales en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

12.a.

	CO ₂		p	s.e.d.	Temperatura		p	s.e.d.	Nitrógeno		p	s.e.d.
	A	E			I	F			L	H		
Nitrato	25.22	22.21	ns	1.351	25.27	22.17	0.005	0.917	21.96	25.48	0.002	0.917
Clorofila	2.661	2.528	ns	0.098	2.611	2.578	ns	0.061	2.631	2.559	ns	0.061
Proteínas	39.31	33.88	0.001	0.190	37.81	35.38	0.070	1.227	37.65	35.54	ns	1.227

12.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Nitrato	ns	0.001	ns	ns
Clorofila	0.062	ns	ns	ns
Proteínas	ns	ns	ns	0.084

12.c.

	C.T			C.N		
	F	I	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Clorofila	A 2.581	2.741	0.1159			
	E 2.574	2.482				
Nitrato	A			28.95	21.50	1.633
	E			22.02	22.41	

12.d.

C.T.N					
F		I		s.e.d.	
	H	L	H	L	s.e.d.
Proteínas	A 39.18	37.01	39.55	41.48	2.455
	E 29.2	36.11	34.23	35.99	

(ii) *Contenido de clorofila.* En estadios avanzados del desarrollo del cultivo de trigo, 12 días después de la antesis, los niveles foliares de clorofila no variaron en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno (Tabla 12a); sin embargo, la interacción CO₂xT alcanzó significación estadística (Tabla 12b), poniendo de manifiesto que la temperatura elevada redujo el contenido de clorofila en plantas crecidas en condiciones ambientales de CO₂ (Tabla 12c).

(iii) *Contenido de proteínas totales.* En el análisis de la varianza, la interacción triple CO₂xTxN alcanzó significación estadística (Tabla 12b), mostrando que a temperaturas superiores a las ambientales, el CO₂ elevado redujo los niveles foliares de proteína en plantas crecidas con abundancia en nitrógeno; mientras que a temperaturas ambientales,

dicho efecto tuvo lugar tanto en plantas crecidas con abundancia como en deficiencia de nitrógeno (Tabla 12d). La elevación de la temperatura disminuyó el contenido de proteínas tanto en plantas crecidas en CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno como aquellas crecidas en CO₂ ambiente y deficiencia en nitrógeno (Tabla 12d). En condiciones de CO₂ y temperatura elevados, la abundancia de nitrógeno redujo los niveles de proteínas comparada con la deficiencia en dicho nutriente (Tabla 12d).

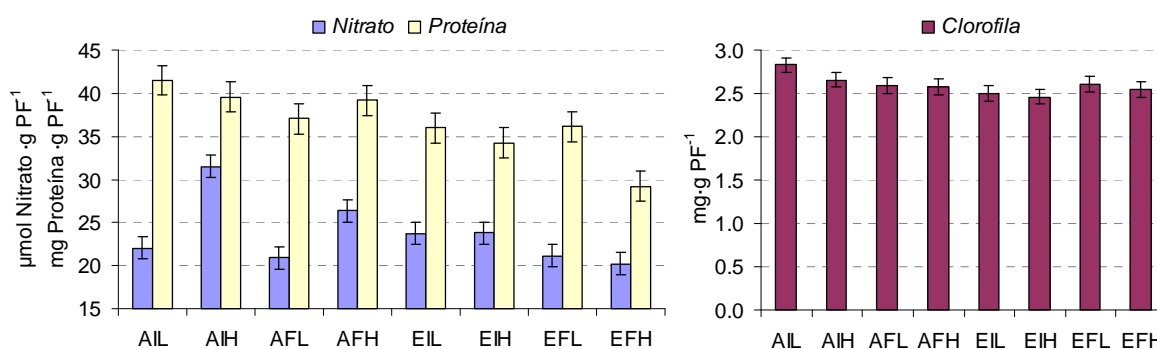


Gráfico 12. Concentración de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 µmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 µmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I, 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 32 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas 12 días después de la antesis, en el año 2004. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3. Experimento de campo correspondiente a la anualidad 2006

4.3.1. Estudio de la hoja bandera del trigo en la emergencia de la espiga

4.3.1.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (*rbcS*)

Se ha encontrado cierta variabilidad en la abundancia de transcritos de *rbcS* entre las repeticiones analizadas, por lo que únicamente se considerarán aquellos cambios de expresión que resulten de variaciones significativas en los niveles de transcritos de *rbcS* entre los factores experimentales.

El CO₂ elevado aumentó los niveles de transcritos de la Rubisco en plantas crecidas a temperaturas elevadas y abundancia de nitrógeno (Figura 3). A concentraciones ambientales de CO₂ y deficiencia en nitrógeno, la elevación de la temperatura redujo la abundancia de transcritos de *rbcS*. Y en CO₂ ambiente, la abundancia de nitrógeno disminuyó dichos transcritos tanto en plantas crecidas a temperaturas ambientales como a temperaturas elevadas (Figura 3).

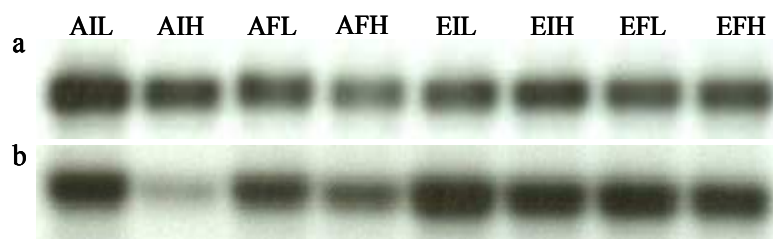


Figura 3. Niveles de ARNm del gen *rbcS* en la emergencia de la espiga en la hoja bandera de plantas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, bien a nivel de CO₂ ambiental (A, 370 μmol·mol⁻¹) o elevado (E, 700 μmol·mol⁻¹), temperaturas ambientales (I) o 2 °C superiores (F) y deficiencia (L, 15 kg·ha⁻¹) o abundancia (H, 140 kg·ha⁻¹) de nitrógeno correspondientes a la anualidad 2006. 1ª repetición (a) y 2ª repetición (b). Se aplicaron idénticas cantidades de ARN (15 μg) en cada una de las celdillas; el cargado de muestras fue comprobado por inspección de la señal ARNr (datos no mostrados). La intensidad de la señal indica la abundancia de transcritos relativa al total de ARN.

4.3.1.2. Contenido de carbohidratos

En referencia a los efectos principales, el crecimiento en CO₂ elevado incrementó los niveles foliares de fructanos, sin afectar al contenido de sacarosa. El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó la acumulación de sacarosa, y no alteró los niveles de fructanos y almidón (Tabla 13a). La abundancia de nitrógeno no modificó el contenido de sacarosa y fructanos (Tabla 13a).

Tabla 13. Cambios en los niveles de glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (S), fructanos (Fru) y almidón (A) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga en el año 2006. Datos expresados en μmoles·g PF⁻¹.

13.a.

	CO ₂		p	s.e.d.	Temperatura		p	s.e.d.	Nitrógeno		p	s.e.d.
	A	E			I	F			L	H		
G	11.04	8.23	ns	1.491	11.06	8.21	0.063	1.389	7.41	11.85	0.008	1.389
F	14.16	13.35	ns	1.303	15.69	11.82	ns	2.203	10.99	16.52	0.027	2.203
S	47.14	49.98	ns	4.388	51.84	45.28	0.036	2.784	47.41	49.71	ns	2.784
Fru	44.2	79.9	0.078	10.62	65.6	58.5	ns	16.53	71.4	52.7	ns	16.53
A	1.62	9.09	ns	3.216	6.00	4.71	ns	2.176	8.33	2.38	0.018	2.176

13.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G	0.035	0.054	0.027	ns
F	0.065	ns	0.033	ns
S	ns	ns	ns	ns
Fru	ns	ns	ns	ns
A	ns	0.086	ns	ns

13.c.

	C.T			C.N			T.N				
	F	I	s.e.d.	H	L	s.e.d.	H	L	s.e.d.		
G	A	7.97	14.11	2.038	14.74	7.34	2.038	F	8.67	7.74	1.965
	E	8.45	8.00		8.96	7.49		I	15.03	7.09	
F	A	9.99	18.33	3.116				F	11.94	11.71	3.116
	E	13.66	13.05					I	21.10	10.28	
A	A				0.68	2.56	3.883				
	E				4.07	14.1					

Los niveles de glucosa y fructosa mostraron interacciones CO₂xT y TxN significativas (Tabla 13b). La interacción CO₂xT puso de manifiesto que a temperaturas ambientales, el

CO₂ elevado disminuyó notablemente el contenido de estas hexosas en la hoja bandera del trigo (Tabla 13c). Y a [CO₂] ambientales, las temperaturas superiores a las ambientales redujeron los niveles foliares de glucosa y fructosa (Tabla 13c). La interacción TxN, por su parte, mostró que en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno, la temperatura elevada redujo sustancialmente el contenido de glucosa y fructosa (Tabla 13c). Y además a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno aumentó los niveles foliares de las citadas hexosas (Tabla 13c). A su vez, la glucosa mostró una interacción significativa CO₂xN (Tabla 13b), indicativa de que en plantas crecidas en abundancia de nitrógeno, el CO₂ elevado disminuyó su contenido foliar (Tabla 13c); y en condiciones ambientales de CO₂, los niveles de glucosa se duplicaron en plantas crecidas con nitrógeno abundante comparadas con aquellas deficientes en dicho nutriente (Tabla 13c).

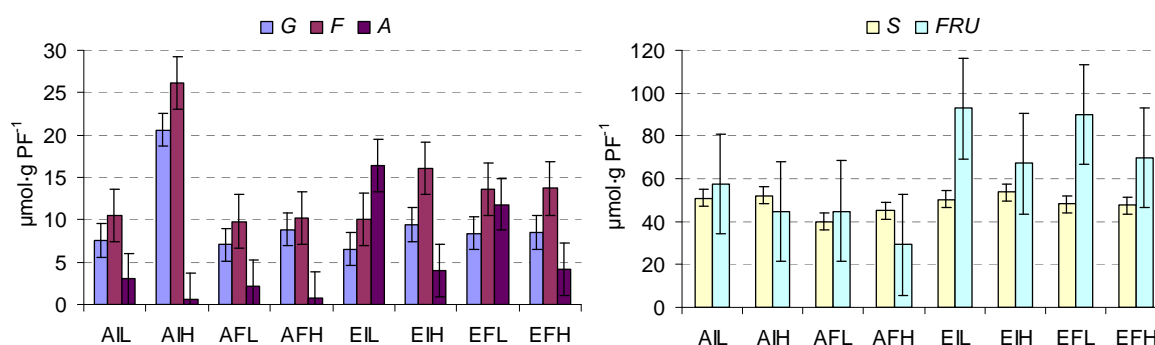


Gráfico 13. Concentración de glucosa (G), fructosa (F), almidón (A), sacarosa (S) y fructanos (Fru) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

Por último, la interacción del CO₂ de crecimiento con el aporte de nitrógeno al cultivo, CO₂xN, también alcanzó significación estadística para el contenido de almidón (Tabla 13b), mostrando que en plantas deficientes en nitrógeno, el CO₂ elevado aumentó en más de cuatro veces su contenido foliar (Tabla 13c); y en condiciones de CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno redujo hasta tres veces los niveles de almidón (Tabla 13c).

4.3.1.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P

El CO₂ y la temperatura de crecimiento no modificaron significativamente los niveles de hexosas fosfato -G6P, G1P y F6P-, UDP-glucosa y la razón G6P/F6P (Tabla 14a); sin embargo, la abundancia de nitrógeno disminuyó significativamente los niveles de las hexosas-P, aumentó la razón G6P/F6P, pero no afectó al contenido foliar de UDP-glucosa

Resultados

(Tabla 14a). Las interacciones entre los factores experimentales no alcanzaron significación estadística (Tabla 14b).

Tabla 14. Cambios en los niveles de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga en el año 2006. Datos expresados en nmol·g PF⁻¹.

14.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
G6P	81.7	87.2	ns	6.19	79.8	89.1	ns	6.54	92.7	76.2	0.027	6.54
G1P	11.99	12.20	ns	0.81	11.66	12.53	ns	0.833	13.83	10.37	0.001	0.833
F6P	95.2	103.4	ns	7.64	97.8	100.8	ns	6.54	113.7	84.9	<0.001	6.54
UDP-Glucosa	65.3	71.3	ns	18.28	75.5	61.1	ns	10.58	73.0	63.6	ns	10.58
G6P/F6P	0.878	0.867	ns	0.019	0.845	0.900	ns	0.042	0.822	0.923	0.032	0.042

14.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G6P	ns	ns	ns	ns
G1P	ns	ns	ns	ns
F6P	ns	ns	ns	ns
UDP-Glucosa	ns	ns	ns	ns
G6P/F6P	ns	ns	ns	ns

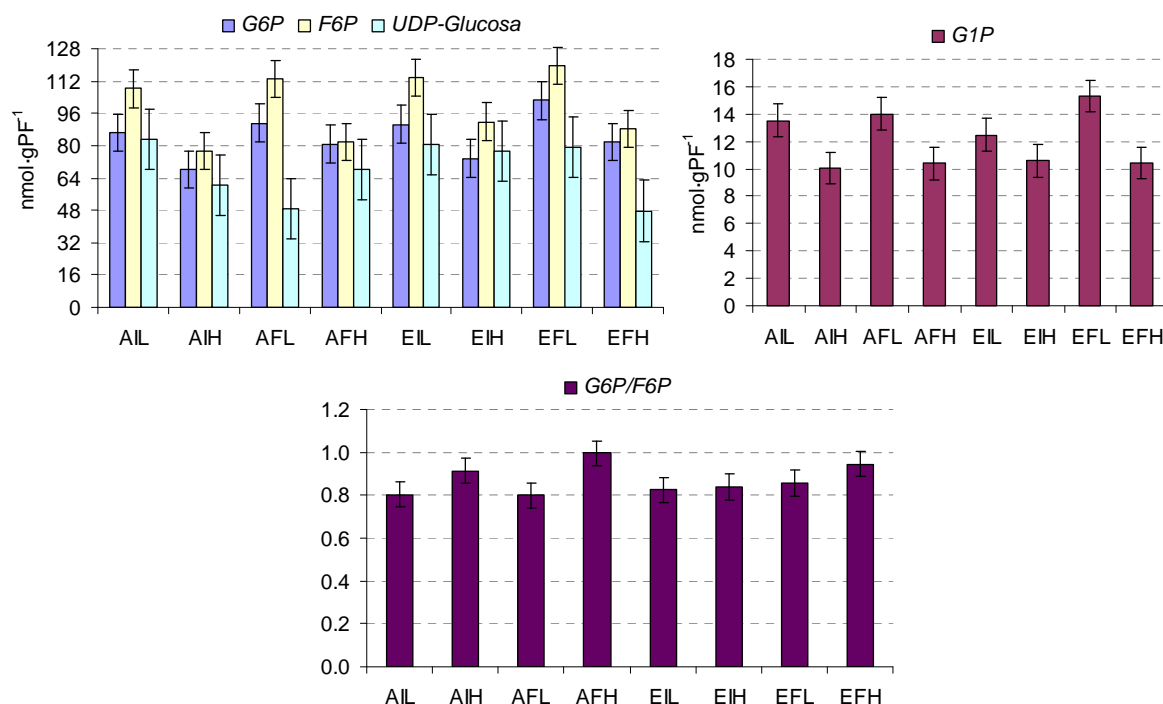


Gráfico 14. Concentración de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.1.5. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos

Los niveles foliares de ATP no fueron modificados con el CO₂ de crecimiento, la temperatura o la adición de nitrógeno al suelo (Tabla 15a); sin embargo, el crecimiento en

CO₂ elevado disminuyó el contenido foliar de 3PGA; la temperatura elevada aumentó los niveles de malato; y la abundancia de nitrógeno redujo el contenido foliar de 2-OG (Tabla 15a). Ninguno de los metabolitos analizados -3PGA, ATP, 2-OG y malato- mostraron interacciones significativas entre los factores experimentales (Tabla 15b).

Tabla 15. Cambios en los niveles de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga en el año 2006. Datos de 3PGA expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}\cdot 10^{-1}$, de ATP y 2-OG en $\text{nmoles}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de malato en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

15.a.

	CO ₂			Temperatura				Nitrógeno				
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
3PGA	9.47	8.60	0.073	0.248	9.21	8.86	ns	0.724	9.21	8.95	ns	0.724
ATP	41.2	42.4	ns	17.71	47.4	36.2	ns	9.11	45.9	37.7	ns	9.11
2-OG	68.6	55.2	ns	5.55	61.7	62.1	ns	4.23	67.1	56.8	0.031	4.23
Malato	18.36	14.20	ns	4.627	14.32	18.16	0.056	1.811	15.47	17.01	ns	1.811

15.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
3PGA	ns	ns	ns	ns
ATP	ns	ns	ns	ns
2-OG	ns	ns	ns	ns
Malato	ns	ns	ns	ns

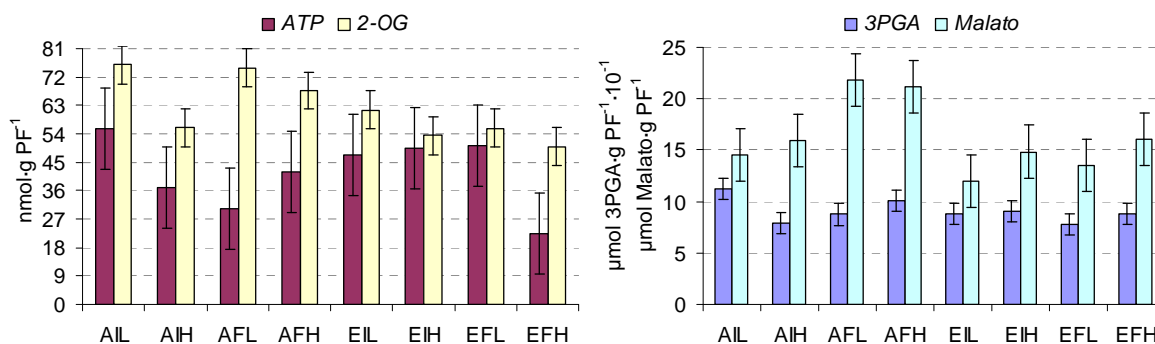


Gráfico 15. Concentración de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.1.5. Actividad nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa no varió con el efecto del nitrógeno (Tabla 16a), sin embargo, la interacción CO₂xT alcanzó significación estadística para dicha actividad (Tabla 16b). Ésta interacción puso de manifiesto que el CO₂ elevado aumentó la actividad NR en condiciones de temperaturas ambientales (Tabla 16c); y en plantas crecidas en CO₂ elevado, el incremento de la temperatura la disminuyó (Tabla 16c). Las interacciones CO₂xT y TxN sobre el estado de activación de la NR alcanzaron significación estadística (Tabla 16b). La interacción CO₂xT fue indicativa de que en plantas crecidas a temperaturas

Resultados

elevadas de crecimiento, el CO₂ elevado disminuyó el estado de activación del enzima (Tabla 16c); y en plantas crecidas en CO₂ elevado, la elevación de la temperatura también lo disminuyó. Por último, la interacción TxN mostró que en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno disminuyó el estado de activación de la NR (Tabla 16c); y en plantas deficientes en nitrógeno, la temperatura elevada redujo el estado de activación del enzima (Tabla 16c).

Tabla 16. Variaciones en la actividad nitrato reductasa máxima (NR) y su estado de activación (Activación) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Datos de la actividad NR expresados en $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g} \cdot \text{PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y del estado de activación en %.

16.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
NR	4.94	5.92	ns	0.532	5.72	5.13	ns	0.478	5.09	5.76	ns	0.478
Activación	72.7	67.8	ns	3.83	72.3	68.2	ns	3.65	74.8	65.7	0.029	3.65

16.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
NR	0.063	ns	ns	ns
Activación	0.014	ns	0.065	ns

16.c.

	C.T			T.N		
	A	E	s.e.d.	H	L	s.e.d.
NR	F 5.13	5.13	0.715			
	I 4.74	6.70				
Activación	F 75.9	60.5	5.29	67.4	69.0	5.16
	I 69.5	75.1		64.1	80.5	

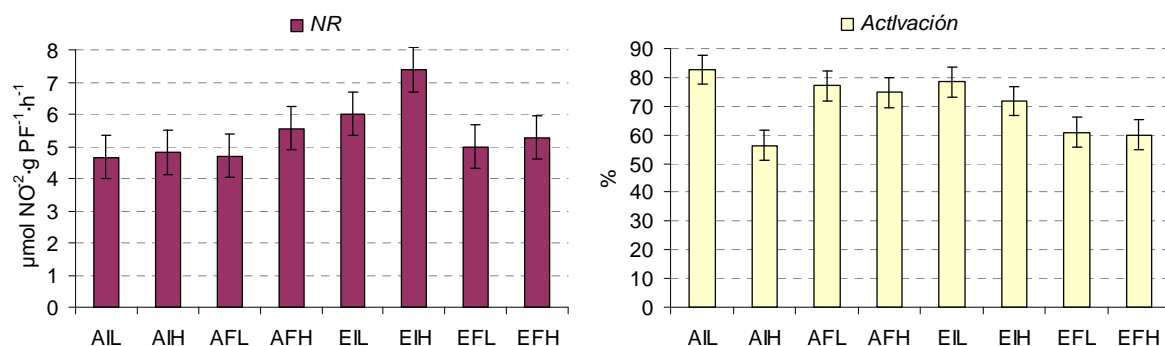


Gráfico 16. Actividad y estado de activación de la nitrato reductasa en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I, 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.1.6. Contenido de aminoácidos

En referencia a los efectos principales se observó que el crecimiento en CO₂ elevado disminuyó los niveles foliares de los aminoácidos mayoritarios (Tabla 17a). La temperatura elevada no modificó el contenido de aminoácidos totales, mayoritarios y aromáticos (Tabla 17a). Y la abundancia en nitrógeno incrementó los aminoácidos mayoritarios (Tabla 17a).

Los aminoácidos totales y aromáticos mostraron la interacción CO₂xN significativa (Tabla 17b), indicativa de que en plantas con nitrógeno abundante, el CO₂ elevado disminuyó únicamente el contenido foliar de aminoácidos totales (Tabla 17c). En condiciones ambientales de CO₂, la abundancia de nitrógeno aumentó los niveles de aminoácidos aromáticos (Tabla 17c); incremento que también tuvo lugar en los aminoácidos totales, tanto a concentraciones ambientales como elevadas de CO₂, si bien este aumento fue más marcado en condiciones ambientales de CO₂ (Tabla 17c).

Tabla 17. Cambios en los niveles de aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos, en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga en el año 2006. Datos expresados en μmoles·g PF⁻¹.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
Gly	1.506	0.858	0.010	0.065	1.304	1.060	0.033	0.102	1.048	1.317	0.021	0.102
Ser	3.93	3.13	0.009	0.078	3.51	3.55	ns	0.323	2.78	4.28	<0.001	0.323
Gln	4.30	3.44	0.084	0.269	3.94	3.79	ns	0.453	2.94	4.80	0.001	0.453
Glu	7.56	6.40	ns	0.608	7.33	6.63	0.041	0.302	6.64	7.32	0.044	0.302
Asn	0.278	0.320	ns	0.025	0.310	0.288	ns	0.052	0.244	0.354	0.054	0.052
Asp	3.109	3.043	ns	0.112	3.096	3.056	ns	0.164	2.745	3.407	0.002	0.164
Ala	1.025	1.415	ns	0.189	1.25	1.19	ns	0.082	1.056	1.384	0.002	0.082
Mayor.	21.71	18.61	0.031	0.562	20.74	19.57	ns	1.153	17.45	22.86	<0.001	1.153
Minor.	5.53	3.09	ns	1.041	4.62	4.00	ns	0.565	2.64	5.98	<0.001	0.565
Arom.	0.591	0.373	ns	0.185	0.504	0.461	ns	0.075	0.339	0.625	0.003	0.075
Totales	27.23	21.70	0.065	1.488	25.37	23.57	ns	1.597	20.09	28.84	<0.001	1.597
Gly/Ser	0.437	0.340	0.034	0.018	0.413	0.363	ns	0.046	0.448	0.328	0.023	0.046
Gln/Glu	0.565	0.539	ns	0.087	0.549	0.555	ns	0.070	0.436	0.668	0.006	0.070
Asn/Asp	0.086	0.103	ns	0.010	0.098	0.091	ns	0.015	0.084	0.105	ns	0.015

17.b.					17.c.						
	C.T	C.N	T.N	C.T.N	C.N						
						H	L	s.e.d.			
Gly	ns	ns	ns	ns							
Ser	ns	ns	ns	ns	Minor.	A	8.26	2.79	1.185		
Gln	ns	ns	ns	ns		E	3.69	2.49			
Glu	ns	ns	ns	ns	Arom.	A	0.840	0.342	0.1995		
Asn	ns	ns	ns	ns		E	0.410	0.336			
Asp	ns	ns	ns	ns	Totales	A	33.38	21.09	2.258		
Ala	ns	ns	ns	ns		E	24.30	19.09			
Mayor.	ns	ns	ns	ns	17.d.						
Minor.	ns	0.003	ns	0.074	C.T.N						
Arom.	ns	0.016	ns	ns		F	I				
Totales	ns	0.047	ns	ns		H	L	H	L	s.e.d.	
Gly/Ser	ns	ns	ns	ns	Minor.	A	6.94	3.28	9.59	2.29	1.429
Gln/Glu	ns	ns	ns	ns		E	3.68	2.09	3.71	2.90	
Asn/Asp	ns	ns	ns	ns							

En cuanto a los aminoácidos minoritarios, la interacción triple CO₂xTxN alcanzó significación estadística (Tabla 17b), cuyos resultados indicaron que a ambas temperaturas de crecimiento y abundancia de nitrógeno, el CO₂ elevado redujo los niveles de aminoácidos minoritarios (Tabla 17d). La temperatura elevada disminuyó el contenido de dichos aminoácidos en plantas crecidas en [CO₂] ambientales y abundancia de nitrógeno (Tabla 17d). Y además, en plantas crecidas en CO₂ ambiente, tanto a temperaturas

Resultados

ambientales como elevadas, la abundancia de nitrógeno incrementó los niveles de aminoácidos minoritarios, siendo éste incremento más acusado a temperaturas de crecimiento ambientales que elevadas (Tabla 17d).

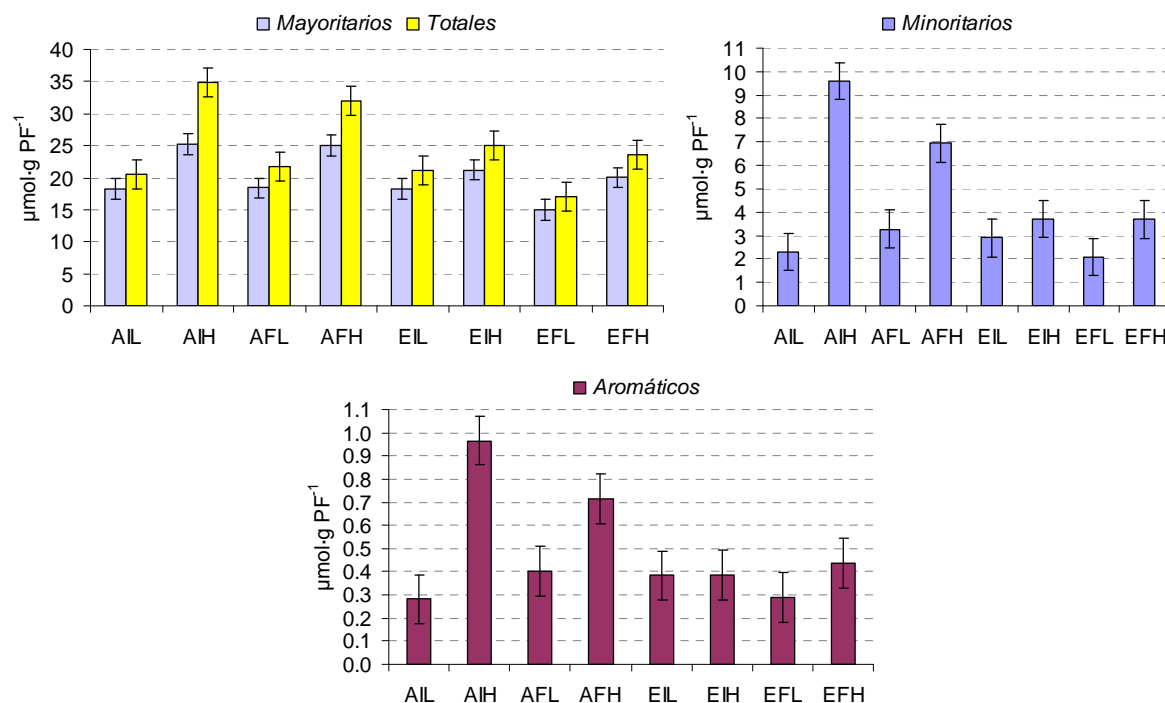


Gráfico 17a. Concentración de los aminoácidos mayoritarios, totales, minoritarios y aromáticos en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 µmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 µmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

El análisis de la varianza de los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente y las razones analizadas mostró en los efectos principales del CO₂, temperatura y nitrógeno significación estadística, pero no en las interacciones entre los factores experimentales (Tabla 17a,b). El CO₂ elevado disminuyó significativamente los niveles de Gln y de los aminoácidos fotorrespiratorios, Ser y Gly, además de la razón Gly/Ser (Tabla 17a). Las temperaturas superiores a las ambientales redujeron el contenido foliar de Glu y Gly (Tabla 17a). Y la abundancia de nitrógeno condujo a un aumento generalizado de todos y cada uno de los aminoácidos mayoritarios, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly y Ala, y de la razón Gln/Glu y a un descenso de la razón Gly/Ser (Tabla 17a). Ninguno de los factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno, modificó significativamente la razón Asn/Asp (Tabla 17a,b).

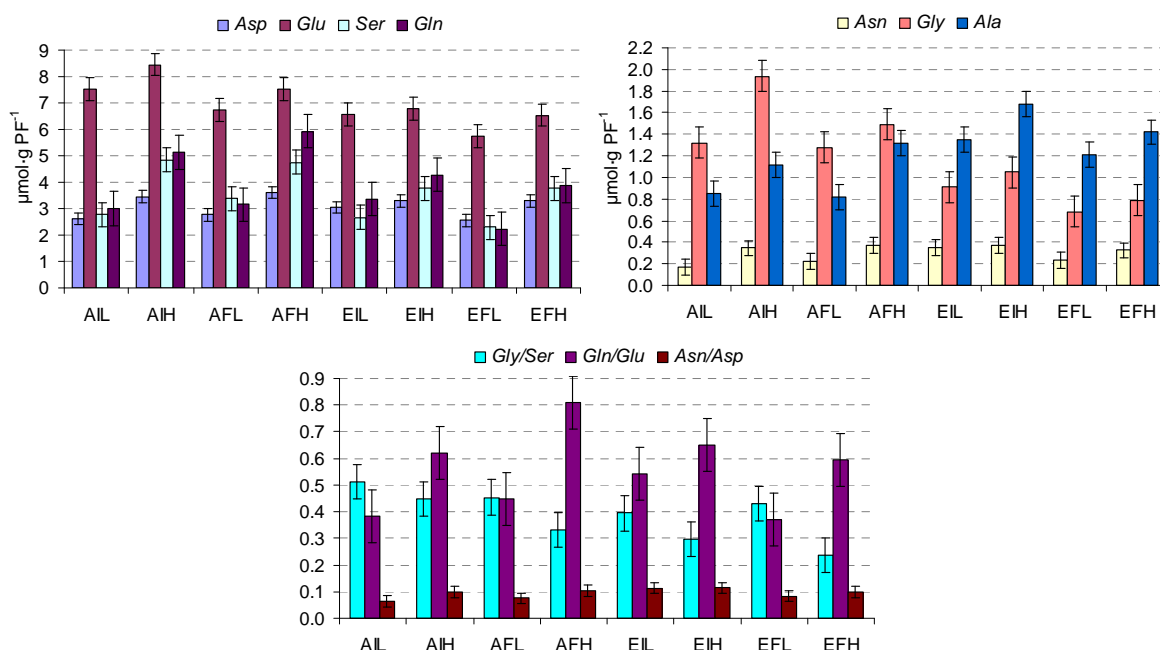


Gráfico 17b. Concentración de los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente (Gln, Glu, Asp, Asn, Ala, Ser y Gly) y las razones Gly/Ser, Gln/Glu y Asn/Asp en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.1.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas

(i) *Contenido de nitrato.* La interacción triple CO₂xTxN alcanzó significación estadística (Tabla 18b), indicativa de que a temperaturas ambientales, el CO₂ elevado disminuyó los niveles de nitrato en plantas crecidas tanto en abundancia como deficiencia en nitrógeno (Tabla 18d). Por otra parte, las temperaturas elevadas redujeron en casi el doble el contenido foliar de nitrato en condiciones ambientales de CO₂ y abundancia de nitrógeno; además, las temperaturas superiores a las ambientales también redujeron los niveles de nitrato en plantas crecidas en deficiencia en nitrógeno, tanto a [CO₂] ambientales como elevadas (Tabla 18d). Finalmente, en plantas crecidas en CO₂ ambiente, la abundancia de nitrógeno redujo el contenido de nitrato, tanto a temperaturas ambientales como elevadas; y en condiciones de CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno también disminuyó los niveles de nitrato, pero únicamente a temperaturas ambientales (Tabla 18d).

(ii) *Contenido de clorofila.* La abundancia de nitrógeno aumentó los niveles foliares de clorofila comparada con la deficiencia en dicho nutriente (Tabla 18a). El CO₂ mostró una interacción con la temperatura, CO₂xT (Tabla 18b), poniendo de manifiesto que el CO₂ elevado redujo el contenido foliar de clorofila en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales (Tabla 18c). Además, la temperatura elevada aumentó los niveles de

Resultados

clorofila en plantas crecidas en CO₂ ambiente y los disminuyó en aquellas crecidas en CO₂ elevado (Tabla 18c).

Tabla 18. Cambios en los niveles de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, en la emergencia de la espiga en el año 2006. Datos de nitrato expresados en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, de clorofila en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de proteínas totales en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

18.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
Nitrato	15.66	11.07	ns	2.081	15.57	11.15	<0.001	0.71	16.14	10.58	<0.001	0.71
Clorofila	2.786	2.602	0.012	0.021	2.686	2.702	ns	0.121	2.44	2.948	0.001	0.121
Proteínas	49.27	39.96	0.082	2.849	45.16	44.08	ns	1.905	39.60	49.64	<0.001	1.905

18.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Nitrato	0.011	ns	ns	0.018
Clorofila	0.013	ns	ns	ns
Proteínas	ns	0.070	ns	ns

18.c.

	C.T			C.N		
	F	I	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Nitrato	A 12.38	18.94	2.199			
	E 9.92	12.21				
Clorofila	A 2.969	2.603	0.1707			
	E 2.435	2.769				
Proteínas	A			56.18	42.36	3.427
	E			43.09	36.84	

18.d.

	C.T.N				s.e.d.
	F		I		
	H	L	H	L	
Nitrato	A 8.31	16.44	16.38	21.49	2.417
	E 8.87	10.97	8.76	15.66	

(iii) *Contenido de proteínas totales.* La interacción CO₂xN alcanzó significación para el contenido proteico (Tabla 18b), mostrando que en plantas con nitrógeno abundante, el CO₂ elevado redujo los niveles de proteínas foliares (Tabla 18c); y en plantas crecidas tanto a [CO₂] ambientales como elevadas, la abundancia de nitrógeno incrementó el contenido de proteínas totales en la hoja bandera del trigo (Tabla 18c).

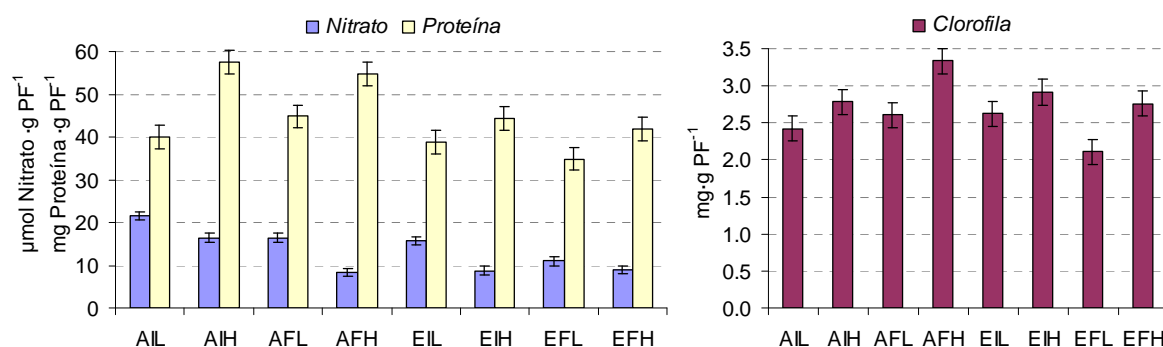


Gráfico 18. Concentración de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas en la emergencia de la espiga, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.2. Estudio de la hoja bandera del trigo días después de la antesis

4.3.2.1. Niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco (*rbcS*)

Los cambios en los niveles de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco en respuesta a los factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis muestran que en plantas crecidas a temperaturas ambientales y abundancia de nitrógeno, el CO₂ elevado aumentó la expresión del enzima (Figura 4). Este efecto del CO₂ elevado incrementando los transcritos de *rbcS* también se observó en plantas crecidas a temperaturas elevadas y deficiencia en nitrógeno (Figura 4). En plantas crecidas en CO₂ y temperaturas ambientales, así como en aquellas crecidas en CO₂ y temperatura elevados, la abundancia de nitrógeno disminuyó los niveles de transcritos de la Rubisco (Figura 4).

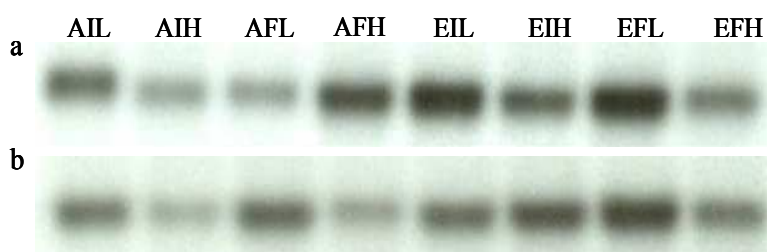


Figura 4. Niveles de ARNm del gen *rbcS* 15 días después de la antesis en la hoja bandera de plantas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, bien a nivel de CO₂ ambiental (A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) o elevado (E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), temperaturas ambientales (I) o 2 °C superiores (F) y deficiencia (L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) o abundancia (H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de nitrógeno correspondientes a la anualidad 2006. 1ª repetición (a) y 2ª repetición (b). Se aplicaron idénticas cantidades de ARN (15 μg) en cada una de las celdillas; el cargado de muestras fue comprobado por inspección de la señal ARNr (datos no mostrados). La intensidad de la señal indica la abundancia de transcritos relativa al total de ARN.

4.3.2.2. Contenido de carbohidratos

Los niveles de fructosa, sacarosa y fructanos no variaron en respuesta al CO₂, temperatura o nitrógeno (Tabla 19a,b). El CO₂ elevado incrementó los niveles foliares de almidón, pero no fueron modificados por la temperatura de crecimiento (Tabla 19a). La disponibilidad de nitrógeno no alteró el contenido foliar de ninguno de los carbohidratos analizados (Tabla 19a,b). El contenido de glucosa mostró una interacción significativa del CO₂ de crecimiento con la temperatura, CO₂xT (Tabla 19b), que evidenció que a temperaturas superiores a las ambientales, el CO₂ elevado aumentó el contenido foliar de éste carbohidrato (Tabla 19c). Y en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado, los niveles de glucosa fueron mayores a temperaturas elevadas que a temperaturas ambientales (Tabla 19c).

Resultados

Tabla 19. Cambios en los niveles de glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (S), fructanos (Fru) y almidón (A) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis en el año 2006. Datos expresados en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

19.a.

	CO ₂			Temperatura				Nitrógeno				
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
G	14.54	17.49	ns	1.567	13.88	18.15	0.044	1.891	14.49	17.53	ns	1.891
F	23.33	19.65	ns	3.689	19.65	23.33	ns	3.845	19.16	23.82	ns	3.845
S	68.42	54.63	ns	4.705	63.90	59.15	ns	3.977	60.00	63.06	ns	3.977
Fru	52.2	53.7	ns	8.76	62.9	43.0	ns	13.32	54.5	51.5	ns	13.32
A	1.371	2.257	0.038	1.787	1.978	1.650	ns	0.339	1.950	1.678	ns	0.339

19.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G	0.085	ns	ns	ns
F	ns	ns	ns	ns
S	ns	ns	ns	ns
Fru	ns	ns	ns	ns
A	ns	ns	ns	ns

19.c.

	C.T		
	F	I	s.e.d.
G	A 14.89	14.18	2.674
	E 21.40	13.58	

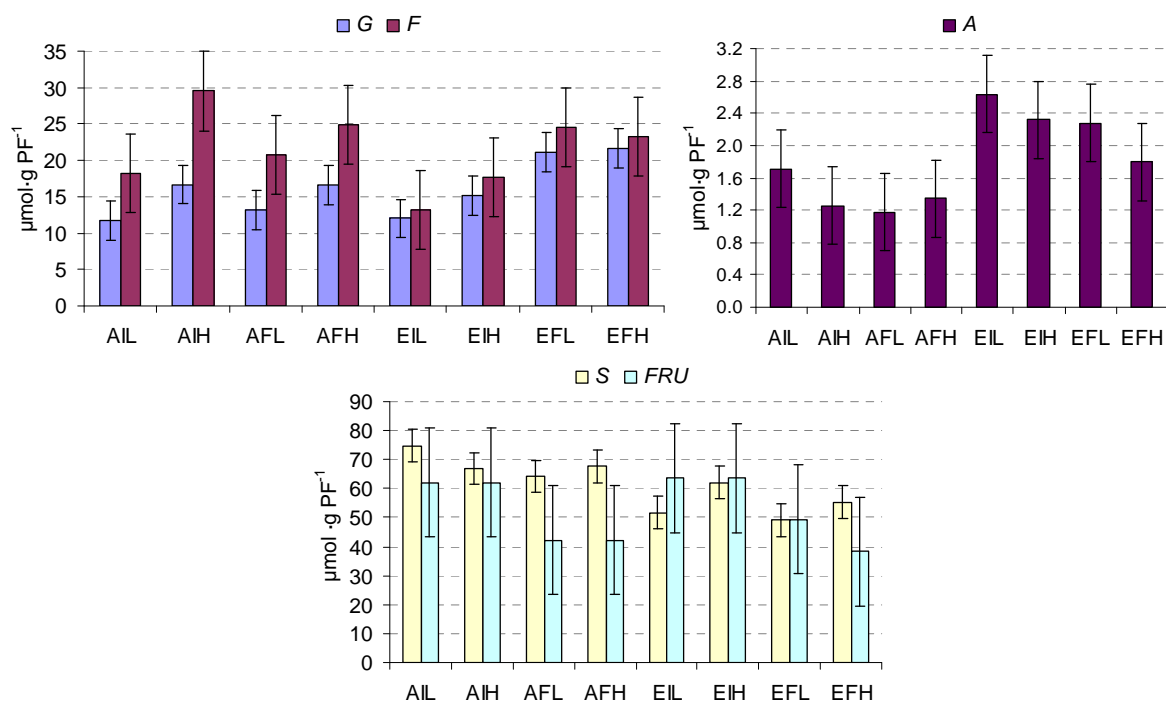


Gráfico 19. Concentración de glucosa (G), fructosa (F), almidón (A), sacarosa (S) y fructanos (Fru) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.2.3. Contenido de hexosas fosfato, UDP-glucosa y razón G6P/F6P

Ninguno de los factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno, modificaron significativamente los niveles de UDP-Glucosa (Tabla 20a,b). El CO₂ elevado aumentó la razón G6P/F6P (Tabla 20a). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó los niveles de F6P (Tabla 20a). Y la abundancia de nitrógeno redujo el contenido foliar de G6P y F6P (Tabla 20a).

Tabla 20. Cambios en los niveles de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis en el año 2006. Datos expresados en nmoles·g PF⁻¹.

20.a.

	CO ₂			s.e.d.	Temperatura			s.e.d.	Nitrógeno			s.e.d.
	A	E	p		I	F	p		L	H	p	
G6P	55.3	59.5	ns	2.3	59.8	55.0	ns	4.1	68.2	46.6	<0.001	4.1
G1P	9.41	7.40	ns	1.527	8.41	8.41	ns	0.704	10.79	6.06	<0.001	0.704
F6P	138.6	109.9	ns	10.45	133.6	114.9	0.064	9.13	140.8	107.6	0.003	9.13
UDP-Glucosa	46.3	42.7	ns	5.23	43.7	45.2	ns	7.25	49.0	39.9	ns	7.25
G6P/F6P	0.410	0.553	0.033	0.027	0.469	0.495	ns	0.031	0.506	0.458	ns	0.031

20.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
G6P	ns	ns	ns	ns
G1P	ns	0.083	ns	ns
F6P	ns	ns	ns	ns
UDP-Glucosa	ns	ns	ns	ns
G6P/F6P	ns	ns	ns	ns

20.c.

	C.N		
	H	L	s.e.d.
G1P	A 6.40	12.43	1.682
	E 5.71	9.03	

En cuanto a los niveles de G1P, la interacción CO₂xN alcanzó significación estadística (Tabla 20b), aspecto que puso de manifiesto que la abundancia en nitrógeno disminuyó los niveles de G1P, tanto en plantas crecidas en [CO₂] ambientales como elevadas (Tabla 20c).

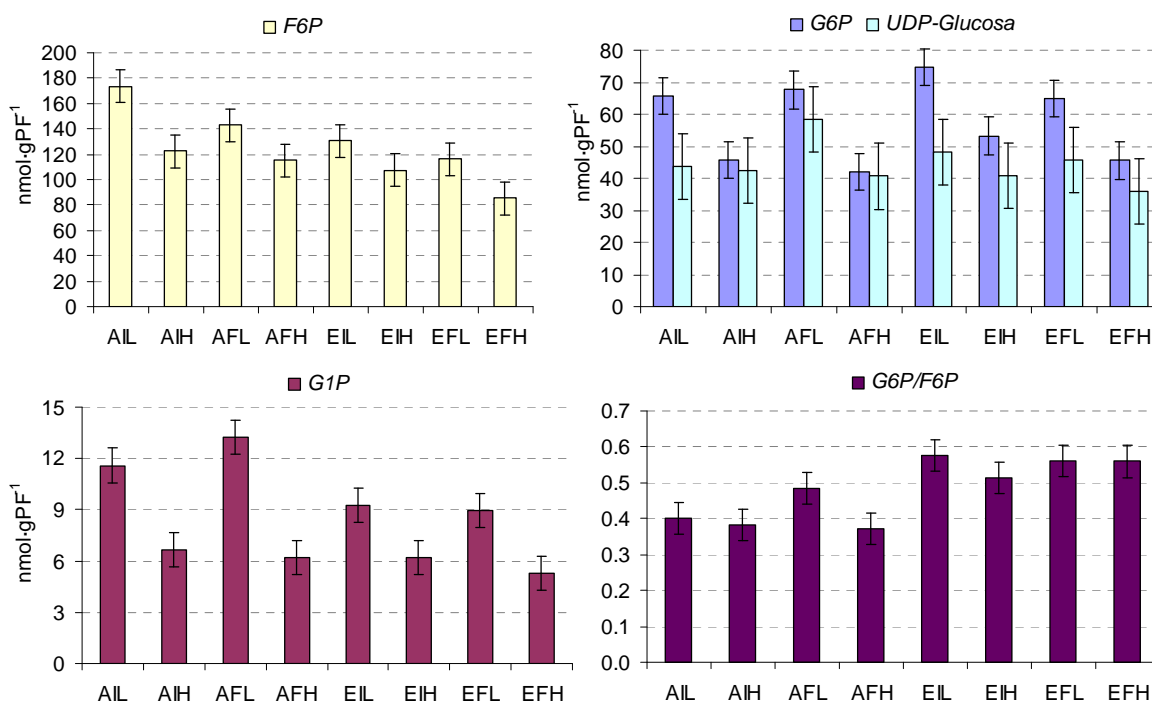


Gráfico 20. Concentración de hexosas fosfato (G6P, G1P, F6P), UDP-glucosa y la razón G6P/F6P en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.2.4. Contenido de otros intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos

Los niveles foliares de malato no variaron en respuesta al CO₂, temperatura o nitrógeno (Tabla 21a,b). Sin embargo, el CO₂ elevado redujo significativamente los niveles de ATP y 2-OG (Tabla 21a). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó el contenido foliar de 3PGA (Tabla 21a). Y en plantas crecidas con nitrógeno abundante los niveles de 2-OG fueron mayores que en aquellas crecidas con deficiencia en dicho nutriente (Tabla 21a). Las interacciones entre los factores experimentales no mostraron significación estadística en ninguno de los metabolitos analizados (Tabla 21b).

Tabla 21. Cambios en los niveles de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis en el año 2006. Datos de 3PGA expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}\cdot 10^{-1}$, de ATP y 2-OG en $\text{nmoles}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de malato en $\mu\text{moles}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

21.a.

	CO ₂			s.e.d.	Temperatura			s.e.d.	Nitrógeno			s.e.d.
	A	E	p		I	F	p		L	H	p	
3PGA	8.11	7.40	ns	0.704	8.94	6.58	0.012	0.803	8.20	7.31	ns	0.803
ATP	33.7	29.2	0.05	1.06	30.1	32.8	ns	6.97	35.0	27.9	ns	6.97
2-OG	67.3	53.1	0.049	3.26	59.9	60.5	ns	2.69	55.9	64.6	0.007	2.69
Malato	25.1	21.7	ns	3.04	23.8	23.0	ns	2.85	22.4	24.5	ns	2.85

21.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
3PGA	ns	ns	ns	ns
ATP	ns	ns	ns	ns
2-OG	ns	ns	ns	ns
Malato	ns	ns	ns	ns

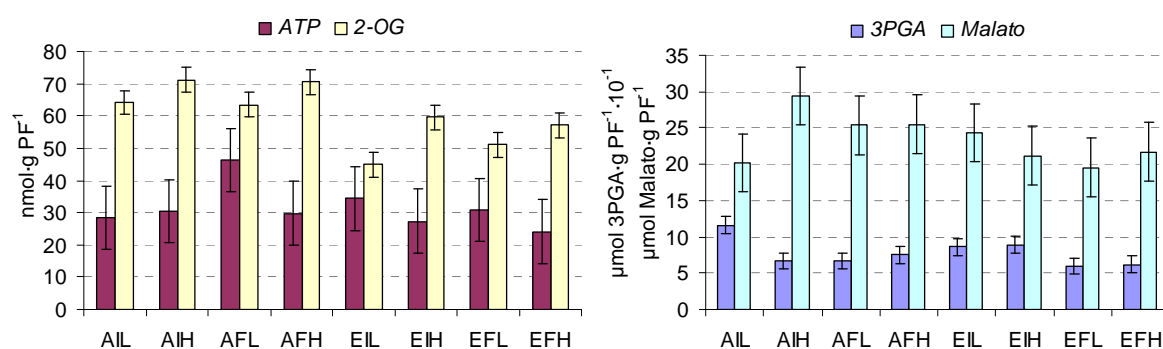


Gráfico 21. Concentración de los intermediarios fosforilados (3PGA y ATP) y ácidos orgánicos (2-OG y malato) en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.2.5. Actividad nitrato reductasa

Los cambios en la actividad nitrato reductasa con el CO₂ de crecimiento observados en la emergencia de la espiga, desaparecieron en estadios posteriores del desarrollo de los

cultivos de trigo (Tabla 22a). El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales aumentó el estado de activación del enzima. La actividad NR mostró una interacción significativa de la temperatura de crecimiento con el nitrógeno, TxN (Tabla 22b), que puso de manifiesto que en plantas deficientes en nitrógeno, el crecimiento a temperaturas elevadas redujo la actividad NR (Tabla 22c). Y en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno disminuyó dicha actividad (Tabla 22c).

Tabla 22. Variaciones en la actividad nitrato reductasa máxima (NR) y su estado de activación (Activación) en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis en el año 2006. Datos de la actividad NR expresados en $\mu\text{mol NO}_2\text{-g-PF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y del estado de activación en %.

22.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
NR	2.19	2.87	ns	0.287	3.14	1.92	0.001	0.295	2.66	2.40	ns	0.295
Activación	121	105	ns	17	90	137	0.002	12.3	122	105	ns	12.3

22.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
NR	ns	ns	0.058	ns
Activación	ns	ns	ns	ns

22.c.

	T.N		
	H	L	s.e.d.
NR	F 2.10	1.75	0.418
	I 2.70	3.58	

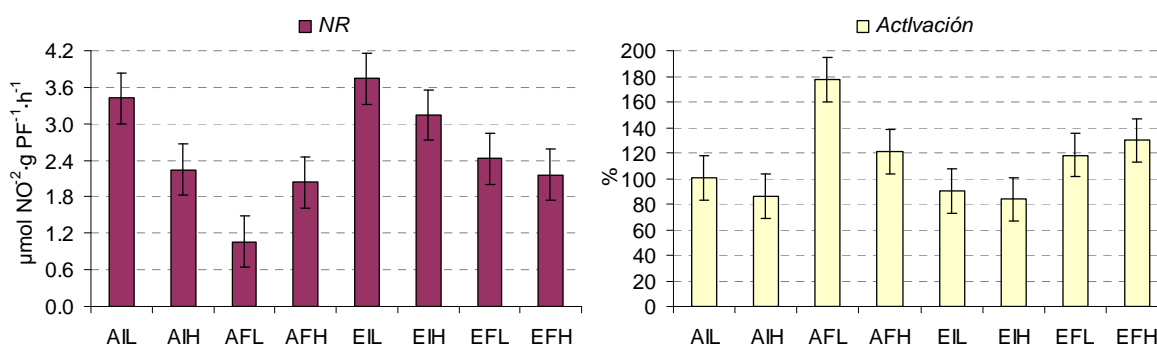


Gráfico 22. Actividad y estado de activación de la nitrato reductasa en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

4.3.2.6. Contenido de aminoácidos

El CO₂ elevado condujo a un descenso del contenido foliar de aminoácidos mayoritarios 15 dda (Tabla 23a). El crecimiento a temperaturas elevadas disminuyó los niveles de aminoácidos mayoritarios y totales (Tabla 23a). Y la abundancia de nitrógeno condujo a un aumento del contenido de aminoácidos mayoritarios en comparación con plantas deficientes en dicho nutriente (Tabla 23a). Los aminoácidos totales mostraron una interacción significativa CO₂xN (Tabla 23b), indicativa de que en plantas crecidas con nitrógeno abundante, el CO₂ elevado redujo los niveles de aminoácidos totales (Tabla 23c);

Resultados

y en plantas crecidas en CO₂ ambiente, la abundancia de nitrógeno aumentó significativamente el contenido foliar de dichos aminoácidos (Tabla 23c).

Tabla 23. Cambios en los niveles de aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios y aromáticos, en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis en el año 2006. Datos expresados en $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{PF}^{-1}$.

23.a.

	CO ₂				Temperatura				Nitrógeno			
	A	E	p	s.e.d.	I	F	p	s.e.d.	L	H	p	s.e.d.
Gly	1.733	0.787	0.065	0.254	1.386	1.134	0.003	0.069	1.177	1.343	0.033	0.069
Ser	3.018	2.708	ns	0.146	3.175	2.552	0.029	0.251	2.675	3.052	ns	0.251
Gln	3.736	2.713	0.021	0.150	3.590	2.859	0.026	0.289	3.021	3.428	ns	0.289
Glu	8.70	7.11	0.059	0.406	8.09	7.72	ns	0.378	7.38	8.42	0.018	0.378
Asn	0.230	0.254	ns	0.024	0.262	0.223	ns	0.037	0.258	0.227	ns	0.037
Asp	2.652	2.486	ns	0.226	2.687	2.451	ns	0.164	2.431	2.706	ns	0.164
Ala	0.770	0.883	ns	0.156	0.968	0.685	0.004	0.079	0.854	0.799	ns	0.079
Mayor.	20.83	16.94	0.027	0.656	20.15	17.62	0.023	0.975	17.80	19.97	0.045	0.975
Minor.	8.45	6.09	ns	0.955	8.33	6.20	0.084	1.132	6.19	8.35	0.08	1.132
Arom.	1.473	0.826	0.012	0.071	1.227	1.071	ns	0.170	0.828	1.471	0.003	0.170
Totales	29.28	23.03	0.03	1.108	28.49	23.82	0.024	1.801	23.98	28.32	0.033	1.801
Gly/Ser	0.628	0.341	ns	0.115	0.478	0.491	ns	0.502	0.524	0.445	ns	0.502
Gln/Glu	0.430	0.527	ns	0.069	0.587	0.370	0.056	0.103	0.551	0.406	ns	0.103
Asn/Asp	0.088	0.101	0.074	0.004	0.098	0.090	ns	0.012	0.103	0.085	ns	0.012

23.b.

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Gly	ns	0.073	ns	ns
Ser	0.026	ns	ns	ns
Gln	ns	ns	ns	ns
Glu	ns	ns	ns	0.015
Asn	ns	ns	ns	ns
Asp	ns	ns	ns	ns
Ala	ns	ns	ns	ns
Mayor.	ns	ns	ns	ns
Minor.	ns	0.01	ns	0.041
Arom.	ns	0.011	ns	0.085
Totales	ns	0.025	ns	ns
Gly/Ser	ns	ns	ns	ns
Gln/Glu	0.071	0.069	ns	ns
Asn/Asp	ns	ns	ns	ns

23.c.

	C.T			C.N		
	F	I	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Gly	A			1.884	1.582	0.263
	E			0.802	0.772	
Ser	A	3.024	3.012	0.354		
	E	2.079	3.338			
Minor.	A			11.25	5.64	1.602
	E			5.45	6.73	
Arom.	A			2.048	0.897	0.24
	E			0.893	0.758	
Totales	A			33.76	24.81	2.547
	E			22.89	23.16	
Gln/Glu	A	0.423	0.437	0.145	0.461	0.400
	E	0.316	0.737		0.352	0.702

23.d.

	C.T.N					
		F		I		s.e.d.
		H	L	H	L	
Glu	A	8.88	7.67	9.32	8.91	0.770
	E	6.91	7.40	8.56	5.56	
Minor.	A	10.16	6.65	12.34	4.64	2.265
	E	4.91	3.09	5.99	10.36	
Arom.	A	1.825	1.081	2.272	0.713	0.339
	E	0.872	0.507	0.915	1.009	

En referencia a los aminoácidos minoritarios y aromáticos, la interacción triple CO₂xTxN alcanzó significación estadística (Tabla 23b), mostrando que en plantas con abundancia en nitrógeno, tanto a temperaturas ambientales como elevadas, el crecimiento en CO₂ elevado disminuyó notablemente los niveles de los aminoácidos minoritarios y aromáticos (Tabla 23d). Mientras que en plantas deficientes en nitrógeno, el CO₂ elevado

redujo el contenido de aminoácidos aromáticos en condiciones de temperaturas elevadas y aumentó los minoritarios en condiciones de temperaturas ambientales (Tabla 23d). Las temperaturas elevadas disminuyeron el contenido de aminoácidos minoritarios en plantas crecidas en CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno (Tabla 23d). En condiciones ambientales de CO₂, la abundancia de nitrógeno incrementó los niveles de los aminoácidos aromáticos, a ambas temperaturas de crecimiento; aumentando también los minoritarios en plantas crecidas a temperaturas ambientales. Sin embargo, en plantas crecidas en CO₂ elevado y temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno redujo el contenido foliar de aminoácidos minoritarios (Tabla 23d).

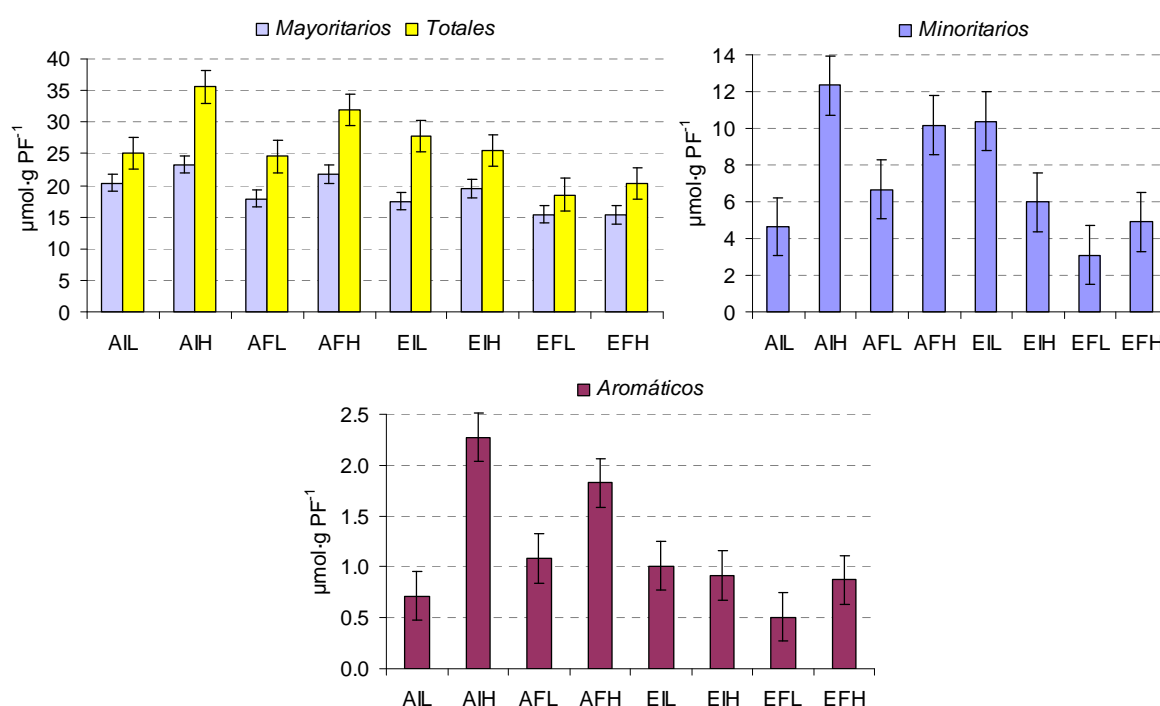


Gráfico 23a. Concentración de los aminoácidos mayoritarios, totales, minoritarios y aromáticos en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

En cuanto a los aminoácidos mayoritarios individuales y las razones analizadas, ninguno de los factores experimentales, CO₂, temperatura y nitrógeno, modificó significativamente los niveles de Asp, Asn y la razón Gly/Ser (Tabla 23a,b). El CO₂ elevado disminuyó la acumulación de Gln e incrementó la razón Asn/Asp, pero no modificó los niveles foliares de Ala y la razón Gln/Glu (Tabla 23a,b). El crecimiento a temperaturas elevadas disminuyó los niveles foliares de Gln, Gly y Ala, pero no afectó a la

Resultados

razón Asn/Asp (Tabla 23a,b). Mientras que la adición de más nitrógeno al suelo no alteró las concentraciones foliares de Ser, Gln, Ala y la razón Asn/Asp (Tabla 23a,b).

En referencia a los aminoácidos fotorrespiratorios, el CO₂ mostró una interacción significativa con la temperatura, CO₂xT, para los niveles de Ser y una interacción con el nitrógeno, CO₂xN, para la Gly (Tabla 23b). La primera de las interacciones, CO₂xT, fue indicativa de que en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, el CO₂ elevado redujo los niveles de Ser (Tabla 23c); y en plantas crecidas en CO₂ elevado, la temperatura elevada también disminuyó dichos niveles (Tabla 23c). Mientras que la segunda de las interacciones indicadas, CO₂xN, puso de manifiesto que en plantas crecidas tanto en abundancia como deficiencia en nitrógeno, el CO₂ elevado disminuyó notablemente el contenido foliar de Gly (Tabla 23c); y en plantas crecidas a niveles ambientales de CO₂, la abundancia de nitrógeno incrementó éste aminoácido (Tabla 23c).

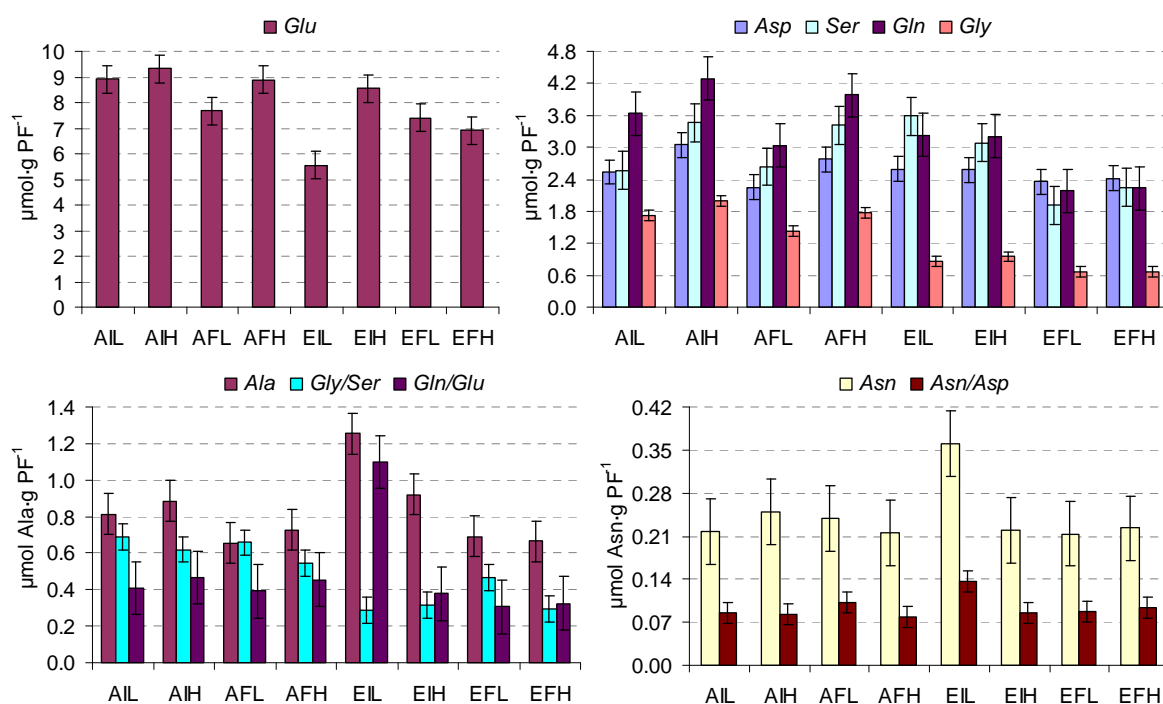


Gráfico 23b. Concentración de los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente (Gln, Glu, Asp, Asn, Ala, Ser y Gly) y las razones Gly/Ser, Gln/Glu y Asn/Asp en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 μmol·mol⁻¹; elevado, E, 700 μmol·mol⁻¹), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 kg·ha⁻¹; abundante, H, 140 kg·ha⁻¹). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

El análisis de la varianza de la razón Gln/Glu mostró significación estadística en las interacciones, CO₂xT y CO₂xN (Tabla 23b). La interacción CO₂xT, mostró que en plantas crecidas a temperaturas ambientales, el CO₂ elevado incrementó la razón Gln/Glu (Tabla 23c); y en condiciones de CO₂ elevado, la temperatura elevada redujo dicha razón (Tabla

23c). Mientras que la interacción $\text{CO}_2 \times \text{N}$, puso de manifiesto que el crecimiento en CO_2 elevado aumentó la razón Gln/Glu en plantas deficientes en nitrógeno (Tabla 23c); y en plantas crecidas en CO_2 elevado, la abundancia de nitrógeno disminuyó dicha razón (Tabla 23c). Finalmente, la interacción triple, $\text{CO}_2 \times \text{T} \times \text{N}$, alcanzó la significación estadística para los niveles de Glu (Tabla 23b), cuyos resultados indicaron que el CO_2 elevado redujo los niveles foliares de Glu en plantas crecidas a temperaturas elevadas y abundancia de nitrógeno, así como en aquellas crecidas a temperaturas ambientales y deficiencia en nitrógeno (Tabla 23d). En $[\text{CO}_2]$ elevadas, las temperaturas superiores a las ambientales incrementaron el contenido de Glu en plantas deficientes en nitrógeno y lo disminuyeron en aquellas crecidas con nitrógeno abundante (Tabla 23d). Por último, a temperaturas ambientales y CO_2 elevado, la acumulación de Glu fue mayor en plantas con abundancia de nitrógeno que en aquellas deficientes en dicho nutriente (Tabla 23d).

4.3.2.7. Contenido de nitrato, clorofila y proteínas

(i) *Contenido de nitrato.* El análisis de la varianza de los resultados de nitrato foliar, en estadios avanzados del desarrollo del cultivo de trigo, mostró significación estadística para las interacciones dobles $\text{CO}_2 \times \text{T}$, $\text{CO}_2 \times \text{N}$ y $\text{T} \times \text{N}$ (Tabla 24b). La interacción $\text{CO}_2 \times \text{T}$ puso de manifiesto que tanto a temperaturas elevadas como a ambientales, el CO_2 elevado redujo notablemente el contenido foliar de nitrato (Tabla 24c). Y en plantas crecidas en CO_2 elevado, las temperaturas superiores a las ambientales redujeron los niveles de nitrato (Tabla 24c). La interacción $\text{CO}_2 \times \text{N}$, mostró que en ambos estados nutricionales, abundancia y deficiencia en nitrógeno, el crecimiento en CO_2 elevado disminuyó significativamente el contenido foliar de nitrato (Tabla 24c). Y en plantas crecidas en CO_2 ambiente, la abundancia de nitrógeno aumentó los niveles de nitrato (Tabla 24c). Finalmente, la última de las interacciones, $\text{T} \times \text{N}$, fue indicativa de que la elevación de la temperatura redujo notablemente el contenido foliar de nitrato en plantas deficientes en nitrógeno y lo aumentó en aquellas crecidas con nitrógeno abundante (Tabla 24c). Además, a temperaturas superiores a las ambientales, los niveles de nitrato fueron mayores en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno que en aquellas deficientes en dicho nutriente (Tabla 24c).

(ii) *Contenido de clorofila.* La abundancia de nitrógeno aumentó significativamente los niveles foliares de clorofila (Tabla 24a). La interacción $\text{CO}_2 \times \text{T}$ mostró significación estadística para el contenido de clorofila (Tabla 24b), cuyos resultados indicaron que en

Resultados

plantas crecidas en CO₂ elevado, los niveles de clorofila fueron menores a temperaturas elevadas que a temperaturas ambientales (Tabla 24c).

Tabla 24. Cambios en los niveles de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta al CO₂, temperatura y nitrógeno, 15 días después de la antesis en el año 2006. Datos de nitrato expresados en $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, de clorofila en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y de proteínas totales en $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

24.a.

	CO ₂		p	s.e.d.	Temperatura			p	s.e.d.	Nitrógeno		p	s.e.d.
	A	E			I	F	L			H			
Nitrato	19.38	10.76	0.016	1.109	15.61	14.54	ns	0.836	14.20	15.95	0.058	0.836	
Clorofila	2.961	2.944	ns	0.113	3.087	2.817	0.046	0.121	2.679	3.225	<0.001	0.121	
Proteínas	39.15	37.67	ns	1.042	41.66	35.16	0.001	1.585	35.20	41.63	0.002	1.585	

24.b

	C.T	C.N	T.N	C.T.N
Nitrato	0.013	0.009	0.001	ns
Clorofila	0.066	ns	ns	ns
Proteínas	ns	ns	ns	0.075

24.c

	C.T			C.N			T.N		
	F	I	s.e.d.	H	L	s.e.d.	H	L	s.e.d.
Nitrato	A 20.06	18.70	1.388	21.56	17.21	1.388	F 17.21	11.87	1.182
	E 9.02	12.51		10.34	11.19		I 14.69	16.52	
Clorofila	A 2.948	2.973	0.171						
	E 2.686	3.201							

24.d.

	C.T.N				
	F	I		s.e.d.	
	H	L	H	L	s.e.d.
Proteínas	A 40.08	33.92	47.07	35.53	3.171
	E 37.07	29.56	42.28	41.77	

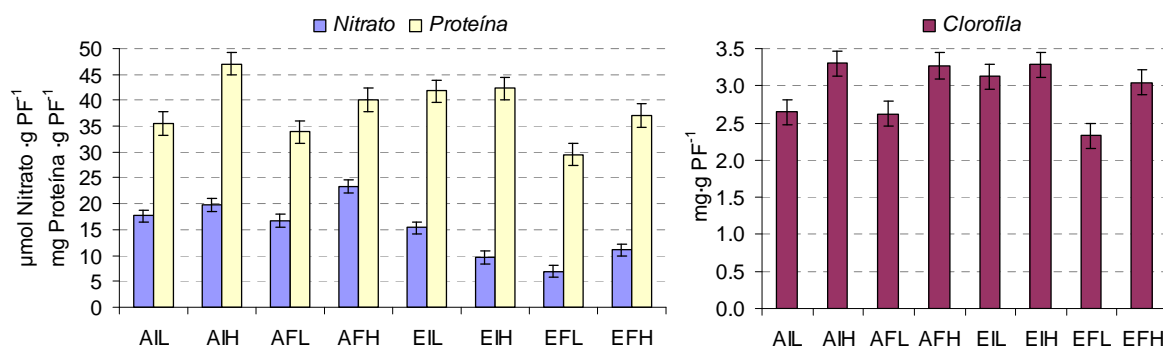


Gráfico 24. Concentración de nitrato, clorofila y proteínas totales en la hoja bandera del trigo en respuesta a las combinaciones de la concentración atmosférica de CO₂ (ambiente, A, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; elevado, E, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la temperatura del aire (ambiente, I; 2 °C superior a la ambiente, F) y la aplicación de nitrógeno (deficiente, L, 15 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; abundante, H, 140 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Medidas realizadas 15 días después de la antesis, en el año 2006. Las barras verticales representan el error estándar de la diferencia para la combinación de los tres tratamientos (CO₂xTxN).

(iii) *Contenido de proteínas totales.* La interacción triple CO₂xTxN alcanzó significación estadística en el análisis de proteínas totales (Tabla 24b), poniendo de manifiesto que en plantas crecidas a temperaturas ambientales y deficiencia en nitrógeno, el CO₂ elevado aumentó el contenido de proteínas (Tabla 24d). En plantas crecidas tanto

en condiciones de CO₂ ambiente y abundancia de nitrógeno como en CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno, la temperatura elevada disminuyó los niveles de proteínas foliares (Tabla 24d). La abundancia de nitrógeno aumentó el contenido de proteínas en plantas crecidas en CO₂ ambiente, a ambas temperaturas de crecimiento, incremento que también tuvo lugar en plantas crecidas en CO₂ y temperatura elevados (Tabla 24d).

5. DISCUSIÓN

5. 1. Introducción

Las concentraciones atmosféricas de CO₂ se mantuvieron estables, en torno a los 270 μmol·mol⁻¹, durante al menos los 1000 años anteriores al comienzo de la Revolución Industrial; incrementándose con posterioridad de forma notable (Leakey et al., 2009). En la actualidad, la [CO₂] estimada es de 388 μmol·mol⁻¹, un 40% superior a la encontrada en los últimos 20 millones de años (Pagani et al., 1999; Pearson & Palmer, 2000). Si bien los pronósticos auguran un incremento continuado en los próximos años, pudiendo llegarse a alcanzar los 550 μmol·mol⁻¹ en el 2050 (Ainsworth et al., 2008), o los 700 μmol·mol⁻¹ a finales de siglo (Leakey et al., 2009). Las [CO₂] globales, recientemente observadas, son significativamente mayores a las anticipadas por el IPCC (Hanson et al., 2008a); superando estimaciones que pudieran ser previsibles en un escenario de máximas emisiones, aún a pesar de los acuerdos iniciales tomados tras la aprobación del Protocolo de Kioto (Leakey et al., 2009). Como consecuencia del aumento de los niveles de CO₂ y de otros gases de efecto invernadero en la atmósfera, la temperatura media de la superficie terrestre está también aumentando (Stott et al., 2000), unos 0,76 °C desde 1800s, y las previsiones pronostican un incremento de 1,3-1,8 °C para el 2050 (Ainsworth et al., 2008), pudiendo llegar a oscilar entre 1,8-4,5 °C a finales de siglo (Schneider, 2001). Por ello, los ecosistemas naturales estarán expuestos a niveles de CO₂ y temperaturas superiores a los actuales. Considerando que, tanto el CO₂ como la temperatura, son factores claves que afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas, y ambos han variado recientemente, a la vez que existen predicciones de cambio en el futuro; ello tendrá repercusiones notables en el desarrollo y la productividad vegetal. La temperatura afecta al desarrollo de las plantas, regulando la velocidad de las reacciones bioquímicas, el desarrollo fenológico y el intercambio de materia y energía con el ambiente (Morison & Lawlor, 1999). Y el aumento de fotosíntesis en condiciones de CO₂ elevado conduce a una aceleración del crecimiento en las especies vegetales, que puede estar limitada por la capacidad de las plantas para asimilar los nutrientes necesarios en cantidad suficiente para equilibrar el aumento de la fijación de carbono y/o la capacidad de transporte de dichos nutrientes y carbono a los órganos y tejidos en crecimiento (Stitt & Krapp, 1999; Ainsworth et al., 2007).

Las plantas son extremadamente sensibles a variaciones en las condiciones ambientales (Stitt & Scheible, 1998), sin embargo, gozan de una enorme plasticidad, y su capacidad para crecer depende de su propia capacidad fotosintética y metabólica. Dado que el crecimiento óptimo de las plantas y la producción de biomasa requiere una adecuada y efectiva coordinación del metabolismo del carbono y nitrógeno (Lewis et al., 2000), será

previsible que la respuesta de las plantas a los aumentos de CO₂ y temperatura atmosféricos requiera ajustar su velocidad de desarrollo a su estado metabólico en respuesta a dichos factores ambientales.

Un gran número de estudios han puesto de manifiesto que el crecimiento a corto plazo en condiciones de CO₂ elevado conduce a una mayor tasa de fijación fotosintética del CO₂ (Drake et al., 1997; Nowak et al., 2004; Rogers et al., 2006; Leakey et al., 2009), como se ha indicado en el capítulo de introducción; sin embargo, el crecimiento durante periodos prolongados a concentraciones de CO₂ elevadas conduce a una disminución de la fotosíntesis (aclimatación) que conlleva un descenso de la capacidad de carboxilación (Stitt & Krapp, 1999; Rogers & Humphries, 2000; Martínez-Carrasco et al., 2005) y se acompaña de una disminución de la actividad y proteína Rubisco (Drake et al., 1997; Sicher & Bunce, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Long et al., 2004; Pérez et al., 2005; Del Pozo et al., 2007). Siendo el cambio más pronunciado en el aparato fotosintético, el descenso de proteína Rubisco (Long et al., 2004), a menudo asociado a una represión de la expresión génica del enzima mediada por la acumulación de carbohidratos (Stitt, 1991; Jang & Sheen, 1994; Van Oosten & Bedford, 1996). Si bien, varios estudios sugieren que dicho descenso es parcialmente debido al bajo estado nitrogenado de la planta (Nakano et al., 1997; Geiger et al., 1999; Pérez et al., 2005). Una limitación en nitrógeno reflejaría un cambio en el balance carbono-nitrógeno de la planta, que sería conducido por mayores velocidades de fijación del carbono y comportaría cambios en los parámetros metabólicos indicativos de un agotamiento de nitrógeno.

Por ello, para investigar la respuesta de las plantas de trigo al cambio climático global se estudiaron las características de intercambio gaseoso de la planta y se analizaron las variaciones en los niveles de metabolitos del carbono y nitrógeno con objeto de proporcionar información sobre los mecanismos de regulación implicados en los cambios en los niveles de transcritos y actividades enzimáticas involucrados en la regulación de ambos procesos metabólicos. Con dicha finalidad se discuten, a continuación, los resultados más relevantes, descritos en el capítulo 4, correspondientes a los diferentes estadios de desarrollo del cultivo de trigo -emergencia de la espiga y días después de la antesis-, en las dos anualidades de experimentación, 2004 y 2006.

Para facilitar la comprensión del lector, la discusión se realizará describiendo los efectos de los diferentes factores ambientales contemplados en el estudio, haciendo referencia, primero al crecimiento de las plantas a concentraciones elevadas de CO₂, para seguir a

continuación con el efecto de las temperaturas elevadas y abordar finalmente el aumento de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. Efectos que serán discutidos exhaustivamente, en el orden indicado, para cada una de las dos anualidades en las que se ha desarrollado la experimentación; a su vez, en cada anualidad se contemplan los estadios de desarrollo del cultivo, con la única excepción de la discusión correspondiente a la fijación fotosintética del carbono que se hace conjuntamente para ambas anualidades.

5.2. El crecimiento prolongado en CO₂ elevado conduce a un fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis

Con objeto de investigar si en nuestros experimentos tuvo lugar el fenómeno descrito de aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado se realizaron medidas de la asimilación fotosintética del carbono a una concentración común de CO₂ (concentraciones ambientales, 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), a la emergencia de la espiga y entre los 10-13 días después de la antesis durante las anualidades del 2004 y 2006. Medidas que pusieron de manifiesto que la fotosíntesis en la hoja bandera del trigo fue menor a los 10-13 días después de la antesis que a la emergencia de la espiga, es decir, en estadios avanzados del desarrollo foliar tuvo lugar un descenso de fotosíntesis (Gutiérrez et al., 2009a). El crecimiento en condiciones de CO₂ elevado disminuyó la asimilación del carbono, saturada por luz y medida a una misma concentración de CO₂, a la emergencia de la espiga en ambas anualidades 2004 y 2006, y entre los 10-13 días después de la antesis en 2004; efecto que no llegó a alcanzar significación estadística después de la antesis en la anualidad del 2006. El descenso en la fijación del carbono no se acompañó de una disminución de la concentración intercelular de CO₂, indicativo de una limitación no-estomática de la fotosíntesis en dichas condiciones. Esto muestra que en plantas crecidas en CO₂ elevado la capacidad fotosintética fue disminuida, en consonancia con otros estudios (Drake et al., 1997; Long et al., 2004; Del Pozo et al., 2005; Pérez et al., 2005). En experimentos previos desarrollados en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación, la cantidad y actividad Rubisco también disminuyó en plantas crecidas en CO₂ elevado (Pérez et al., 2005; Alonso et al., 2008). Resultados que han sido también mostrados por otros autores en otras especies vegetales (Drake et al., 1997; Stitt & Krapp, 1999), entre las que se incluyen trigo (Nie et al., 1995a), cebada (Sicher & Bunce, 1997), tabaco (Sicher & Kremer, 1994), tomate (Van Oosten et al., 1994), arroz (Vu et al., 1997), *Arabidopsis* (Cheng et al., 1998), etc. Un descenso de fotosíntesis en estadios avanzados de desarrollo del cultivo se ha encontrado también en

trigo cultivado en el campo empleando el sistema FACE (Osborne et al., 1998; Adam et al., 2000).

Además, en la primera anualidad, en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, aumentó la fotosíntesis y la conductancia de los estomas a la emergencia de la espiga, pero no después de la antesis, mientras que la concentración intercelular de CO₂ aumentó en ambos estadios de desarrollo. Por tanto, las temperaturas elevadas incrementaron la difusión del CO₂ a través de los estomas aumentando la fotosíntesis a la emergencia de la espiga en 2004. Sin embargo, las temperaturas elevadas no modificaron ni la asimilación del carbono, ni la concentración intercelular de CO₂ o la conductancia estomática en 2006 (Gutiérrez et al., 2009a).

En plantas crecidas con abundancia de nitrógeno la asimilación fotosintética del carbono aumentó respecto a aquellas crecidas con deficiencia en dicho nutriente, tanto a la emergencia de la espiga como entre los 10-13 días después de la antesis en la anualidad del 2004, en torno a un 7% y un 13%, respectivamente. En estadios avanzados del desarrollo foliar la capacidad fotosintética fue un 50% menor que a la emergencia de la espiga, en ambas condiciones nutricionales. Sin embargo, la fotosíntesis no fue modificada significativamente por la disponibilidad de nitrógeno en la experimentación realizada en el 2006, aunque tendió a aumentar en plantas crecidas en abundancia de dicho nutriente. Así mismo, en ambos estadios de crecimiento y experimentos desarrollados en las diferentes anualidades, ni la conductancia estomática ni la concentración intercelular de CO₂ fueron modificadas por la nutrición nitrogenada. El descenso de capacidad fotosintética encontrado en plantas deficientes en nitrógeno podría asociarse a la redistribución y exportación de nitrógeno desde la hoja a los órganos en expansión (Maroco et al., 2002). Se ha encontrado que en plantas con suministro limitante de nitrógeno, en comparación con aquellas que reciben una fertilización nitrogenada adecuada, hubo un descenso de fotosíntesis que se acompañó de una reducción del contenido foliar de Rubisco (Webber et al., 1994; Stitt & Krapp, 1999). Webber et al. (1994) propusieron que la reducción de la acumulación foliar de Rubisco en plantas deficientes en nitrógeno, a niveles suficientes para mantener una máxima capacidad fotosintética, facilitaría la liberación de nitrógeno para ser utilizado por la planta.

5.3. Las respuestas de aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado no pueden predecirse por cambios en los niveles de mensajero de Rubisco. La expresión génica del enzima no parece relacionarse con el contenido foliar de azúcares

Las plantas están continuamente expuestas a la influencia de factores ambientales que modifican notablemente las concentraciones de ciertos metabolitos, que pueden afectar a la expresión génica, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, de enzimas involucradas en rutas metabólicas importantes para la planta (Hummel et al., 2009), lo que tendrá repercusiones considerables en su crecimiento. Mientras que los carbohidratos sirven, no sólo, como fuente de energía y carbono, sino como moléculas señalizadoras que regulan la fisiología y el metabolismo. El nitrato, es no sólo el sustrato para la ruta de asimilación de nitrógeno en plantas, sino también una molécula señal, que regula la expresión de genes involucrados en diferentes aspectos del metabolismo del carbono y nitrógeno (Crawford & Forde, 2002).

Son muchos los estudios, incluidos los nuestros, que han mostrado que el fenómeno de aclimatación de la fotosíntesis al crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado comporta una pérdida de capacidad fotosintética (Van Oosten & Besford, 1996; Drake et al., 1997; Pérez et al., 2005; Martínez-Carrasco et al., 2005). A menudo asociada a la represión de la expresión de genes fotosintéticos mediada por la acumulación de carbohidratos foliares (Sheen, 1994; Koch, 1996; Jang & Sheen, 1997; Moore et al., 1999). Por ello, en los últimos años se ha enfatizado en el control de la expresión génica de la Rubisco por niveles elevados de CO₂ atmosférico. Habiéndose mostrado que la exposición prolongada a [CO₂] elevadas puede conducir a un descenso de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco codificada en el núcleo (Van Oosten et al., 1994; Drake et al., 1997; Moore et al., 1999), represión similar a la encontrada por suministro de glucosa y sacarosa a protoplastos, cultivos celulares y hojas cortadas (Krapp et al., 1993; Sheen, 1994; Van Oosten & Besford, 1996).

En los cultivos de trigo en el campo, el estudio de los niveles de expresión de la subunidad pequeña de la Rubisco, a la *emergencia de la espiga* en la anualidad del **2004** mostró que a temperaturas ambientales, el crecimiento en CO₂ elevado redujo los niveles de transcritos de *rbcS* en la hoja bandera de plantas de trigo crecidas con deficiencia en nitrógeno y no afectó a la expresión de aquellas crecidas con abundancia de dicho nutriente. Mientras que en plantas deficientes en nitrógeno los niveles de sacarosa aumentaron de 26,55 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ en aquellas crecidas con niveles ambientales de CO₂ a

34,89 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ en las crecidas en condiciones de CO_2 elevado; en las plantas crecidas con nitrógeno abundante, sin embargo, los niveles de sacarosa apenas variaron en respuesta al CO_2 de crecimiento, oscilando entre 31,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ y 32,87 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ en plantas crecidas en CO_2 ambiente y elevado, respectivamente (datos no mostrados en resultados). Los niveles de glucosa también variaron de un modo similar, por lo que la acumulación de carbohidratos podría explicar los cambios de expresión del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco en la hoja bandera del trigo. Un descenso de transcritos de *rbcS* y de actividad Rubisco ha sido también encontrado en plantas de guisante cultivadas con nitrógeno limitante a concentraciones elevadas de CO_2 , cambios que no tuvieron lugar cuando las plantas recibieron un suministro adecuado de nitrógeno (Riviere-Rolland et al., 1996). Resultados que podrían ser interpretados como evidencia de que la represión génica de la Rubisco por carbohidratos opera más eficazmente en plantas limitadas en nitrógeno, lo que explicaría el mayor descenso de Rubisco y el que la aclimatación de la fotosíntesis al CO_2 elevado pueda ser más acusada en plantas limitadas en nitrógeno que aquellas fertilizadas con abundancia en dicho nutriente (Sage, 1994; Pettersson & MacDonald, 1994; Rogers et al., 1996; Stitt & Krapp, 1999; Del Pozo et al., 2005, 2007). Esta apreciación contrasta con nuestros resultados con trigo en el presente trabajo de investigación, en los que no hemos encontrado evidencias de que la deficiencia en nitrógeno desencadene una mayor aclimatación de la fotosíntesis en plantas crecidas en CO_2 elevado respecto a aquellas que recibieron una adecuada nutrición nitrogenada, aún a pesar de que los niveles de transcritos del gen *rbcS* disminuyeron. Además, en las plantas de trigo fertilizadas con abundancia de nitrógeno, el crecimiento en CO_2 elevado no modificó los niveles de transcritos de la Rubisco, en contraposición al descenso de expresión encontrado en plantas de trigo duro (Bowes, 1991; Nie et al., 1995b) o al descenso de proteína observado en trigo de primavera, que no tuvo efecto en la expresión del gen *rbcS* (Pérez et al., 2005).

Por otra parte, hemos podido observar que en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo, en plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales, la expresión del gen *rbcS* fue menor en plantas crecidas a temperatura elevada comparada con aquellas crecidas a temperaturas ambientales tanto en abundancia como deficiencia de nitrógeno. Vu et al. (2001) mostraron por primera vez, en cultivos de soja, un descenso notable en la abundancia de transcritos *rbcS* al incrementar la temperatura de crecimiento. Aunque previamente se habían presentado evidencias de que el tratamiento de cultivos celulares de soja con choque térmico conducía a un descenso en la expresión del gen *rbcS* (Vierling & Keys, 1985). Con

posterioridad, un estudio realizado con diferentes cultivares de arroz, puso de manifiesto que mientras que en plantas crecidas en CO₂ ambiente, la elevación de la temperatura tuvo poco efecto en la fotosíntesis foliar, los transcritos de la Rubisco aumentaron en uno de los cultivares y disminuyeron en el otro, aunque la actividad Rubisco total y el contenido foliar de proteínas disminuyese en ambos cultivares (Gesch et al., 2003); resultados que evidencian la carencia de correlación general entre los niveles de transcritos de Rubisco y el contenido foliar de proteína, así como la fotosíntesis foliar. En nuestros estudios anteriores con trigo en condiciones de crecimiento similares a las del presente estudio, las temperaturas por encima de las ambientales tendieron a disminuir los transcritos del gen *rbcS* (Pérez et al., 2005).

Se sabe que la temperatura influye en la fotosíntesis de plantas C₃. La velocidad de carboxilación de la Rubisco es mayor a temperaturas elevadas, pero la oxigenación aumenta relativamente más, debido a las disminuciones de la solubilidad del CO₂ y de la especificidad de la Rubisco por este gas respecto al O₂ (Jordan & Ogren, 1984). Como consecuencia, hay mayor pérdida fotorrespiratoria de CO₂ y una disminución en la eficiencia de la fijación del CO₂ a temperaturas altas (Hall & Keys, 1983; Keys, 1986). En nuestro estudio no hemos observado una interacción de los niveles de CO₂ y temperatura sobre la asimilación fotosintética, si bien, en este estadio del desarrollo foliar del trigo, el aumento de temperatura se acompañó de un incremento de la fotosíntesis. Paralelamente, los niveles de carbohidratos disminuyeron respecto a las plantas crecidas a temperaturas ambientales, a pesar de lo cual descendió la expresión del gen *rbcS*. Sin embargo, los niveles de proteínas y clorofila no variaron con el incremento de la temperatura, aunque con abundancia de nitrógeno fueron ligeramente superiores que a temperatura ambiente, mientras que al aumentar la temperatura de crecimiento los niveles de nitrato, o bien disminuyeron en plantas deficientes en nitrógeno, o aumentaron en aquellas que recibieron una adecuada fertilización nitrogenada. En un estudio realizado en condiciones similares a las de este trabajo de investigación, las temperaturas altas no afectaron a la actividad total o al estado de activación de la Rubisco, pero alteraron su actividad específica a ciertas horas del día y disminuyeron la proteína Rubisco, en asociación con una tendencia al descenso de los transcritos de la Rubisco (Pérez et al., 2005). En sintonía con dicha apreciación este estudio muestra por vez primera, no una ligera tendencia, sino un descenso drástico de los transcritos de Rubisco en estadios tempranos de desarrollo de los cultivos de trigo a temperatura alta, aunque no se acompañó de una pérdida de capacidad fotosintética, en

contraste con el descenso de fotosíntesis observado en trigo duro a temperaturas elevadas, que se relacionó con una pérdida de nitrógeno foliar (Delgado et al., 1994).

Nuestros resultados parecen mostrar que aunque los carbohidratos pueden ser importantes en la regulación de la expresión del gen *rbcS*, por sí solos los cambios en el pool de carbohidratos no permitirían predecir los cambios de expresión observados en los cultivos de trigo en condiciones naturales en el campo en interacción con otros factores ambientales, en consonancia con las apreciaciones de Gesch et al. (1998).

Se ha propuesto que el descenso de transcritos de Rubisco en condiciones de CO₂ elevado es desencadenado por la acumulación de carbohidratos foliares (Sheen 1990; Van Oosten & Besford, 1994; Webber et al., 1994). Según dicha hipótesis, sería previsible que los azúcares solubles disminuyeran notoriamente a temperaturas ambientales en CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno, condiciones en las que los niveles de transcritos *rbcS* se acumularon considerablemente respecto a las plantas crecidas en CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno. Sin embargo, los niveles de sacarosa y glucosa apenas fueron modificados en la hoja bandera del trigo de plantas crecidas en CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno respecto a aquellas crecidas en CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno, 32,87 y 3,63 respecto a 34,89 y 2,59 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$, respectivamente. Geiger et al. (1999) en un estudio con tabaco observaron que en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno, en condiciones de CO₂ elevado, tuvo lugar un ligero aumento de los niveles de carbohidratos que no se acompañó de un descenso de fotosíntesis y de los niveles de transcritos de Rubisco. Aunque sí que tuvo lugar un descenso de proteína Rubisco junto a una disminución de proteínas solubles totales (Sicher & Bunce, 1997) y nitrógeno total en las hojas (Nakano et al., 1997), sugiriendo que el efecto del CO₂ en la fotosíntesis se debió al estado nitrogenado de la planta (Riviere-Rolland et al., 1996; Nakano et al., 1997; Farage et al., 1998; Geiger et al., 1999; Pérez et al., 2005). En nuestro experimento con trigo, desconocemos si el aumento de transcritos de Rubisco con abundancia de nitrógeno se acompañó de un aumento de proteína Rubisco, aunque en un estudio previo realizado en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación, los niveles de dicha proteína -entre las 4-6 horas después del comienzo del fotoperiodo- aumentaron con la aplicación de más nitrógeno en plantas crecidas en CO₂ elevado a temperaturas ambientales (Pérez et al., 2005). Un incremento del contenido foliar de Rubisco podría tener lugar en nuestras condiciones en conformidad con los mayores niveles de proteínas foliares encontrados en la hoja bandera del trigo en las plantas crecidas a temperaturas ambientales y abundancia de nitrógeno -48,01 $\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ - en comparación con aquellas

deficientes en dicho nutriente $-40,96 \text{ mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ -, sugiriendo que el estado nitrogenado de la planta desempeñaría un papel importante en la respuesta del trigo al CO_2 elevado (Nakano et al., 1997; Farage et al., 1998; Geiger et al., 1999; Stitt & Krapp, 1999; Pérez et al., 2005).

La carencia de correlación entre la expresión del gen *rbcS* y el contenido de proteína Rubisco se ha mostrado en varias especies vegetales en condiciones de CO_2 elevado (Moore et al., 1998), y posiblemente constituya un reflejo de la complejidad de la regulación molecular de la Rubisco. Pues son varios los factores que afectan a la regulación de la síntesis y la cantidad de enzima en los distintos pasos de transcripción, post-transcripción, traducción y recambio de proteína (Berry et al., 1986; Wanner & Guissem, 1991; Webber et al., 1994; Moore et al., 1998; Moore et al., 1999). Por otra parte, los estudios enfocados al esclarecimiento del mecanismo molecular implicado en la represión de genes fotosintéticos codificados en el núcleo, como el gen *rbcS*, parecen poner de manifiesto que mientras que la acumulación de carbohidratos en sí misma, no inhibe directamente la expresión génica, sí que parece estar relacionada con el metabolismo de las hexosas, que pueden ser incrementadas vía hidrólisis de sacarosa por la invertasa ácida (Goldschmidt & Huber, 1992; Krapp et al., 1993; Moore et al., 1998). Jang & Sheen (1994) mostraron empleando un sistema de expresión transitorio en protoplastos de maíz que los carbohidratos, que son sustratos para la hexoquinasa, están involucrados en la represión de genes fotosintéticos. Y propusieron que la HK podría ser el sensor que mediase en la ruta de transducción implicada en la regulación de la expresión de dichos genes (Jang & Sheen, 1994). Dicha hipótesis fue fortalecida por el hecho de que ciertos genes como *rbcS* y *cab* (proteínas de unión a clorofila) mostraron una relativa sensibilidad a los azúcares en plantas de *Arabidopsis* con expresión antisentido de la hexoquinasa y en aquellas que sobre-expresaban dicho enzima (Jang et al., 1997). En levaduras, la fosforilación de la glucosa por HK (Gancedo, 1992; Rose et al., 1991) se ha sugerido que sería el sensor que induce la alteración de la transcripción génica. En base a dichas apreciaciones, se ha llegado a proponer que la HK desempeñaría una doble función, como sensor de glucosa y enzima que convierte las hexosas en hexosas-6-fosfato (Gancedo, 1992; Jang et al., 1997). Aunque existen evidencias convincentes que avalan el papel de la glucosa y la sacarosa como moléculas señalizadoras en plantas, para la sacarosa ha sido difícil de establecer, por ser rápidamente hidrolizada en fructosa y glucosa (Rolland et al., 2006); sin embargo, la sensibilización por glucosa comprende el mejor mecanismo de señalización por carbohidratos conocido (Xiao et al., 2000; Moore et al., 2003). Distintos

estudios genéticos han revelado que la hexoquinasa es un sensor de glucosa que integra señales de nutrientes y hormonas para regular la expresión génica y el crecimiento de las plantas a estímulos ambientales (Cho et al., 2006; Rolland et al., 2006), y en base a ellos, se ha llegado a proponer un modelo por el que la HK regularía la transcripción de los genes diana (Cho et al., 2006).

Hemos podido también observar en nuestro experimento que en la hoja bandera del trigo en condiciones de CO₂ elevado, el aumento de temperatura indujo notablemente la expresión de la Rubisco en plantas crecidas con deficiencia en nitrógeno; efecto que no tuvo lugar en plantas crecidas con nitrógeno abundante. Se sabe que el impacto de la temperatura elevada suele ser difícil de interpretar, ya que los efectos directos de la temperatura suelen agudizarse con diferencias en el desarrollo, debido a una aceleración del crecimiento y cambios en la fenología (Delgado et al., 1994). En las plantas crecidas con CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno el aumento de temperatura redujo los niveles foliares de sacarosa a 30,11 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ frente a los 34,89 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ encontrados en las hojas de plantas crecidas a temperaturas ambientales, y la disminución del contenido foliar de sacarosa se acompañó de un ligero descenso de glucosa y otros azúcares, e incluso, de hexosas-P. Posiblemente la menor acumulación de carbohidratos foliares encontrada en las mencionadas condiciones, aliviaría la represión mediada por azúcares del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco (Sheen, 1994; Jang & Sheen, 1994; Jang et al., 1997), facilitando el incremento de transcritos de la proteína. La inducción de la expresión de la Rubisco se acompañó también de un ligero aumento del contenido foliar de nitrato, proteínas y clorofila. Por el contrario, en las plantas crecidas con nitrógeno abundante los niveles de sacarosa apenas fueron modificados con la temperatura de crecimiento, 32,87 y 31,18 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ en plantas crecidas a temperaturas ambientales y elevadas, respectivamente, y los compuestos nitrogenados mostraron una tendencia similar.

Se ha llegado a proponer que el suministro de nutrientes desempeña un papel crucial en la respuesta de la Rubisco al CO₂ elevado (Pettersson et al., 1993). Apreciación que resulta convincente desde la perspectiva de que la máxima proporción de nitrógeno soluble en la hoja es incorporada en Rubisco (Woodrow & Berry, 1988). Por lo que la liberación de nitrógeno desde el exceso de Rubisco pudiera ser ventajosa cuando el crecimiento fuera limitado por el suministro de nitrógeno. En sintonía con la apreciación de que la respuesta de la Rubisco pudiera ser modulada por la nutrición nitrogenada (Sage et al., 1989; Woodrow, 1994), se ha sugerido que podría existir un valor umbral de nitrógeno para el que la Rubisco no sería regulada a la baja en CO₂ elevado. Resultados con trigo cultivado a

diferentes niveles de nutrición nitrogenada soportarían dicha hipótesis (Delgado et al., 1994). Además, sería factible que el valor umbral variase entre especies vegetales, pues dependerá entre otros factores, de la partición de nitrato entre los pools activos y de almacenaje; así como del balance entre la actividad de las fuentes y los sumideros, que afectará a la reasignación del nitrógeno procedente de la degradación de la Rubisco (Woodrow, 1994). El nitrato también podría alterar la partición entre carbohidratos y aminoácidos y reducir la acumulación de carbohidratos por debajo de un umbral límite para la represión de la Rubisco (Riviere-Rolland et al., 1996). Además, Farage et al. (1998) presentaron evidencias de que la deficiencia en nitrógeno no necesariamente condujo a una aclimatación de la fotosíntesis en condiciones de CO₂ elevado. Sugiriendo que no resulta imprescindible el desarrollo de grandes sumideros para abolir la aclimatación, sino que más bien el factor decisivo dependería de la adaptación de la velocidad de crecimiento de la planta para ajustar el suministro de nitrógeno. Dicha apreciación estaría de acuerdo con la hipótesis de Pettersson & McDonald (1994) de que la aclimatación al CO₂ elevado dependerá de si la respuesta del crecimiento de la planta entera se ha aclimatado al CO₂ elevado junto con cualquier otra fuente de limitación en el ambiente. Por lo que las plantas que crecen en ambientes naturales es posible que ajusten su crecimiento a las influencias ambientales de los alrededores. Además, las plantas pueden experimentar periodos de desequilibrio fuente/sumidero en ciertos estadios de desarrollo, como se puso de manifiesto en un estudio con trigo en condiciones de CO₂ elevado empleando el sistema FACE, en el que durante la translocación de nitrógeno para el llenado del grano tuvo lugar un descenso en la concentración foliar de Rubisco (Nie et al., 1995a). Y cambios en el estado de desarrollo han mostrado que inducen una aclimatación irreversible en la remolacha azucarera (Ziska et al., 1995). En definitiva, sería previsible que la fenología junto con las condiciones ambientales específicas desempeñasen un papel decisivo en la respuesta de las plantas al CO₂ elevado en ambientes naturales.

En sintonía con estas apreciaciones, hemos podido observar en nuestro experimento con cultivos de trigo en el campo, que a temperaturas superiores a las ambientales, el crecimiento en CO₂ elevado indujo la expresión de la Rubisco tanto en abundancia como en deficiencia en nitrógeno. Aún a pesar de que el crecimiento en CO₂ elevado condujo a una mayor acumulación de carbohidratos, la ausencia de un descenso de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco, contradice la apreciación del control de la expresión génica de la Rubisco por el CO₂ elevado (Van Oosten & Besford, 1996; Drake et al., 1997). En las mencionadas condiciones tuvo también lugar un descenso del

contenido de proteínas foliares, 50,74 y 54,13 mg·g PF⁻¹ en plantas crecidas en deficiencia y abundancia de nitrógeno en CO₂ ambiente, frente a los 41,48 y 45,71 mg·g PF⁻¹ encontrados en similares condiciones nutricionales en CO₂ elevado, que se acompañó también de un ligero descenso de otros compuestos nitrogenados como las clorofilas. Aunque el nitrato disminuyó en las plantas crecidas en CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno -23,45 μmol·g PF⁻¹ - respecto a aquellas crecidas en CO₂ ambiente y abundancia de nitrógeno -38,17 μmol·g PF⁻¹ -, tendió a aumentar en las plantas crecidas en CO₂ elevado y deficiencia en nitrógeno -27 μmol·g PF⁻¹ - respecto a aquellas crecidas en CO₂ ambiente y deficiencia en nitrógeno -25,7 μmol·g PF⁻¹ -. Estos resultados sugieren que otro tipo de factores aparte del nivel de carbohidratos modifican los niveles de transcritos de la Rubisco en la hoja bandera del trigo. Miller et al. (1997) estudiando el desarrollo ontogénico de hojas de tabaco en condiciones de CO₂ ambiente y elevado, observaron que la senescencia foliar y la pérdida de capacidad fotosintética fue acelerada en condiciones de CO₂ elevado y propusieron que la aclimatación de la fotosíntesis es causada por una senescencia acelerada. Con posterioridad, Ludewig & Sonnewald (2000) excluyeron la acumulación de carbohidratos como una causa de represión de genes fotosintéticos en condiciones de CO₂ elevado, sugiriendo que la aclimatación de la fotosíntesis en las condiciones indicadas se relaciona con un cambio temporal en la ontogenia foliar. Parecería plausible que en nuestro experimento el crecimiento a concentraciones de CO₂ y temperatura elevados conlleve una aceleración del crecimiento y cambios en la ontogenia foliar que condicionen la variabilidad de los efectos observados en los transcritos de la Rubisco.

Finalmente, la variable correspondencia del nivel de transcritos con la acumulación de carbohidratos solubles, a la emergencia de la espiga, en los cultivos de trigo en el campo, pone de manifiesto que la influencia de otros factores puede modificar significativamente este efecto en la naturaleza. Resulta difícil de demostrar que la regulación por carbohidratos de la expresión génica pueda tener lugar usando trigo, especie vegetal en la que los efectos en el desarrollo por el enriquecimiento en CO₂ parecen ser muy pronunciados.

En estadios avanzados del desarrollo de los cultivos de trigo, **12 días después de la antesis** en la anualidad del **2004**, en plantas crecidas a temperaturas elevadas y abundancia de nitrógeno, el crecimiento en CO₂ elevado redujo notablemente los niveles de transcritos de la Rubisco, mientras que en plantas crecidas con nitrógeno abundante y temperaturas ambientales, el CO₂ elevado disminuyó ligeramente la expresión del enzima. En la primera de las situaciones descritas, el crecimiento en CO₂ elevado no se acompañó de una

acumulación de carbohidratos foliares sino, más bien, de un descenso de los mismos, siendo la sacarosa y la glucosa los azúcares que tendieron a disminuir en mayor medida; mientras que en la segunda de las situaciones descritas, los niveles de sacarosa tendieron a disminuir, y los de glucosa a aumentar. Sin embargo, en ninguna de las dos condiciones, el descenso de la expresión génica de la Rubisco, mostró una excesiva correlación con los niveles foliares de carbohidratos, como hemos podido comprobar en ciertas circunstancias en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo. Aunque sí que tuvo lugar una pérdida de proteínas totales, más drástica en el primero de los casos, en el que la pérdida de transcritos de Rubisco fue mayor, ya que en plantas crecidas a temperaturas elevadas y abundancia de nitrógeno, el crecimiento en CO₂ elevado redujo el contenido proteico a 29,20 mg·g PF⁻¹ respecto a los 39,18 mg·g PF⁻¹ encontrados en plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂. Sin embargo, en las plantas crecidas con nitrógeno abundante y temperaturas ambientales la reducción fue inferior, 34,23 mg·g PF⁻¹ frente a los 39,55 mg·g PF⁻¹ de proteínas encontradas en plantas crecidas en condiciones ambientales de CO₂. Resultados que ponen de manifiesto que el efecto del CO₂ elevado en la expresión de la Rubisco se asoció con el estado nitrogenado de la planta (Riviere-Rolland et al., 1996; Nakano et al., 1997; Farage et al., 1998; Geiger et al., 1999; Pérez et al., 2005).

Además, en el mencionado estadio de desarrollo foliar del trigo hemos podido observar que a concentraciones ambientales de CO₂, en plantas deficientes en nitrógeno, el incremento de la temperatura de crecimiento aumentó los niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco, a diferencia del descenso de expresión génica observado a la emergencia de la espiga. En dichas condiciones, los niveles foliares de sacarosa tendieron a disminuir, sin llegar a alcanzar significación estadística, aunque el descenso más notable en la concentración de carbohidratos solubles tuvo lugar en los fructanos. Carbohidratos que, por sí mismos, carecen de efectos directos en la expresión génica, pero bien podrían reflejar una mayor capacidad para producir niveles superiores de hexosas en el citoplasma (Nie et al., 1995b). El descenso de carbohidratos encontrado en la hoja bandera del trigo podría facilitar el aumento de transcritos de Rubisco, aún a pesar del ligero descenso de los niveles foliares de proteínas observado en las plantas crecidas a temperaturas elevadas -37,01 mg·g PF⁻¹ respecto a aquellas crecidas a temperaturas ambientales 41,40 mg·g PF⁻¹-, aunque desconocemos si la pérdida de proteína se acompañó de una reducción de Rubisco. Sin embargo, en las condiciones mencionadas podría ser previsible una pérdida de nitrógeno foliar consecuencia de la aceleración del crecimiento a

temperatura elevada, que se acompañó también de un ligero descenso de nitrato y otros compuestos nitrogenados como las clorofilas, variaciones que podrían incluso asociarse a cambios en la ontogenia foliar o una senescencia foliar acelerada (Besford et al., 1990; Hensel et al., 1993; Xu et al., 1994; Miller et al., 1997). En un estudio realizado en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación, la temperatura elevada, días después de la antesis, redujo los niveles foliares de Rubisco (Pérez et al., 2005). Posiblemente en nuestro experimento podría haber tenido también lugar una disminución de la proteína Rubisco, aún a pesar del incremento de transcritos del gen *rbcS*. Si bien, es destacable que a diferencia del incremento de fotosíntesis observado al elevar la temperatura en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo, en etapas más avanzadas del desarrollo del cultivo, la fotosíntesis no fue modificada con la temperatura de crecimiento.

Por otra parte, hemos podido también observar que en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno, la elevación de la temperatura redujo la expresión del gen *rbcS*. Mientras que los niveles foliares de sacarosa no fueron modificados por la elevación de la temperatura de crecimiento, los de glucosa tendieron a disminuir junto al resto de carbohidratos solubles, de manera que no tuvieron lugar cambios notables en el contenido foliar de carbohidratos entre las plantas crecidas a temperaturas ambientales y elevadas, que pudieran correlacionarse con el descenso de transcritos del gen *rbcS*. Aunque posiblemente el estado nitrogenado de la planta pudiera desempeñar un papel importante (Delgado et al., 1994), ya que las temperaturas elevadas condujeron a un descenso notable del contenido de proteínas foliares -29,20 mg·g PF⁻¹ frente a los 34,23 mg·g PF⁻¹ encontrados en las plantas crecidas a temperaturas ambientales-. Nuestras investigaciones previas en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación han mostrado evidencias de que en estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo las temperaturas elevadas con abundancia de nitrógeno, disminuyeron la cantidad de proteína Rubisco (Pérez et al., 2005), en consonancia con estudios desarrollados por otros autores (Vu et al., 1997).

En la anualidad del 2004, 12 dda, en plantas crecidas en CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno redujo los niveles de transcritos de *rbcS* en plantas crecidas a temperaturas elevadas. Mientras que la abundancia de nitrógeno tendió a disminuir los niveles foliares de sacarosa, tendió a aumentar los de glucosa, fructosa, e incluso fructanos. El ligero incremento de carbohidratos solubles encontrado en la hoja bandera del trigo de las plantas crecidas con nitrógeno abundante desconocemos si sería suficiente para superar el umbral

de carbohidratos necesario para inducir la represión génica de la Rubisco (Riviere-Rolland et al., 1996). Si bien, la pérdida de nitrógeno foliar podría ser nuevamente un factor decisivo en la pérdida de transcritos del gen *rbcS* (Riviere-Rolland et al., 1996; Nakano et al., 1997; Sicher & Bunce, 1997; Geiger et al., 1999; Pérez et al., 2005), y en especial los niveles de proteínas foliares, ya que en las plantas crecidas con abundancia de nitrógeno fueron notablemente inferiores $-29,20 \text{ mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ respecto a aquellas crecidas con deficiencia en dicho nutriente $-36,11 \text{ mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ cambios que se tradujeron en un ligero descenso de los contenidos foliares de nitrato y clorofilas.

Finalmente, en plantas crecidas en CO_2 ambiente, la abundancia de nitrógeno incrementó la expresión del gen *rbcS* a temperaturas ambientales. La acumulación de carbohidratos solubles fue menor en plantas crecidas con nitrógeno abundante que en aquellas crecidas con deficiencia en dicho nutriente, lo que aliviaría la represión de la Rubisco mediada por carbohidratos. Además, el contenido foliar de nitrato aumentó significativamente con el suministro de nitrógeno $-31,49 \mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ respecto a los $22,07 \mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ de las plantas crecidas en deficiencia en nitrógeno-, aunque el incremento de nitrato foliar no se tradujo en un aumento de proteínas foliares, puesto que los niveles foliares apenas fueron modificados por el suministro de nitrógeno.

En estadios tempranos del desarrollo de los cultivos de trigo, a la ***emergencia de la espiga*** en la anualidad del **2006**, el CO_2 elevado aumentó los niveles de transcritos de *rbcS* en plantas crecidas a temperaturas elevadas y abundancia de nitrógeno, al igual que los cambios observados en dicho estadio de desarrollo en la anualidad del 2004; si bien, estos transcritos no fueron modificados por el CO_2 de crecimiento en las plantas crecidas a temperaturas elevadas y deficiencia en nitrógeno, en contraste al aumento observado en la anualidad del 2004. El crecimiento en CO_2 elevado condujo a una acumulación notable de carbohidratos foliares, ya de por sí mucho más elevados que en las hojas de las plantas de trigo correspondientes a la experimentación de la anualidad 2004 (ver apartado 5.4), por lo que la ausencia de un descenso de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco, contradice la apreciación del control de la expresión génica de la Rubisco por la acumulación de carbohidratos inducida por el CO_2 elevado (Van Oosten & Besford, 1996; Drake et al., 1997). Además en las condiciones indicadas tuvo también lugar un descenso del contenido de proteínas foliares $-41,84 \text{ mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ en las plantas crecidas en CO_2 elevado frente a los $54,83 \text{ mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$ encontrados en las plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO_2 -, que se acompañó de un descenso de otros compuestos nitrogenados como las clorofilas, mientras que los niveles foliares de nitrato

no fueron modificados por el CO₂ de crecimiento. Resultados que sugieren que otro tipo de factores aparte del nivel de carbohidratos y proteína modifican los niveles de transcritos de la Rubisco en la hoja bandera del trigo, posiblemente la interrelación C/N de la planta, o bien un cambio temporal en la ontogenia foliar (Ludewig & Sonnewald, 2000).

De manera similar a la experimentación desarrollada en el 2004, en las plantas crecidas en CO₂ ambiente, la elevación de la temperatura redujo la abundancia de transcritos del gen *rbcS* en plantas deficientes en nitrógeno. Si bien, en las plantas crecidas con nitrógeno abundante los transcritos de la Rubisco no variaron con la temperatura elevada, a diferencia del descenso encontrado en la anualidad del 2004. Sin embargo, mientras que en la experimentación del 2004, la elevación de la temperatura, aumentó la asimilación fotosintética del carbono, en la anualidad del 2006 la fotosíntesis no fue modificada por la temperatura de crecimiento. Al igual que en la anualidad anterior, los carbohidratos, en especial la sacarosa, disminuyeron respecto a las plantas crecidas a temperaturas ambientales, pero la expresión del gen *rbcS* disminuyó, en sintonía con el descenso observado en cultivos de soja (Vu et al., 1997), en algunos cultivares de arroz (Gesch et al., 2003), y en nuestros estudios previos con trigo (Pérez et al., 2005) y a diferencia del incremento observado en otros cultivares de arroz (Gesch et al., 2003). Además, la elevación de la temperatura condujo a una pérdida significativa del contenido foliar de nitrato -21,49 y 16,44 $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ en plantas crecidas a temperaturas ambientales y elevadas, respectivamente- que se tradujo en un ligero aumento del contenido de proteínas foliares, secundado también por un pequeño incremento de otros compuestos nitrogenados como las clorofilas. Aún a pesar de que las proteínas aumentaron, pudiera ocurrir que los niveles de proteína Rubisco disminuyesen en consonancia con el ligero descenso de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco, como ha sido observado en un estudio previo realizado en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación (Pérez et al., 2005).

Finalmente, en estadios tempranos del desarrollo de los cultivos de trigo en plantas crecidas en CO₂ ambiente, la abundancia de nitrógeno disminuyó la expresión génica de *rbcS* tanto en las plantas crecidas a temperaturas ambientales como a temperaturas elevadas. Mientras que en las plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno incrementó notablemente los niveles foliares de hexosas -glucosa y fructosa-, y apenas modificó los de sacarosa; en las plantas crecidas a temperaturas elevadas los niveles de hexosas fueron sólo ligeramente aumentados, y los de sacarosa aumentaron en mayor medida. Si bien, parecería plausible que la acumulación de carbohidratos solubles

desencadenase la pérdida de transcritos del gen *rbcS* (Krapp et al., 1993; Sheen, 1994; Van Oosten & Besford, 1996; Drake et al., 1997; Moore et al., 1999). Aunque desconocemos si el descenso de transcritos de *rbcS* se tradujo en un descenso de los niveles foliares de proteína Rubisco, sí que tuvo lugar un aumento de proteínas foliares en condiciones de abundancia en nitrógeno -de 39,95 a 57,53 mg·g PF⁻¹ en las plantas crecidas a temperaturas ambientales, y de 44,78 a 54,83 mg·g PF⁻¹ en aquellas crecidas a temperaturas elevadas-. Los aumentos de proteínas descritos se acompañaron también de una mayor acumulación de clorofilas y de un descenso significativo de los niveles foliares de nitrato.

Los cambios en los niveles de transcritos del gen que codifica la subunidad pequeña de la Rubisco, **15 días después de la antesis** en la anualidad del **2006** muestran que en plantas crecidas a temperaturas ambientales y abundancia de nitrógeno, el CO₂ elevado aumentó la expresión génica de *rbcS*. A diferencia del descenso de expresión observado en estadios similares del desarrollo foliar del trigo en la anualidad del 2004. Además, el crecimiento en CO₂ elevado aumentó también la expresión de *rbcS* en plantas crecidas a temperaturas elevadas y deficiencia en nitrógeno. En la primera de las condiciones descritas los niveles de sacarosa y glucosa tendieron a disminuir, mientras que en la segunda de las condiciones, los niveles de sacarosa disminuyeron notablemente y los de glucosa tendieron a aumentar, de manera que el ligero descenso de la concentración foliar de carbohidratos solubles en plantas que acumulan cantidades elevadas de azúcares, consecuencia de la mayor deficiencia nutricional inducida en la experimentación de esta anualidad respecto a la del 2004 (ver apartado 5.4 y 3.2), y más aún, en estadios avanzados del desarrollo del cultivo, podría aliviar la represión mediada por carbohidratos del gen *rbcS*, facilitando el aumento de transcritos de la Rubisco (Krapp et al., 1993; Sheen, 1994). Aunque desconocemos si el aumento de transcritos se tradujo en un aumento de proteína Rubisco, en ambas condiciones el CO₂ elevado condujo a un drástico descenso de la concentración foliar de nitrato -9,61 y 6,97 μmol·g PF⁻¹ en las plantas crecidas en CO₂ elevado tanto a temperaturas ambientales y abundancia de nitrógeno como a temperaturas elevadas y deficiencia en nitrógeno, respectivamente, frente a los 19,77 y 16,78 μmol·g PF⁻¹ en las plantas crecidas a niveles ambientales de CO₂ en las condiciones previamente descritas-. Aunque el descenso de los niveles de nitrato no se acompañó de un aumento de proteínas foliares, sino de un descenso de las mismas, que no llegó a alcanzar significación estadística, siendo en la primera de las condiciones descritas 42,28 frente a 47,07 mg·g PF⁻¹ en plantas crecidas en CO₂ elevado y ambiente -a temperaturas ambientales y abundancia

de nitrógeno- y en la segunda de las condiciones 29,56 frente a 33,92 mg·g PF⁻¹ en plantas crecidas en CO₂ elevado y ambiente -a temperaturas elevadas y deficiencia en nitrógeno-.

Finalmente, en plantas crecidas en CO₂ y temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno disminuyó los niveles de transcritos de *rbcS*, efecto contrario al observado en estadios similares del desarrollo del cultivo en la anualidad del 2004. Mientras que en plantas crecidas a [CO₂] y temperatura elevadas, la abundancia de nitrógeno redujo la expresión del gen *rbcS*, en consonancia con los resultados descritos 12 dda en la anualidad del 2004. Las hexosas y la sacarosa fueron los carbohidratos que mostraron variaciones más notables en ambas condiciones: si en la primera de las condiciones descritas los niveles de sacarosa tendieron a disminuir ligeramente y los de las hexosas -glucosa y fructosa- tendieron a aumentar en mayor medida, en conjunto, la abundancia de nitrógeno condujo a un ligero incremento de la acumulación de carbohidratos foliares; en la segunda de las condiciones, la sacarosa fue el carbohidrato acumulado en mayor medida, mientras que los niveles de hexosas apenas fueron modificados por el suministro de nitrógeno. Aunque en las condiciones mencionadas no existe una excesiva acumulación de carbohidratos solubles que justifiquen el descenso de transcritos del gen *rbcS*, podría ser posible que en aquellas condiciones en las que los carbohidratos solubles se acumulan en mayor medida, una ligera variación en sus niveles foliares podría sentirse con mayor facilidad. Si bien, aunque los transcritos de la Rubisco disminuyeron, la abundancia de nitrógeno condujo a una mayor acumulación de nitrato foliar, que se tradujo en un incremento notable de la concentración foliar de proteínas totales con respecto a las plantas crecidas en deficiencia en nitrógeno, de 35,53 a 47,07 mg·g PF⁻¹ en condiciones ambientales de CO₂ y temperatura, y de 29,56 a 37,07 mg·g PF⁻¹ en plantas crecidas en CO₂ y temperatura elevados.

Los cambios en la regulación de la expresión génica de la Rubisco en estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo en la anualidad del 2006 no parecen mostrar demasiada correlación con la concentración foliar de carbohidratos solubles (Sheen, 1994) o con el estado nitrogenado de la planta (Nakano et al., 1997), sino más bien con cambios en la ontogenia foliar (Miller et al., 1997) o el desarrollo de la planta (Ziska et al., 1995) que pudieran conducir a una senescencia acelerada (Ludewig & Sonnewald, 2000).

En definitiva, como se ha indicado en varias ocasiones en este apartado, los resultados de expresión génica parecen mostrar una escasa correlación con los niveles de carbohidratos y las respuestas de aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado no pueden

predecirse por cambios en los niveles de mensajero de la Rubisco. La variabilidad de respuestas encontradas, según las metodologías experimentales usadas en las investigaciones realizadas en condiciones de CO₂ elevado y la especie vegetal objeto de estudio, ponen de manifiesto que las plantas que crecen en ambientes naturales ajustan el crecimiento a la influencia de factores ambientales que repercutirán en los cambios de expresión génica. Estudios de expresión génica global parecen indicar que la adaptación de las especies a su hábitat, junto a su plasticidad genética intrínseca, parecen determinar la naturaleza de las respuestas al CO₂ elevado (Li et al., 2006).

5.4. El crecimiento en CO₂ elevado conduce a una acumulación de carbohidratos en la hoja bandera del trigo, mientras que las temperaturas elevadas y la abundancia de nitrógeno disminuyen sus niveles en etapas tempranas del desarrollo. Efectos que se atenúan en estadios más avanzados

Se sabe que el crecimiento en CO₂ elevado típicamente conduce a un aumento del contenido de carbohidratos no estructurales (Stitt, 1991), pero la extensión en la que ocurren dichos cambios varía, dependiendo de la especie vegetal y las condiciones de crecimiento (Poorter et al., 1997; Moore et al., 1998). En general, la acumulación de almidón u otros carbohidratos de almacenaje es mayor que el incremento de los restantes azúcares (Poorter et al., 1997; Fonseca et al., 1997; Moore et al., 1997) y la magnitud de los cambios entre los distintos tipos de carbohidratos difiere entre especies vegetales (Moore et al., 1998; Stitt & Krapp, 1999; Pérez et al., 2005). En nuestro experimento, en etapas tempranas del desarrollo foliar del trigo *-emergencia de la espiga-* correspondiente a la anualidad del **2004**, el crecimiento en concentraciones elevadas de CO₂ atmosférico condujo a un aumento significativo de los niveles de sacarosa y fructanos en la hoja bandera, 4 horas después del comienzo del periodo luminoso, mientras que las hexosas -glucosa y fructosa- tendieron a aumentar sin llegar a alcanzar significación estadística y los niveles de almidón mostraron un ligero incremento, no significativo. Cambios similares en los niveles foliares de carbohidratos se han encontrado en trigo de primavera cultivado en el campo empleando el sistema FACE (Nie et al., 1995b), aunque a diferencia de nuestros resultados, en este estudio los niveles de almidón aumentaron notablemente. Un mayor contenido de almidón ha sido también encontrado en trigo de invierno en condiciones de CO₂ elevado (Sicher & Bunce, 1997). En cuanto al patrón de acumulación de carbohidratos en la hoja bandera de plantas de trigo crecidas en cámaras de gradiente de temperatura a la emergencia de la espiga, la sacarosa fue el carbohidrato acumulado en

mayor medida; y aún a pesar de que la acumulación de fructanos fue menor, sus niveles fueron elevados a ambos niveles de CO₂ de crecimiento; más aún en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado. Sin embargo, los niveles de almidón fueron muy bajos comparados con los carbohidratos antes mencionados; cambios similares en el patrón de acumulación de estos azúcares han sido encontrados en estudios previos con trigo en el campo (Nie et al., 1995b; Pérez et al., 2005), lo que refleja la estrategia normal de almacenaje en esta especie vegetal.

En estadios avanzados del desarrollo, *12 días después de la antesis*, en la anualidad del **2004**, la acumulación de carbohidratos -hexosas, sacarosa, fructanos y almidón- en la hoja bandera fue notablemente mayor que en etapas más jóvenes del crecimiento, en la emergencia de la espiga. Resultados que contrastan con los descensos encontrados en los niveles de fructanos y almidón en plantas de trigo crecidas en el campo en el estadio del cultivo correspondiente a la antesis (Nie et al., 1995b), aunque el contenido foliar de sacarosa sí que aumentó. Un incremento de los niveles de azúcares en la hoja en etapas más avanzadas del crecimiento de la planta sugiere que en ausencia de sumideros potentes que demanden fotoasimilados tiene lugar una acumulación foliar de los mismos (Drake et al., 1997; Moore et al., 1999; Farrar & Williams, 1991; Allen et al., 1988; Delgado et al., 1994; Jacob et al., 1995). A su vez, podría ser sintomático de una mayor deficiencia nutricional inherente al desarrollo y envejecimiento de la planta, ya que la aceleración del crecimiento y el aumento de biomasa a [CO₂] elevadas podrían facilitar la limitación nutricional de la planta (Stitt & Krapp, 1999) y se sabe que la deficiencia en nitrógeno conduce a una mayor acumulación de carbohidratos (Stitt et al., 2002; Scheible et al., 2004). Sin embargo, el crecimiento prolongado a concentraciones elevadas de CO₂ no condujo a cambios significativos en los niveles de carbohidratos respecto a las plantas crecidas a concentraciones ambientales. En un estudio previo con trigo de primavera, cultivado en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación, se ha observado también que el incremento del contenido foliar de carbohidratos no estructurales causado por el crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado a la emergencia de la espiga desapareció después de la antesis (Pérez et al., 2005). Es también destacable que la mayor acumulación de sacarosa y fructanos encontrada a la emergencia de la espiga, no sólo no ha sido observada después de la antesis en plantas crecidas en CO₂ elevado, sino que los niveles de dichos carbohidratos tendieron a disminuir sin llegar a alcanzar significación estadística, posiblemente consecuencia de la mayor provisión de esqueletos carbonados requerida para mantener un crecimiento más acelerado en las

condiciones mencionadas (Stitt & Krapp, 1999). Resultados opuestos al incremento del contenido foliar de sacarosa y fructanos encontrado en la hoja bandera del trigo en un estadio similar de desarrollo del cultivo empleando el sistema FACE (Nie et al., 1995b).

En la anualidad del 2006, en ambos estadios del desarrollo foliar del trigo -emergencia de la espiga y antesis-, los niveles de carbohidratos fueron sustancialmente más elevados que en la anualidad del 2004. Como ya se ha indicado en el capítulo de materiales y métodos (apartado 3.2), en la anualidad del 2006, se evitó el abonado de fondo con fertilizante nitrogenado, con el fin de conseguir diferencias más notables entre los tratamientos de abundancia y deficiencia en dicho nutriente, por lo que la mayor acumulación de carbohidratos en las plantas de trigo en esta anualidad podría atribuirse a una deficiencia nutricional más intensa respecto a la experimentación desarrollada en el 2004. A esta apreciación, podría también unirse un crecimiento ligeramente más acelerado en esta última anualidad respecto a la del 2004, consecuencia de las condiciones climatológicas inherentes a la primavera del 2006. Aunque la mayor limitación en nitrógeno en las plantas de trigo de la experimentación del 2006 se puso de manifiesto, no sólo por la mayor acumulación de carbohidratos foliares, sino también por el menor contenido de nitrato foliar encontrado, de manera generalizada, en la hoja bandera del trigo independientemente del factor ambiental objeto de estudio.

En estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo, *emergencia de la espiga*, en la anualidad del **2006**, el crecimiento en CO₂ elevado condujo a una mayor acumulación de carbohidratos de reserva en consonancia con los resultados obtenidos en trigo en otros estudios (Nie et al., 1995b; Pérez et al., 2005). En relación con la anualidad del 2004, los niveles de fructanos aumentaron significativamente; si bien los de sacarosa, aunque aumentaron, no llegaron a alcanzar significación estadística. Los mayores niveles de sacarosa, junto con los de fructanos, encontrados en la hoja bandera del trigo reflejan la estrategia normal de almacenaje de carbono de esta especie vegetal y la similitud de los resultados entre ambas anualidades. Las concentraciones foliares de glucosa, fructosa y almidón mostraron interacciones significativas con alguno de los factores ambientales. El crecimiento en CO₂ elevado disminuyó notablemente el contenido de estas hexosas en plantas crecidas a temperaturas ambientales, y redujo también los niveles de glucosa en condiciones de abundancia en nitrógeno, sugiriendo que, en ambos casos, tuvo lugar un mayor uso de esqueletos carbonados para la incorporación del nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos, necesarios para el mantenimiento de un crecimiento más acelerado respecto a las plantas crecidas a [CO₂] ambientales (Stitt, 1991).

Además, otra de las interacciones, puso de manifiesto que en plantas deficientes en nitrógeno, el CO₂ elevado aumentó notablemente los niveles de almidón, consecuencia del descenso de la concentración foliar de nitrato encontrada en dichas condiciones, que estimularía la síntesis de almidón por inducción de la expresión génica de alguno de los genes que codifica la ADP-glucosa pirofosforilasa (Scheible et al., 1997a).

En estadios más avanzados del desarrollo foliar del trigo, *15 dda*, en la anualidad del **2006**, la acumulación de carbohidratos en la hoja bandera del trigo fue también mayor que en etapas más jóvenes del crecimiento del cultivo, al igual que en la anterior anualidad. El crecimiento en CO₂ elevado incrementó el contenido de almidón y también los niveles de glucosa en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, resultados atribuibles al descenso notable de la concentración de nitrato foliar en las mencionadas condiciones, indicativo de una deficiencia en nitrógeno más acentuada y posiblemente una mayor limitación en la provisión de compuestos orgánicos nitrogenados con la consiguiente acumulación de carbohidratos (Scheible et al., 1997a; Geiger et al., 1999; Scheible et al., 2004; Fritz et al., 2006b).

El crecimiento a temperaturas 2 °C superiores a las ambientales, a la *emergencia de la espiga*, en la anualidad del **2004**, disminuyó los niveles de sacarosa y almidón y tendió a disminuir, sin llegar a alcanzar significación estadística, los niveles de fructanos. Cambios similares en los niveles de azúcares han sido encontrados previamente en las mismas condiciones de crecimiento (Pérez et al., 2005). Resultados que concuerdan con la apreciación indicada por Morison & Lawlor (1999) de que la elevación de la temperatura podría conducir a una estimulación de la velocidad de desarrollo ontogénico, del crecimiento foliar y la acumulación de biomasa en las plantas, que se acompañaría de un descenso del contenido de carbohidratos. Disminución que podría también ser atribuible al incremento de la tasa respiratoria con la temperatura elevada y el consiguiente consumo de carbohidratos en la glicólisis y respiración mitocondrial (Tjoelker et al., 1999; Atkin et al., 2000). La reducción observada de los niveles foliares de almidón podría asociarse a la regulación a nivel transcripcional de esta ruta biosintética por carbohidratos, ya que existen evidencias de que la sacarosa y la glucosa aumentan la expresión de varios genes de la ADP-glucosa pirofosforilasa en plantas (Salanoubat & Belliard, 1989; Müller-Röber et al., 1990; Krapp & Stitt, 1995). La disminución de la concentración foliar de sacarosa a temperaturas elevadas podría conducir a un descenso de transcritos del gen que codifica la subunidad reguladora de la AGPasa foliar con la reducción consiguiente de la síntesis de almidón (Müller-Röber et al., 1990; Krapp & Stitt, 1995). Por otra parte, los niveles de

3PGA también disminuyeron significativamente en plantas crecidas a temperaturas elevadas, y un descenso de la concentración de dicho metabolito podría también limitar la actividad AGPasa, por ser un activador alostérico del enzima (Kleczkowski et al., 1993), previniendo la estimulación de la síntesis de almidón. Scheible et al. (1997a) señalaron que una inhibición preferencial de la síntesis de almidón y mantenimiento de niveles elevados de azúcares durante la asimilación de nitrato puede ser importante en plantas superiores porque la exportación y uso de aminoácidos depende de la producción y exportación simultánea de sacarosa.

En estadios avanzados del cultivo, **12 días después de la antesis**, en la anualidad del **2004**, el crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales redujo significativamente los niveles de carbohidratos de almacenaje, almidón y fructanos, mientras que los de sacarosa no fueron modificados. Un descenso en el contenido de carbohidratos ha sido encontrado en plantas que crecen a temperaturas cálidas (Rowland- Bamford et al., 1996). La aceleración del crecimiento previsible a temperaturas elevadas y la mayor demanda de los órganos en desarrollo conducirían a una atenuación de la biosíntesis de almidón y fructanos, para facilitar la exportación de sacarosa y el mantenimiento de la asimilación de nitrato, necesarios para el crecimiento y desarrollo vegetal (Morison & Lawlor, 1999; Scheible et al., 1997a).

En la anualidad del **2006**, a la **emergencia de la espiga**, el crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales también redujo significativamente los niveles foliares de sacarosa, al igual que en la anualidad anterior. Sin embargo, los niveles de glucosa y fructosa variaron en interacción con el CO₂ de crecimiento y con el suministro de nitrógeno, poniendo de manifiesto que la temperatura elevada redujo los niveles de estas hexosas en plantas crecidas en [CO₂] ambientales; y también en aquellas crecidas con abundancia de nitrógeno, indicando, en ambos casos, que la aceleración del crecimiento a temperaturas elevadas facilitaría el uso de carbohidratos (Stitt et al., 2002). En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo, **15 dda**, en dicha anualidad, los efectos se atenuaron con respecto al estadio anterior, ya que la temperatura elevada únicamente aumentó los niveles de glucosa en plantas crecidas en CO₂ elevado, posiblemente debido a la aceleración de crecimiento en dichas condiciones, y reflejado por la tendencia a la disminución de los carbohidratos de reserva (Stitt, 1991).

Finalmente, nuestros resultados mostraron que, a la **emergencia de la espiga**, en la anualidad del **2004**, en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno tendieron a disminuir

los niveles de sacarosa y fructanos y a aumentar los de fructosa, sin llegar a alcanzar significación estadística, mientras que los de almidón apenas variaron. Sin embargo, los niveles de glucosa aumentaron significativamente. La abundancia de nitrógeno aumentó también los niveles de glucosa en plantas de tabaco cultivadas con nitrógeno abundante, pero, a diferencia de los resultados encontrados con trigo, disminuyó significativamente los niveles de almidón, mientras que los de sacarosa apenas variaron con el nitrógeno (Fritz et al., 2006b). En contraste, en otro estudio con cultivos hidropónicos de tabaco, la fertilización nitrogenada aumentó significativamente los niveles de sacarosa, mientras que aumentó las hexosas y disminuyó el almidón (Geiger et al., 1999). Resultados que muestran que para la misma especie vegetal el patrón de acumulación de carbohidratos, aunque muy similar, varió en la extensión en la que la sacarosa fue acumulada dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno (Geiger et al., 1999; Fritz et al., 2006b). Ello hace suponer que en nuestro experimento las plantas fertilizadas con niveles inferiores de nitrógeno, no mostraron una deficiencia acusada en dicho nutriente, hasta el punto de que los niveles de almidón no aumentaron como se ha puesto de manifiesto en plantas de tabaco deficientes en dicho nutriente (Geiger et al., 1999; Fritz et al., 2006b) o en plántulas de *Arabidopsis* en cultivos líquidos (Scheible et al., 2004); alternativamente podría ser indicativo de la acumulación preferente de fructanos y sacarosa en esta especie vegetal (Morcuende et al., 2004a,b; Pérez et al., 2005; Gutiérrez et al., 2010). El descenso de carbono total encontrado en plantas crecidas con nitrógeno abundante sugiere que en abundancia de dicho nutriente prevalece la exportación del carbono para mantener una asimilación de nitrógeno aumentada (Stitt et al., 2002).

En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo, *12 dda* en la anualidad del **2004**, el patrón de acumulación de carbohidratos en la hoja bandera del trigo fue muy similar al observado en etapas tempranas del desarrollo, salvo que en este caso, también el aumento de los niveles foliares de fructosa, con la adición de más nitrógeno, alcanzó significación estadística. Un aumento de hexosas en las primeras horas del fotoperiodo ha sido encontrado con abundancia de nitrógeno en plantas de tabaco (Fritz et al., 2006b).

En la hoja bandera del trigo en la anualidad del **2006**, a la *emergencia de la espiga*, la abundancia de nitrógeno modificó los niveles de ambas hexosas en interacción con la temperatura, y los de glucosa en interacción con el CO₂ de crecimiento, poniendo de manifiesto que la abundancia de nitrógeno aumentó los niveles foliares de las hexosas en plantas crecidas a temperaturas ambientales; e incrementó el contenido de glucosa en condiciones ambientales de CO₂, sugiriendo una menor exportación de carbono

consecuencia de una velocidad de crecimiento ralentizada a temperaturas ambientales, en el primer caso, y a [CO₂] ambientales, en el segundo, con respecto a dichos factores elevados (Geiger et al., 1999; Stitt et al., 2002; Fritz et al., 2006b).

Además, aunque los niveles de sacarosa y fructanos no fueron modificados significativamente por la adición de nitrógeno al suelo, el contenido en almidón varió con el CO₂ de crecimiento, mostrando que en plantas crecidas en CO₂ elevado, la abundancia de nitrógeno redujo los niveles de dicho carbohidrato, resultados que reflejan el papel del nitrato en la regulación de la biosíntesis de almidón (Scheible et al., 1997a) y que, a diferencia de la anualidad anterior, sugieren que las plantas suministradas con bajo aporte en nitrógeno mostraron una deficiencia más acusada en dicho nutriente, como se puso de manifiesto en otros estudios (Geiger et al., 1999; Fritz et al., 2006b; Scheible et al., 2004). Posiblemente, debido a la mayor diferencia en el estado nitrogenado de las plantas de trigo en la anualidad del 2006, hubo una alteración más acentuada de la relación C/N en las diferentes condiciones ambientales, que se puso de manifiesto por el incremento de las interacciones entre factores ambientales. En estadios más avanzados del desarrollo *-15 dda-*, en esta última anualidad *-2006-*, la abundancia de nitrógeno no modificó significativamente los niveles foliares de carbohidratos, cambios similares a los observados por Pérez et al. (2005).

En definitiva, los resultados de los carbohidratos entre las diferentes anualidades y estadios de desarrollo muestran evidencias de la existencia de ciertas variaciones entre anualidades o estaciones (Batts et al., 1998; Ziska et al., 1996), con el suministro de nitrógeno y las condiciones climatológicas (Mitchell et al., 1993, 1996; Ziska et al., 1996), que a su vez tendrán influencia en la asimilación del nitrógeno (Lewis et al., 2000).

5.5. La actividad nitrato reductasa es diferencialmente regulada en respuesta a los diferentes factores ambientales

El nitrógeno es esencial para el crecimiento de las plantas (Marschner, 1995). Se requiere para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, los cuales son los precursores de una amplia variedad de compuestos, entre los que se incluyen proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos, cofactores, metabolitos secundarios, etc., los cuales desempeñan papeles diversos en la señalización, como componentes estructurales y en mecanismos de adaptación (Tschoep et al., 2009). En la mayoría de las plantas de cultivo, no leguminosas, la hoja es el órgano dominante para la síntesis y distribución de aminoácidos, empleándose la energía y esqueletos carbonados producidos en la fotosíntesis para asimilar el nitrógeno

inorgánico en compuestos orgánicos. El principal punto de control en la coordinación de la asimilación primaria del carbono y nitrógeno en hojas es la nitrato reductasa, que controla el flujo en la asimilación de nitrógeno (Foyer et al., 2003) y cataliza la reducción de nitrato a nitrito, que es posteriormente transformado a amonio por la acción concertada del enzima nitrito reductasa (Crawford, 1995).

En nuestro experimento, en las primeras horas de luz, en torno a las 4 horas después del comienzo del fotoperiodo, el crecimiento en CO₂ elevado tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, la actividad NR en la hoja bandera del trigo en etapas tempranas del desarrollo *-emergencia de la espiga-* en la anualidad **2004**, aún a pesar de la mayor acumulación de carbohidratos encontrada en plantas crecidas en dichas condiciones, resultados contrarios al descenso observado por Hocking & Meyer (1991). Estudios realizados con diferentes especies vegetales, en los que fueron empleados distintos sistemas experimentales para la elevación de los niveles atmosféricos de CO₂, no muestran evidencias convincentes de que la actividad NR sea incrementada. Mientras que el CO₂ elevado condujo a un ligero aumento de actividad en plantas de mostaza (Maevskaya et al., 1990), *Plantago major* (Fonseca et al., 1997), *Vigna radiata* (Sharma & Sen Gupta, 1990) y plántulas de tabaco (Geiger et al., 1998), produjo un descenso en trigo (Hocking & Meyer, 1991), cebada (Sicher, 2001) y tabaco en cultivos hidropónicos (Ferrario-Mery et al., 1997). Sin embargo, Geiger et al. (1998) mostraron que aunque las concentraciones elevadas de CO₂ no incrementaron significativamente la actividad NR en hojas de tabaco en el momento de máxima fotosíntesis, sí que modificaron la regulación diurna del enzima, permitiendo una mayor actividad en la última parte del periodo luminoso y durante la noche. Proponiéndose que dicha modificación facilitaría el ajuste de la absorción y asimilación del nitrógeno mineral cuando exista una mayor demanda de nitrógeno como consecuencia de la aceleración del crecimiento previsible en CO₂ elevado. Una alteración similar de los cambios diurnos de la actividad NR ha sido observada en trigo cultivado en condiciones análogas a las descritas en la presente experimentación (Morcuende et al., 2004b; Gutiérrez et al., 2010). Nuestros resultados evidencian la gran variabilidad encontrada en la respuesta de la actividad NR en condiciones de CO₂ elevado, aún a pesar de que el suministro de carbohidratos estimula la asimilación de nitrato (Scheible et al., 1997b; Morcuende et al., 1998). Pues los azúcares aumentan la expresión de la NR (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993; Krapp et al., 1993; Krapp & Stitt, 1995), la actividad y la activación post-traducciona del enzima (Kaiser & Huber, 1994; Huber et al., 1996; Morcuende et al., 1998). Por ello dado que se trata de un enzima sujeto a una fuerte

regulación diurna de los niveles de transcritos y de la actividad, que son el resultado de complejos mecanismos que afectan a la actividad, la expresión del enzima y los niveles de proteína (Galangau et al., 1988), cualquier cambio en los niveles de carbohidratos y metabolitos del nitrógeno desempeñará un papel importante en su regulación (Nussaume et al., 1995; Scheible et al., 1997a).

En nuestras condiciones, la explicación más plausible de por qué el CO₂ elevado no llegó a aumentar significativamente la actividad NR, aún a pesar del incremento de carbohidratos, se asoció a la disponibilidad de nitrato, puesto que el crecimiento en dichas condiciones disminuyó notablemente el contenido foliar del mismo, el cual es un potente activador de la expresión del enzima (Hoff et al., 1994; Crawford, 1995; Scheible et al., 1997c). Un descenso en nitrato y en la concentración total de nitrógeno en plantas crecidas en CO₂ elevado ha sido encontrado frecuentemente (Coleman et al., 1991; Pettersson et al., 1993; Pettersson & MacDonald, 1994; Ferrario-Mery et al., 1997; Luo et al., 2004; Ainsworth et al., 2007).

En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo en la anualidad del **2004, 12 días después de la antesis**, el crecimiento en CO₂ elevado modificó la actividad nitrato reductasa en interacción con el suministro de nitrógeno mostrando que a [CO₂] elevadas la actividad NR disminuyó en plantas crecidas con nitrógeno abundante y aumentó en plantas deficientes en dicho nutriente. El primero de los efectos podría atribuirse al descenso significativo del contenido foliar de nitrato encontrado en plantas crecidas en CO₂ elevado y abundancia de nitrógeno respecto a aquellas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂, y por tanto, habría una menor inducción de la expresión del enzima (Vincentz et al., 1993; Scheible et al., 1997a; Wang et al., 2000, 2003; Scheible et al., 2004). Mientras que el segundo de los efectos podría ser el resultado del concurso de varios mecanismos de regulación de la NR, ya que en plantas deficientes en nitrógeno el CO₂ elevado incrementó ligeramente los niveles de nitrato y redujo los de glutamina, lo que facilitaría la actividad de la NR (Vincentz et al., 1993; Morcuende et al., 1998). Así mismo, en dichas condiciones tuvo lugar un pequeño incremento de los niveles foliares de glucosa, que se sabe que aumenta la expresión, la actividad y el estado de activación del enzima (Cheng et al., 1992; Morcuende et al., 1998), favoreciéndose en definitiva un aporte extra de carbono sobre las elevadas concentraciones de carbohidratos encontradas en la hoja bandera del trigo en esta etapa avanzada del desarrollo foliar, que facilitaría el aumento de actividad NR.

El crecimiento en CO₂ elevado a la *emergencia de la espiga* en la anualidad del **2006** modificó la actividad NR en interacción con la temperatura de crecimiento. Cambios que pusieron de manifiesto que en plantas crecidas a temperaturas ambientales, el CO₂ elevado aumentó la actividad del enzima, efecto que podría asociarse al mayor contenido de carbohidratos a temperaturas ambientales, en especial glucosa, que al igual que la sacarosa aumentan la actividad del enzima (Morcuende et al., 1998). Sin embargo, **15 días después de la antesis**, la actividad nitrato reductasa no varió con el CO₂ de crecimiento, indicando, por tanto, que los cambios observados en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo en la anualidad del 2006 desaparecieron en etapas posteriores del crecimiento del cultivo; a diferencia de las variaciones encontradas en la anualidad del 2004. La variabilidad encontrada entre anualidades podría derivarse de la acentuación de la deficiencia nutricional en la experimentación del 2006 que podría conducir a un acortamiento del periodo de crecimiento o una senescencia foliar más temprana respecto a la anualidad del 2004 (Morison & Lawlor, 1999).

A la *emergencia de la espiga* en la anualidad del **2004** en plantas crecidas a temperaturas 2 °C superiores a las ambientales, la actividad NR disminuyó significativamente. Esta pérdida de actividad se asoció con el descenso del contenido foliar de sacarosa, a pesar de que los niveles de Gln fueron también disminuidos en las hojas del trigo en dichas condiciones. Existen evidencias de que la Gln reprime la expresión de la NR (Vincentz et al., 1993; Hoff et al., 1994) y disminuye la actividad y el estado de activación del enzima (Morcuende et al., 1998), por lo que un descenso de los niveles de dicho metabolito podría facilitar el incremento de la actividad del enzima. Mientras que la sacarosa ejercería el efecto contrario a nivel de expresión, actividad y activación de la NR (Vincentz et al., 1993; Kaiser & Huber, 1994; Morcuende et al., 1998). Sin embargo, Morcuende et al. (1998) mostraron que cuando la sacarosa y la Gln son suministradas conjuntamente a hojas cortadas de tabaco el efecto en la actividad y el estado de activación de la NR fue antagónico al de la Gln, prevaleciendo el efecto de la sacarosa. Estos cambios justificarían el descenso de actividad NR encontrado en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales. Un mecanismo alternativo, no descrito hasta el momento para las plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, podría también explicar este descenso de actividad NR, y será indicado más adelante (ver apartado 5.6).

En etapas más avanzadas del desarrollo foliar del trigo, **12 dda**, en la anualidad del **2004**, en plantas crecidas a temperaturas elevadas la actividad nitrato reductasa tendió a disminuir sin llegar a alcanzar significación estadística, aún a pesar del descenso

significativo en el contenido foliar de nitrato encontrado en las mencionadas condiciones (Scheible et al., 1997a; Stitt, 1999). Los niveles de Gln también disminuyeron, aspecto que favorecería el incremento de actividad del enzima (Vincentz et al., 1993; Morcuende et al., 1998); sin embargo, el contenido foliar de sacarosa, a diferencia del descenso encontrado en etapas tempranas del desarrollo, no fue modificado con la elevación de la temperatura de crecimiento y sus niveles notablemente superiores a los encontrados en el estadio previo, lo que podría facilitar que la pérdida de actividad fuese más atenuada que en la emergencia de la espiga.

En la experimentación realizada en la anualidad del **2006**, en etapas tempranas del desarrollo foliar del trigo *-emergencia de la espiga-*, la temperatura elevada disminuyó la actividad NR, al igual que en la anualidad del 2004, pero en interacción con el CO₂ de crecimiento, mostrando que la elevación de la temperatura disminuyó la actividad del enzima en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado atribuible al descenso de la concentración foliar de nitrato que conduciría a una inhibición de la expresión génica del enzima y posiblemente un menor contenido proteico y actividad NR (Scheible et al., 1997a,b). En estadios avanzados del desarrollo *-15 dda-* la actividad NR fue modificada en interacción con la adición de nitrógeno al suelo, poniendo de manifiesto que en plantas deficientes en nitrógeno, el crecimiento a temperaturas elevadas redujo la actividad NR, cambios que podrían asociarse a la pérdida de nitrato foliar, con la consiguiente inhibición en la expresión del enzima (Vincentz et al., 1993; Scheible et al., 1997a; Geiger et al., 1998; Forde & Clarkson, 1999; Stitt, 1999).

En plantas crecidas con abundancia de nitrógeno en la *emergencia de la espiga*, en la anualidad del **2004**, la actividad NR tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística. Se sabe que el nitrato induce la expresión de genes involucrados en su absorción, así como de los enzimas responsables de su reducción, nitrato y nitrito reductasa (Cheng et al., 1992; Koch, 1997; Crawford & Glass, 1998; Forde & Clarkson, 1999; Stitt, 1999; Wang et al., 2000; Wang et al., 2003; Scheible et al., 2004) y ciertos genes involucrados en la asimilación posterior del nitrógeno en compuestos orgánicos nitrogenados (Wang et al., 2000; Wang et al., 2003; Scheible et al., 2004). En nuestro experimento el aumento de la disponibilidad de nitrato no se tradujo en un incremento del contenido foliar de nitrato en la hoja bandera del trigo, sugiriendo que tuvo lugar una inducción de la reducción del nitrato absorbido, facilitándose la canalización del nitrógeno y el carbono asimilado hacia la síntesis de aminoácidos, que condujo a un incremento de los niveles de aminoácidos mayoritarios, en especial, glutamina y se acompañó de un

aumento de los niveles foliares de otros compuestos orgánicos nitrogenados, como las proteínas y clorofila (ver apartado 5.7). De manera que en las primeras horas del fotoperiodo en plantas crecidas con nitrógeno abundante pudo tener lugar una retroinhibición de la expresión y la actividad NR, mediada por Gln (Vincentz et al., 1993; Hoff et al., 1994; Scheible et al., 1997b; Geiger et al., 1999; Morcuende et al., 1998). Un aumento significativo de la actividad NR ha sido encontrado en plantas de tabaco fertilizadas con nitrógeno abundante respecto a aquellas crecidas con deficiencia en dicho nutriente, si bien la adición de nitrato en las primeras fue diez veces superior a la de las segundas (Fritz et al., 2006b). En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo *-12 dda-* en la anualidad del **2004**, la abundancia de nitrógeno modificó la actividad NR significativamente en interacción con el CO₂ de crecimiento, poniendo de manifiesto que en plantas crecidas a [CO₂] ambientales, la abundancia de nitrógeno incrementó la actividad NR, atribuible al incremento notable del contenido foliar de nitrato observado en dichas condiciones (Vincentz et al., 1993; Scheible et al., 1997a).

Por su parte, en la experimentación realizada en la anualidad del **2006**, a la **emergencia de la espiga**, al igual que en la anualidad del 2004, las plantas crecidas en abundancia de nitrógeno mostraron un ligero aumento de la actividad NR, no significativo, atribuible no sólo al incremento de nitrato, sino también al incremento del contenido foliar de glucosa (Morcuende et al., 1998). Además, en etapas más tardías del desarrollo *-15 dda-*, a diferencia de la anualidad del 2004, la abundancia de nitrógeno modificó la actividad NR en interacción con la temperatura de crecimiento, poniendo de manifiesto que en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno disminuyó dicha actividad, cambios que podrían asociarse al descenso de nitrato encontrado en dichas condiciones (Vincentz et al., 1993; Scheible et al., 1997a; Geiger et al., 1998; Forde & Clarkson, 1999; Stitt, 1999).

Finalmente, es destacable mencionar que la NR está sujeta a una fuerte regulación post-traducciona (Kaiser & Huber, 1994) que involucra la fosforilación del enzima y posterior unión, dependiente de magnesio, de una proteína inhibitoria del tipo 14-3-3 (Bachmann et al., 1996c; Moorhead et al., 1996). Proceso que puede ser monitorizado por valoración de la actividad del enzima en presencia o ausencia de magnesio, pudiendo detectarse la inactivación de la NR como un descenso en la sensibilidad a la inhibición por magnesio (Kaiser & Huber, 1994); y se sabe que los cambios rápidos en la actividad NR, asociados a modificaciones post-traduccionales, se superponen a cambios en la expresión del enzima. En nuestro experimento, a la **emergencia de la espiga** en la anualidad del **2004**,

únicamente la elevación de la temperatura modificó el estado de activación en interacción con el CO₂ de crecimiento, poniendo de manifiesto que en plantas crecidas en [CO₂] ambientales, la temperatura elevada disminuyó el estado de activación del enzima. En dichas condiciones tuvo lugar un descenso significativo de los niveles de Gln, que facilitaría la activación de la NR (Morcuende et al., 1998), sin embargo, los niveles de sacarosa también disminuyeron, pasando de 28,81 μmol·g PF⁻¹ en plantas crecidas a temperaturas ambientales a 23,92 μmol·g PF⁻¹ en plantas crecidas a temperaturas 2 °C superiores. La interrelación de efectos entre compuestos nitrogenados y del carbono modificó el estado de activación de la NR. Teniendo en consideración la apreciación indicada con anterioridad empleando como sistema experimental las incubaciones de hojas cortadas de tabaco (Morcuende et al., 1998), cuando ambos metabolitos fluctúan conjuntamente, predominarían aquellos efectos asociados a la sacarosa. Además, Kaiser & Spill (1991) propusieron que estos cambios rápidos en la actividad NR están posiblemente relacionados con la disponibilidad de azúcares. Los cambios descritos en el estado de activación de la NR a la emergencia de la espiga desaparecieron *12 dda* en la anualidad del *2004*.

En la experimentación desarrollada en el *2006*, a la *emergencia de la espiga*, la temperatura elevada modificó el estado de activación de la NR en interacción con el CO₂ de crecimiento y también con el suministro de nitrógeno, poniendo de manifiesto, en la primera de las interacciones, que la elevación de la temperatura disminuyó el estado de activación del enzima en plantas crecidas en CO₂ elevado, y, en la segunda, que en plantas deficientes en nitrógeno, la elevación de la temperatura redujo el estado de activación de la NR. En ambas condiciones tuvo lugar una reducción del contenido foliar de nitrato, y aunque no existen evidencias convincentes de que el nitrato afecte al estado de activación de la NR (Morcuende et al., 1998), sí que parece prevenir los descensos del enzima asociados al recambio de proteína (Ferrario et al., 1995, 1996). Por lo que la explicación más plausible para justificar la disminución del estado de activación de la NR podría ser atribuible, en el primero de los casos, al ligero descenso de los niveles foliares de sacarosa encontrado en plantas crecidas a [CO₂] y temperatura elevados -47,94 μmol·g PF⁻¹- respecto a aquellas crecidas a [CO₂] elevadas y temperaturas ambientales -52,02 μmol·g PF⁻¹-, sugiriendo que en aquellas condiciones en las que la sacarosa se acumula en gran medida, una ligera variación en sus niveles foliares podría sentirse con mucha mayor facilidad y, en el segundo de los casos, a la disminución de los niveles de sacarosa en plantas deficientes en nitrógeno y temperatura elevada -44,18 μmol·g PF⁻¹- respecto a

aquellas crecidas a temperaturas ambientales $-50,64 \mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$; que facilitaría la manifestación de los efectos descritos en el estado de activación del enzima (Vincentz et al., 1993; Morcuende et al., 1998; Stitt et al., 2002). Además, en plantas crecidas a temperaturas elevadas, el CO_2 elevado disminuyó el estado de activación de la NR. En dichas condiciones tuvo también lugar una pérdida de nitrato foliar, pero posiblemente la interrelación de señales entre el carbono y nitrógeno desencadenaría el efecto descrito.

La disponibilidad de nitrógeno modificó el estado de activación del enzima, mostrando que en plantas crecidas a temperaturas ambientales, la abundancia de nitrógeno disminuyó el estado de activación de la NR, y aunque se observó un descenso en el contenido de nitrato en dichas condiciones, el efecto descrito podría asociarse al incremento de los niveles foliares de Gln, los cuales aumentaron en plantas crecidas a temperaturas ambientales y abundancia de nitrógeno $-4,70 \mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$ respecto a aquellas crecidas a temperaturas ambientales y deficiencia en nitrógeno $-3,18 \mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$; aspecto que contribuiría a la menor activación del enzima (Scheible et al., 1997b; Morcuende et al., 1998).

Finalmente, en estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo *-15 dda-* en la anualidad del **2006**, los efectos descritos en la activación de la NR a la emergencia de la espiga en interacción entre los diferentes factores ambientales desaparecieron, únicamente la activación del enzima aumentó en plantas crecidas a temperaturas elevadas, condiciones en las que tuvo lugar una reducción significativa del contenido proteico foliar. Posiblemente, la concentración de NR también disminuyó, por lo que requeriría una mayor activación del enzima para el mantenimiento de la asimilación del nitrógeno, a lo que contribuiría tanto el descenso significativo de los niveles foliares de Gln, como el aumento de glucosa encontrado en dichas condiciones (Morcuende et al., 1998).

5.6. Los factores ambientales modulan los flujos de intermediarios de la glicólisis y del ciclo de los ácidos orgánicos proporcionando precursores para la biosíntesis de compuestos orgánicos nitrogenados

Se ha mencionado con anterioridad que la reducción de nitrato constituye la ruta principal por la que el nitrógeno inorgánico es incorporado en compuestos orgánicos en plantas superiores (Stitt et al., 2002), y que la producción de carbono reducido en la fotosíntesis, y su reoxidación en la respiración, son necesarias para producir la energía y esqueletos carbonados requeridos para la incorporación de nitrógeno inorgánico en aminoácidos (Kaiser et al., 2000; Foyer et al., 2003). Por ello, la asimilación de nitrógeno

es regulada en respuesta al estado nitrogenado y de carbono de la planta (Marschner, 1995; Stitt & Krapp, 1999); y muestra una compleja interacción con el metabolismo del carbono que proporciona ácidos orgánicos. Entre éstos destacan el malato, que actúa como contrarrestador aniónico para prevenir la alcalinización durante la asimilación de nitrógeno (Martinoia & Rentsch, 1994; Scheible et al., 2000) y el 2-OG que se utiliza como aceptor primario de grupos amino en la reacción catalizada por la GOGAT (Heldt, 1997), y otros intermediarios fosforilados que se requieren en las rutas biosintéticas de diferentes aminoácidos (Stitt et al., 2002) y de otros compuestos importantes para la planta.

En la hoja bandera del trigo a la *emergencia de la espiga* de la anualidad del **2004**, los niveles de intermediarios fosforilados y ciertos ácidos orgánicos mostraron un patrón de acumulación diferente dependiendo de los factores ambientales objeto de estudio, aunque todas las condiciones experimentales, tanto el crecimiento en CO₂ elevado como la temperatura elevada o la abundancia de nitrógeno, incrementaron la razón G6P/F6P, indicativa de la compartimentalización citosólica de las hexosas-P. Estudios con espinaca y cebada han mostrado evidencias de una localización preferente de las hexosas-P en el citosol (Stitt et al., 1980; 1985; Gerhardt et al., 1987).

Se ha indicado con anterioridad que en plantas crecidas a [CO₂] elevadas los carbohidratos, en especial sacarosa y fructanos, se acumularon de forma notable (ver apartado 5.4), condiciones en las que aumentaron también ligeramente los niveles foliares de ATP y el contenido del total de hexosas-P -sumatorio de G6P, G1P y F6P-. Si bien los niveles de 3PGA disminuyeron significativamente y los de malato tendieron a disminuir, mientras que el contenido de 2-OG y UDP-glucosa no fue modificado por el CO₂ de crecimiento. Son varios los estudios que han demostrado que la acumulación de azúcares en las hojas, aunque no desencadenó alteraciones notables en los niveles de intermediarios metabólicos, sí que se acompañó de cambios selectivos de ciertos intermediarios claves, como un descenso de 3PGA y aumentos de ATP y hexosas-P. Variaciones que se han puesto de manifiesto empleando diferentes sistemas experimentales para conducir a la acumulación de carbohidratos foliares, bien por suministro de sacarosa vía corriente de transpiración (Krapp et al., 1991; Morcuende et al., 1997; Morcuende et al., 1998), por inhibición de la exportación de fotosintatos por enfriamiento o calentamiento del peciolo de la hoja (Mayoral et al., 1985; Krapp & Stitt, 1995), alteración del balance fuente/colector (Plaut et al., 1987; Sawada et al., 1990), así como en plantas transgénicas con capacidad disminuida para el cargado del floema (Stitt et al., 1991; Geigenberger et al., 1996). Estudios que en su gran mayoría no investigaron los cambios en el metabolismo de

los ácidos orgánicos y del nitrógeno; a excepción del realizado por Morcuende et al. (1998) que puso de manifiesto que la sacarosa aumentó la asimilación de nitrato, e incrementó la síntesis de ácidos orgánicos desde los intermediarios de la glicólisis, induciendo el flujo del carbono y nitrógeno hacia la biosíntesis de aminoácidos. Nuestros resultados en plantas de trigo crecidas en $[\text{CO}_2]$ elevadas mostraron un patrón de acumulación de intermediarios fosforilados y glicolíticos muy similar al mostrado en hojas de tabaco incubadas con sacarosa, aunque los niveles de malato y 2-OG no aumentaron como en las incubaciones con sacarosa, en las que al evitarse la exportación, la acumulación de carbohidratos fue más drástica. Cambios similares a los nuestros con trigo en los niveles de malato han sido observados en plantas de cebada (Sicher et al., 2008) y en los de 2-OG en plantas de tabaco (Matt et al., 2001b) crecidas en condiciones de CO_2 elevado.

En definitiva, los cambios observados en los niveles de intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos evidencian que la acumulación de azúcares en las hojas, ya sea por su suministro vía corriente de transpiración, por inhibición del transporte floemático, o el crecimiento en condiciones de CO_2 elevado (Krapp & Stitt, 1995; Morcuende et al., 1996, 1997, 1998), estimula la síntesis de ácidos orgánicos y el metabolismo del nitrógeno (ver apartado 5.7); y la inducción de las rutas respiratorias conduce a la disminución de 3-PGA y otros intermediarios glicolíticos y a un incremento en la formación de ATP (Stitt & Krapp, 1999).

En estadios avanzados del desarrollo del cultivo *-12 dda-* en la anualidad del **2004**, la razón G6P/F6P aumentó con el CO_2 de crecimiento, mientras que, a diferencia de lo ocurrido en la emergencia de la espiga, la abundancia de nitrógeno disminuyó esta razón en plantas crecidas a temperaturas elevadas, un efecto atribuible, en cierta medida, a la mayor demanda de intermediarios fosforilados en condiciones en las que se favorecería un crecimiento más acelerado. El contenido foliar de hexosas-P en la hoja bandera del trigo 12 dda fue menor que el encontrado en estadios tempranos del desarrollo. El crecimiento a $[\text{CO}_2]$ elevadas disminuyó significativamente los niveles de F6P, y ligeramente, sin llegar a alcanzar significación estadística, el del resto de hexosas-P, de manera que el total de hexosas-P tendió a disminuir respecto a las plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO_2 , aproximadamente un 15%. La pauta de cambio del total de hexosas-P fue opuesta a la observada en etapas tempranas del desarrollo, posiblemente consecuencia de la menor tasa fotosintética encontrada en condiciones de CO_2 elevado días después de la antesis, aunque no se descarta la contribución de otros mecanismos, como pueda ser una mayor exportación de fotoasimilados. Sin embargo, las variaciones en el resto de metabolitos se

mantuvieron de un modo similar al descrito y discutido en la emergencia de la espiga. Mientras que los niveles foliares de ATP tendieron a aumentar, los de 3PGA y malato mostraron un ligero descenso, y los de 2-OG y UDP-glucosa no fueron modificados por el CO₂ de crecimiento. Resultados que ponen de manifiesto que, aún a pesar de que la acumulación de carbohidratos en plantas crecidas a [CO₂] elevadas fue menor en estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo respecto a aquellas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂, el resto de intermediarios fluctuaron de un modo similar en ambas concentraciones de CO₂, facilitando la provisión de esqueletos carbonados requeridos para la asimilación del nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos nitrogenados, necesarios para el mantenimiento del crecimiento y la acumulación de biomasa (Stitt & Krapp, 1999; Stitt et al., 2002).

En la experimentación realizada en el **2006**, a la *emergencia de la espiga*, el crecimiento en CO₂ elevado tendió a aumentar ligeramente los niveles foliares de hexosas-P, ATP y UDP-glucosa, y a disminuir los de 2-OG y malato, sin alcanzar significación estadística, mientras que el contenido foliar de 3PGA fue disminuido significativamente. La pauta de cambio de los diferentes intermediarios metabólicos fue muy similar a la observada en la anterior anualidad, salvo ligeras variaciones en el índice de significación y en las concentraciones foliares valoradas tanto a niveles ambientales como elevados de CO₂. Resultados que reflejan, que aún a pesar de la mayor deficiencia nutricional encontrada en las plantas de trigo en esta anualidad, y a la incidencia de las condiciones climatológicas ambientales inherentes a cada una de las anualidades, el efecto del crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado en los intermediarios metabólicos mencionados, es un efecto robusto del CO₂ en la interacción del metabolismo del carbono con el metabolismo de los ácidos orgánicos que proporciona esqueletos carbonados necesarios para la asimilación de nitrógeno (Scheible et al., 2000; Stitt et al., 2002).

El crecimiento a [CO₂] elevadas, en estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo - **15 dda**- en la anualidad del **2006**, aumentó la razón G6P/F6P consecuencia del ligero incremento de los niveles foliares de G6P y descenso de los de F6P. En dichas condiciones, el contenido de G1P también se redujo, sin alcanzar significación estadística, de manera que el total de hexosas-P tendió a disminuir en niveles del orden de un 13% menores que los valorados en plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂. Además, mientras que los niveles foliares de ATP y 2-OG disminuyeron en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado, los de 3PGA, UDP-glucosa y malato tendieron a disminuir sin alcanzar significación estadística. En definitiva, no parece que los flujos de

intermediarios de la glicólisis y del ciclo de los ácidos orgánicos difieran en exceso respecto a aquellos descritos para un estadio de desarrollo similar en la experimentación realizada en la anualidad del 2004, aún a pesar de que la disponibilidad de nitrógeno fuera diferente entre ambas experimentaciones.

La elevación de la temperatura de crecimiento en plantas de trigo a la *emergencia de la espiga* en la anualidad del 2004 condujo a un descenso del contenido foliar de ATP, 3PGA, UDP-glucosa y hexosas-P, principalmente de F6P, mientras que los niveles de malato y 2-OG incrementaron. La disminución del contenido foliar de hexosas-P en plantas crecidas a temperaturas elevadas podría asociarse al descenso de la acumulación de sacarosa observado en dichas condiciones (Morcuende et al., 1998), no atribuible a una limitación de la velocidad de fotosíntesis con el crecimiento a temperaturas 2 °C superiores a las ambientales, como hemos indicado en el apartado 5.2. La limitación en la acumulación de sacarosa podría ser una consecuencia del incremento de la exportación de fotoasimilados asociado a un crecimiento acelerado previsible a temperaturas elevadas, o lo que es lo mismo consecuencia del ajuste metabólico de la planta para equilibrar la producción con la demanda de esqueletos carbonados, aumentando la tasa respiratoria en dichas condiciones (Tjoelker et al., 1999; Atkin et al., 2000). A la ralentización de la acumulación de sacarosa podría contribuir tanto la reducción de los sustratos para su síntesis, UDP-glucosa y F6P, como el descenso de los niveles de G6P -activador alostérico del enzima sacarosa fosfato sintasa y efector de los enzimas de interconversión de la SPS-, que se traduciría en una inhibición directa de la SPS y una activación de la SPS-quinasa que facilitaría la fosforilación e inactivación de la SPS (Weiner et al., 1993; Toroser & Huber, 1997; Toroser et al., 2000), enzima regulador de la biosíntesis de sacarosa. Sin embargo, la carencia de los resultados de actividad y del estado de activación de la SPS nos limita la evaluación de la contribución de los mecanismos propuestos. En conjunto, los cambios observados de intermediarios glicolíticos y ácidos orgánicos en plantas crecidas a temperaturas elevadas, como se ha indicado con anterioridad, sugieren que tuvo lugar un fuerte incremento del flujo del carbono desde la glicólisis hacia la síntesis de ácidos orgánicos y, por lo tanto, de las rutas respiratorias (Morcuende et al., 1998; Tjoelker et al., 1999; Atkin et al., 2000). El aumento del contenido foliar de malato en la hoja bandera del trigo a las 4 horas después del comienzo de la luz podría estar asociado a una fuerte estimulación inicial de la asimilación del nitrógeno al comienzo del fotoperiodo (Scheible et al., 1997b; Matt et al., 2001a,b), puesto que es sabido que la asimilación de nitrato conduce a alcalinización, que es contrarrestada por la síntesis de malato (Martinoia &

Rentsch, 1994). En un estudio sobre los cambios diurnos de la actividad NR en la hoja bandera del trigo, desarrollado en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo de investigación, se ha puesto de manifiesto que en plantas crecidas a temperaturas elevadas la asimilación de nitrógeno fue más rápida, tras el inicio del fotoperiodo, que en aquellas crecidas a temperaturas ambientales (Morcuende et al., 2004b; Gutiérrez et al., 2010). Además, en un estudio en el que se empleó la incubación de hojas de tabaco con malato en un amplio rango de condiciones como sistema experimental, Müller et al. (2001) ofrecieron evidencias de que tuvo lugar un descenso de actividad NR en respuesta a variaciones en los niveles foliares de malato en un rango fisiológico, que les permitió concluir que la actividad NR es disminuida cuando la velocidad de reducción de nitrato excede a la velocidad de exportación de malato desde la hoja (Müller et al., 2001; Stitt et al., 2002). En nuestro experimento el descenso de actividad NR que ha sido encontrado después de las 4 horas del comienzo del fotoperiodo en plantas crecidas a temperaturas elevadas podría también ser explicado por una inhibición de la actividad del enzima por malato, facilitándose un descenso de la asimilación de nitrato cuando se supere la velocidad de exportación de malato; si bien desconocemos la contribución de cada uno de los mecanismos posibles propuestos al control de la actividad NR en dichas condiciones (ver apartado 5.5), por lo que serán necesarias investigaciones más exhaustivas para dilucidar el posible predominio de alguno de ellos y, en especial, el papel del malato como señal en la regulación de la asimilación del nitrógeno en la hoja bandera del trigo de plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales.

Por otra parte, la estimulación de la velocidad de crecimiento previsible a temperaturas elevadas requerirá más energía. El ATP se considera el principal donador de energía en la mayoría de reacciones de síntesis y la UDP-glucosa y otras pirimidinas los co-sustratos o precursores ricos en energía necesarios para el metabolismo de la sacarosa y la síntesis de celulosa y componentes de paredes celulares (Boldt & Zrenner, 2003), que son importantes para el mantenimiento del crecimiento y desarrollo tanto de órganos como de la planta entera (Morison & Lawlor, 1999). Todo ello justificaría los descensos de ATP y UDP-glucosa encontrados en estas condiciones. Lo que demuestra que una elevada proporción del carbono reducido que es metabolizado a través de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos es desviado con diversos propósitos biosintéticos para generar una amplia variedad de precursores necesarios para el metabolismo de la planta. Entre estos precursores se incluyen, no sólo los aminoácidos y celulosa, sino también lípidos y compuestos relacionados, nucleótidos, isoprenoides, porfirinas, coenzimas, etc; cuya

demanda será mayor cuando los factores ambientales faciliten el incremento de la velocidad de crecimiento, como parece ser que ocurre por crecimiento a temperaturas elevadas.

En estadios avanzados del desarrollo del cultivo *-12 dda-* en la anualidad del **2004**, el crecimiento a temperaturas elevadas tendió a disminuir ligeramente, sin alcanzar significación estadística, los niveles de hexosas-P, y apenas fueron modificados los de ATP, 3PGA y malato, mientras que el contenido de UDP-glucosa y el de 2-OG aumentó. Las variaciones observadas en los niveles de estos metabolitos en plantas crecidas a temperaturas elevadas se atenúan con respecto al anterior estadio de desarrollo, sugiriendo que gracias a la plasticidad de la que gozan las plantas, éstas ajustan su capacidad de desarrollo a su estado metabólico, de modo que en estadios avanzados del desarrollo, los cambios de intermediarios metabólicos fueron menos drásticos que en etapas tempranas del crecimiento, en las que la demanda de fotoasimilados para el mantenimiento de una velocidad de crecimiento más acelerada sería notablemente superior. Además, en etapas más tardías del desarrollo, la estimulación de la asimilación de nitrógeno previsible a temperaturas elevadas se ralentiza, efecto evidenciado por el descenso del contenido foliar de nitrato que no se acompañó ni de un aumento en la actividad NR, ni del contenido de aminoácidos, ni tampoco de proteínas, sino de un descenso de los mencionados compuestos orgánicos nitrogenados necesarios para mantener el crecimiento y desarrollo de la planta (ver apartado 5.7).

En la experimentación realizada en el **2006**, a la *emergencia de la espiga*, el crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales tendió a aumentar muy ligeramente los niveles foliares de hexosas-P, mientras que los niveles de UDP-glucosa, 3PGA y ATP tendieron a disminuir, cambios que se acompañaron de un incremento de los niveles de malato y de un ligero aumento, no significativo, del 2-OG. La pauta de cambio, con la excepción de las hexosas-P, fue similar a la mostrada en la anualidad del 2004 en dicho estadio de desarrollo; pero parece plausible que dicha variación derive de la mayor disponibilidad de carbohidratos en las plantas de esta anualidad. Sin embargo, los cambios observados de intermediarios glicolíticos y ácidos orgánicos sugieren que tuvo lugar un incremento del flujo del carbono desde la glicólisis hacia la síntesis de ácidos orgánicos (Morcuende et al., 1998) que proporcionó esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos, que aunque no se tradujo en un incremento del contenido foliar de los mismos, se acompañó de un descenso de los niveles foliares de nitrato y un ligero incremento de los niveles de clorofila, sintomático de una fuerte estimulación de la

reducción de nitrato con la consiguiente incorporación en compuestos orgánicos nitrogenados necesarios para el crecimiento de la planta. Sin embargo, en etapas avanzadas del desarrollo foliar del trigo, **15 dda**, el crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales disminuyó los niveles foliares de F6P y, aunque el resto de hexosas-P no variaron significativamente, el contenido total de hexosas-P se redujo en orden de un 12% con respecto a las plantas crecidas a temperaturas ambientales. La elevación de la temperatura también disminuyó los niveles de 3-PGA, mientras que los de ATP, UDP-glucosa, 2-OG y malato apenas fueron modificados. Posiblemente, estos cambios fueron consecuencia de una ralentización de la asimilación del nitrógeno en etapas más avanzadas del crecimiento e inclusive más drástica que en la experimentación desarrollada en la anterior anualidad, que pudiera desencadenar una senescencia más rápida en la anualidad del 2006 comparada con la del 2004. Evidenciado porque el contenido foliar de nitrato no descendió tan marcadamente en plantas crecidas a temperaturas elevadas como en la anualidad anterior, y los niveles de aminoácidos, clorofila y proteínas disminuyeron respecto a aquellas crecidas a temperaturas ambientales (ver apartado 5.7).

En plantas de trigo crecidas con abundancia de nitrógeno, a la **emergencia de la espiga** en la anualidad del **2004**, los niveles de hexosas-P y 3PGA disminuyeron significativamente, los de UDP-glucosa y ATP tendieron a disminuir sin llegar a alcanzar significación estadística, mientras que los niveles de 2-OG y malato, o bien aumentaron significativamente o mostraron un ligero incremento, respectivamente. Cambios similares en los niveles de intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos han sido encontrados en hojas de tabaco incubadas con nitrato (Morcuende et al., 1998) y difieren del patrón de acumulación de intermediarios metabólicos observado en plantas de trigo crecidas en CO₂ elevado anteriormente comentado. Considerando que el nitrato incrementa la expresión de genes que codifican enzimas involucrados en la absorción y reducción de dicho nutriente (Siddiqi et al., 1990; Kronzucker et al., 1995; Scheible et al., 1997a,b; Stitt et al., 2002; Okamoto et al., 2003) y de aquellas proteínas que participan en la síntesis de ácidos orgánicos (Koch, 1996; Scheible et al., 1997a); ello conduciría, como se ha mencionado en los apartados 5.5 y 5.7, a una estimulación de la asimilación de nitrógeno en las plantas de trigo crecidas con nitrógeno abundante (Tschoep et al., 2009). Dicha activación demandaría una adecuada provisión de carbono, que se acompañó de una disminución de intermediarios glicolíticos seguida de la consiguiente acumulación de ácidos orgánicos. En definitiva, el aumento del flujo del carbono desde la glicólisis hacia la síntesis de ácidos

orgánicos se tradujo en un aumento de los niveles de aminoácidos (Morcuende et al., 1998) y también de proteínas (Scheible et al., 2004) (ver apartado 5.7).

En sintonía con la activación de la síntesis de ácidos orgánicos por nitrato (Foyer & Ferrario, 1994; Koch, 1996; Scheible et al., 1997a) en las plantas de trigo crecidas con abundancia de nitrógeno, convendría resaltar, la disminución del contenido foliar de G6P encontrado en la hoja bandera en las mencionadas condiciones. Ya que la inducción de la acumulación de ácidos orgánicos con abundancia de nitrógeno facilitaría el descenso de los intermediarios anteriores al ciclo de los ácidos tricarbónicos, como las hexosas-P y el 3PGA (Paul & Stitt, 1993; Scheible et al., 1997a). Dicha apreciación concordaría con la reducción del contenido foliar de carbohidratos encontrado en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno (Fichtner & Schulze, 1992), discutida en el apartado 5.4.

Finalmente, conviene resaltar que a la emergencia de la espiga en la anualidad del 2004, las variaciones de los niveles de intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos encontradas en las plantas de trigo crecidas con nitrógeno abundante, son muy similares a las de plantas crecidas a temperaturas elevadas, incluido el descenso de la acumulación de carbohidratos, que no fue asociado a una inhibición de la asimilación fotosintética del carbono a temperaturas elevadas (Gutiérrez et al., 2009a), sino consecuencia de la desviación del carbono hacia la síntesis de ácidos orgánicos para proporcionar precursores para las rutas biosintéticas de aminoácidos y otros componentes metabólicos de la planta, necesarios para el mantenimiento de un crecimiento acelerado previsible en dichas condiciones. Además, en ambas condiciones, abundancia de nitrógeno y temperatura elevada, la relación C/N disminuyó, en contraste al incremento observado en la mencionada razón en plantas crecidas en CO₂ elevado. Si bien, la reducción de la razón C/N fue mucho más notable en plantas crecidas en abundancia de nitrógeno que en aquellas crecidas a temperaturas elevadas.

En *estadios avanzados* del desarrollo foliar en la anualidad del **2004** en plantas de trigo crecidas con abundancia de nitrógeno, los niveles de las hexosas-P mayoritarias, G6P y F6P, disminuyeron significativamente, los de ATP y G1P tendieron a disminuir y los de malato a incrementarse sin alcanzar significación estadística. Cambios que muestran cierta similitud a los observados en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, el descenso del contenido foliar de 3PGA encontrado en estadios jóvenes del trigo desapareció en etapas más avanzadas del desarrollo, y los niveles de 2-OG y UDP-glucosa, o bien disminuyeron o aumentaron, respectivamente, al incrementar la disponibilidad de nitrógeno al suelo.

Las variaciones en los niveles de intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos descritas, parecen mostrar que en estadios avanzados del desarrollo, la asimilación de nitrato en plantas crecidas con nitrógeno abundante fue ralentizada respecto a los estadios juveniles. Evidenciado también porque los niveles de carbohidratos, en particular, sacarosa, fructanos y almidón, apenas fueron modificados por el aumento de la disponibilidad de nitrógeno, frente al descenso encontrado en la emergencia de la espiga. Se sabe que la asimilación de nitrato desencadena alteraciones en el metabolismo del carbono, que conducen a un descenso de los niveles foliares de carbohidratos que facilita que una mayor proporción de carbono sea convertida vía glicólisis en PEP necesario para el metabolismo de los ácidos orgánicos (Stitt & Krapp, 1999). Metabolismo con funciones diferentes durante la asimilación de nitrógeno, dado que la PEPCasa, o bien podría operar con la malato deshidrogenasa para sintetizar malato y prevenir la alcalinización durante la asimilación de nitrato (Deng et al., 1989; Martinoia & Rentsch, 1994); o bien podría operar junto a la piruvato quinasa, citrato sintasa mitocondrial, piruvato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (Heldt, 1997; Scheible et al., 1997a; Stitt & Krapp, 1999) para proporcionar 2-OG, que sería el aceptor primario de carbono para la asimilación de nitrógeno inorgánico. Por lo que la regulación de la PK y la PEPCasa permitiría la integración de la glicólisis con la asimilación de nitrógeno inorgánico y la provisión de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos (Huppe & Turpin, 1994), que conduciría a un aumento del contenido foliar de aminoácidos totales, aumento que tuvo también lugar 12 dda, al igual que ocurrió en la emergencia de la espiga. Sin embargo, el aumento de aminoácidos no se acompañó de un descenso de los niveles foliares de nitrato e incremento de proteínas, sino de un aumento del primero y un descenso de proteínas foliares, cuyos niveles fluctuaron en interacción con los restantes factores ambientales. La estimulación de la absorción de nitrógeno inducida por nitrato, no se acompañó de la consiguiente inducción de su reducción y asimilación en compuestos orgánicos nitrogenados consecuencia posiblemente de la ralentización del crecimiento en etapas más avanzadas del desarrollo foliar del trigo, lo que condujo a una mayor acumulación de nitrato en la hoja bandera del trigo en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno.

Los cambios en los intermediarios fosforilados y ácidos orgánicos en la experimentación realizada en el **2006**, a la **emergencia de la espiga**, fueron muy similares a los observados en la anualidad del 2004, ya que el crecimiento en abundancia de nitrógeno aumentó la razón G6P/F6P, redujo los niveles foliares de hexosas-P, y tendió a

disminuir el contenido foliar de UDP-glucosa, 3PGA y ATP, y a incrementar el de malato. Sin embargo, los niveles de 2-OG disminuyeron en plantas crecidas en abundancia de nitrógeno. En estadios avanzados del desarrollo, 15 dda, el patrón de respuesta de los metabolitos a la abundancia de nitrógeno fue parecido al encontrado en la emergencia de la espiga, a excepción de la razón G6P/F6P que no varió, y el aumento observado en los niveles de 2-OG. Aunque la pauta de cambio de los metabolitos indicados fue prácticamente idéntica en ambos estadios de desarrollo en la experimentación realizada en esta anualidad, y muy similar a la descrita previamente en la anualidad del 2004, sí que tuvieron lugar ligeras variaciones en la interrelación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno y su influencia en la asimilación del nitrógeno en la planta. De manera que, mientras que a la emergencia de la espiga, la abundancia de nitrógeno condujo a una estimulación de la asimilación del nitrógeno que se tradujo en un descenso del contenido foliar de nitrato, que se acompañó del consiguiente aumento de aminoácidos totales (Morcuende et al., 1998; Scheible et al., 2000, 2004) y compuestos orgánicos nitrogenados como las clorofilas y proteínas (Scheible et al., 2004); en estadios más avanzados del desarrollo foliar del trigo, dicha estimulación condujo a un aumento del contenido foliar de nitrato, seguido de un descenso de los aminoácidos totales junto a un aumento de los niveles de clorofila y proteínas. Resultados que ponen de manifiesto que la proporción del carbono fijado en el proceso fotosintético requerido para la asimilación del nitrógeno varía notablemente dependiendo del estado de desarrollo de la planta y la disponibilidad de nitrógeno (Lewis et al., 2000).

5.7. Los factores ambientales conducen a cambios en los compuestos nitrogenados foliares y modulan el crecimiento de las plantas de trigo

La producción de compuestos nitrogenados orgánicos es crucial no sólo para el metabolismo, crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, sino también para garantizar la calidad (contenido proteico y aminoácidos) de aquellas partes de la planta que gozan de importancia agronómica en especies de cultivo (Foyer et al., 2003). La asimilación foliar de nitrato en los aminoácidos primarios, Gln y Glu, demanda poder reductor y esqueletos carbonados, por lo que será necesaria una correcta coordinación entre los metabolismos del carbono y nitrógeno en plantas (Stitt et al., 2002; Foyer et al., 2003). Dichos aminoácidos son empleados no sólo como compuestos transportadores de nitrógeno, sino también como donadores de nitrógeno, a través de reacciones de transaminación, que facilitan la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos (Lea et al., 1989), entre los que se incluyen todos los aminoácidos para la síntesis de proteínas

(Radwanski & Last, 1995; Noctor et al., 2002), ácidos nucleicos, y otros compuestos orgánicos nitrogenados como las clorofilas (Von Wettstein et al., 1995).

En las hojas de plantas C₃, la regulación de la asimilación de nitrógeno se complica por la operación de la ruta fotorrespiratoria (Novitskaya et al., 2002), ya que la asimilación *de novo* de nitrato y amonio interacciona estrechamente con el reciclado del amonio durante la fotorrespiración (Stitt et al., 2002). Proceso por el que el carbono transportado desde el cloroplasto en la forma de glicolato regresa como glicerato, siguiendo los flujos de Gly y Ser a través del peroxisoma y la mitocondria (Leegood et al., 1995); permitiendo el intercambio de grupos amino entre la Gly y Ser (Keys et al., 1978) y, por descarboxilación de la Gly, la liberación de NH₃ (Liepman & Olsen, 2001, 2003) que se re-asimila mediante la ruta GS/GOGAT (Keys et al., 1978). Por tanto, ambas rutas, tanto la asimilación primaria de nitrógeno como la fotorrespiratoria, involucran el flujo de grupos amino a través de la GS/GOGAT (Hirel & Lea, 2002).

Con objeto de proporcionar información sobre el estado nitrogenado de las plantas de trigo, se han estimado los niveles de nitrato y aminoácidos directamente involucrados en las asimilaciones de nitrato y amonio (Gln y Glu), de aminoácidos que desempeñan un papel importante en el metabolismo primario de la planta (Asn, Asp, Ala, Gly, Ser), junto a los aminoácidos minoritarios y otros compuestos orgánicos nitrogenados como las clorofilas y proteínas. Algunos de estos compuestos, entre los que se incluyen, el nitrato, Gln y Asn, cambian de una forma dinámica (Hoff et al., 1994; Crawford, 1995; Lam et al., 1996; Scheible et al., 1997a,c) y, además, se sabe que las variaciones diurnas de sus niveles foliares se modifican por el crecimiento en CO₂ elevado (Geiger et al., 1998). En nuestro experimento, dichos metabolitos se midieron a las 4 horas del comienzo del fotoperiodo, cuando la actividad NR es máxima y el agotamiento diurno de nitrato y la acumulación de Gln en hojas ha comenzado pero aún no se ha completado (Geiger et al., 1999).

En la hoja bandera del trigo de plantas crecidas en CO₂ elevado, en la ***emergencia de la espiga*** de la anualidad **2004**, los niveles de Gln y Glu, los dos primeros aminoácidos producidos tras la asimilación de nitrato, mostraron un descenso que no llegó a alcanzar significación estadística en el caso del Glu, pero sí para la Gln, aunque sus niveles fluctuaron en interacción con la temperatura de crecimiento, y la razón Gln/Glu tendió a disminuir. Por otra parte, mientras que los niveles de Asp variaron en interacción con los restantes factores ambientales, los de Ala y Asn aumentaron en las plantas de trigo crecidas en CO₂ elevado, consecuencia posiblemente de la mayor provisión de esqueletos

carbonados para la biosíntesis de aminoácidos previsible en dichas condiciones, aunque los niveles de Asn mostraron sólo un ligero aumento que no llegó a alcanzar significación estadística. Un incremento del contenido foliar de estos dos últimos aminoácidos indicados, Ala y Asn, en las primeras horas del fotoperiodo en CO₂ elevado ha sido también encontrado en plantas de tabaco (Geiger et al., 1998). En nuestro experimento con cultivos de trigo, el crecimiento a [CO₂] elevadas redujo notablemente el contenido foliar de los aminoácidos formados en la ruta fotorrespiratoria, la Gly y Ser, aunque el descenso de Ser no fue tan notorio como el de Gly. Los cambios de ambos aminoácidos condujeron a una disminución de la razón Gly/Ser. Un descenso de la razón Gly/Ser ha sido frecuentemente observado en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado (Stitt & Krapp, 1999), tales como tabaco (Ferrario-Mery et al., 1997; Geiger et al., 1998; Matt et al., 2001a), soja (Rogers et al., 2006; Ainsworth et al., 2007) y cebada (Sicher & Bunce, 2001). Ainsworth et al. (2007) argumentaron que la Ser pudiera ser menos afectada por el CO₂ elevado que la Gly por su potencial participación en el metabolismo no fotorrespiratorio. Además, Novitskaya et al. (2002) mostraron que con el aumento del flujo fotorrespiratorio, se canaliza el carbono hacia el glicolato, produciendo una mayor acumulación de Gly y el incremento consiguiente de la razón Gly/Ser. De manera que el descenso de la razón Gly/Ser encontrado en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado es atribuible a la disminución de la fotorrespiración y se trata de una respuesta robusta al crecimiento en concentraciones elevadas de CO₂ (Matt et al., 2001a), que ha sido observada tanto en plantas fertilizadas con nitrato o nitrato amónico como aquellas crecidas con abundancia o deficiencia en nitrógeno (Geiger et al., 1999). En consonancia con estas argumentaciones, la menor acumulación de Gln en CO₂ elevado podría deberse parcialmente a la menor velocidad de fotorrespiración. Los niveles de Gln disminuyeron únicamente en plantas crecidas a temperaturas ambientales, hecho que podría asociarse a que en dichas condiciones pudiera tener lugar una ralentización de la reducción de nitrato y asimilación de amonio. La disminución de la formación de Gln por reducción de la fotorrespiración, podría también proporcionar una segunda vía alternativa a la indicada en el apartado 5.5 por la que el CO₂ elevado estimularía el metabolismo del nitrógeno, pues dado que la Gln disminuye la expresión de la NR, la actividad y el estado de activación del enzima (Vincentz et al., 1993; Hoff et al., 1994; Morcuende et al., 1998), un descenso de sus niveles aliviaría sus efectos negativos sobre la NR.

En el trigo, estos cambios en los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, se tradujeron en una reducción significativa del contenido total de

aminoácidos mayoritarios y del contenido de aminoácidos totales en plantas crecidas en CO₂ elevado en comparación con aquellas crecidas en CO₂ ambiente, atribuible principalmente al notable descenso del contenido foliar de los aminoácidos fotorrespiratorios. Un ligero descenso de los niveles de aminoácidos aromáticos, que no llegó a alcanzar significación estadística, ha sido también encontrado en la hoja bandera del trigo de plantas crecidas a [CO₂] elevadas; mientras que el contenido del total de aminoácidos minoritarios fue significativamente disminuido. En consonancia con nuestros resultados, se ha encontrado una disminución en los niveles totales de aminoácidos a horas similares durante el fotoperiodo en hojas maduras de cebada en condiciones de CO₂ elevado (Sicher, 1998). En hojas maduras de tabaco, los aminoácidos también disminuyeron cuando el suministro de nitrógeno fue limitado, mientras que los niveles fueron inalterados por el CO₂ cuando el suministro de nitrógeno fue abundante (Geiger et al., 1999). Por el contrario, en hojas jóvenes de plántulas de tabaco (Geiger et al., 1999) y de cebada (Sicher, 1998), el crecimiento en CO₂ elevado aumentó los contenidos foliares de aminoácidos. En cultivos de soja, en los que se empleó el sistema FACE para la elevación de los niveles de CO₂ atmosféricos, los aminoácidos también aumentaron en hojas en desarrollo crecidas en CO₂ elevado, aunque las diferencias desaparecieron en hojas completamente expandidas (Ainsworth et al., 2007). Otros estudios realizados con cultivos hidropónicos de plantas de tabaco han mostrado que los niveles foliares de aminoácidos totales fueron similares durante el día al de las plantas crecidas en CO₂ ambiente (Matt et al., 2001a). Para explicar las variaciones en los niveles de aminoácidos a lo largo de un ciclo diurno, Matt et al. (2001a) propusieron que la velocidad de utilización del nitrógeno inorgánico es incrementada en [CO₂] elevadas, debido a la mayor velocidad de absorción y asimilación del nitrógeno al final del día y durante la noche, momentos del fotoperiodo en los que se detectaron las mayores variaciones en los niveles de aminoácidos en comparación con plantas crecidas en condiciones ambientales de CO₂. Para ilustrar esta última apreciación conviene señalar que Geiger et al. (1998) presentaron evidencias de que el crecimiento de plantas de tabaco en condiciones de CO₂ elevado, aunque no alteró el contenido total de aminoácidos en las hojas, sí que modificó los cambios diurnos y los niveles relativos de los aminoácidos considerados individualmente, en consonancia con la modificación de la regulación de la actividad NR anteriormente comentada (ver apartado 5.5). La diversidad de estudios realizados en condiciones de CO₂ elevado, empleando diferentes sistemas experimentales y condiciones de crecimiento, ponen de manifiesto la importancia tanto del estadio de desarrollo foliar de la planta como la contribución de la

disponibilidad de nitrógeno en el contenido de aminoácidos totales en plantas crecidas en las condiciones ambientales indicadas (Geiger et al., 1999; Matt et al., 2001a; Fritz et al., 2006b).

El descenso de aminoácidos encontrado en las plantas de trigo crecidas a $[\text{CO}_2]$ elevadas se acompañó de una disminución del contenido foliar de nitrato, aunque sus niveles fluctuaron en interacción con los restantes factores ambientales, y de un descenso de otros compuestos nitrogenados como las clorofilas y las proteínas totales, aunque el descenso de estas últimas, no llegó a alcanzar significación estadística; resultados que, en su conjunto, revelan una pérdida generalizada de compuestos nitrogenados en la hoja bandera del trigo en condiciones de CO_2 elevado. Son varios los estudios que han puesto de manifiesto que el enriquecimiento en CO_2 conduce a un descenso de la concentración foliar de nitrógeno (Conroy & Hocking, 1993; Stitt & Krapp, 1999; Pérez et al., 2005; Rogers et al., 2006) y a una menor absorción de nitrógeno (Polley et al., 1999), aunque el mecanismo no ha sido aún esclarecido. Se ha propuesto que el crecimiento a $[\text{CO}_2]$ elevadas podría conducir a un descenso de la conductancia de los estomas (Stitt & Krapp, 1999) y de la transpiración (Conroy & Hocking, 1993; McDonald et al., 2002), que limitaría el flujo hídrico en el suelo en la vecindad de la raíz; dificultando la absorción de nutrientes, entre ellos, el nitrato (Conroy & Hocking, 1993; Stitt & Krapp, 1999; McDonald et al., 2002); que se traduciría en una pérdida de nitrógeno en la parte aérea de la planta (Del Pozo et al., 2007). Sin embargo, en nuestro experimento, el crecimiento en condiciones elevadas de CO_2 no condujo a una pérdida de nitrógeno total por tallo -parte aérea de la planta-, parámetro que varió de 38,72 a 40,12 mg de nitrógeno en plantas crecidas a $[\text{CO}_2]$ ambientales y elevadas, respectivamente.

Los resultados descritos previamente sugieren que el crecimiento a $[\text{CO}_2]$ elevadas estimularía la absorción y reducción del nitrógeno mineral en paralelo con el incremento en la formación de carbohidratos y la aceleración del crecimiento que tiene lugar en dichas condiciones, observaciones similares a las encontradas previamente en plantas de tabaco (Geiger et al., 1998). Cambios evidenciados por el ligero incremento de actividad NR y el descenso de los niveles foliares de nitrato encontrado en la hoja bandera del trigo, que se acompañaron de una disminución de los aminoácidos totales y, sin embargo, no se tradujeron en un incremento de otros compuestos nitrogenados como las clorofilas y proteínas, sino en una reducción de los mismos. Mostrando, en definitiva, que la estimulación de la asimilación de nitrógeno en la hoja bandera del trigo facilitaría la exportación de compuestos nitrogenados a órganos en expansión de la planta, consecuencia

de la aceleración del crecimiento previsible en condiciones de CO₂ elevado (Norby et al., 1999; Long et al., 2004; Ainsworth & Long, 2005). En consonancia con dicha apreciación, pudimos comprobar que en este estadio de desarrollo del trigo, la espiga actuaría como un potente sumidero de asimilados, en el que no sólo aumentó el contenido de nitrógeno total -9,53 y 10,52 mg de N-, sino que también incrementó su área -30,63 y 34,92 cm²-, peso fresco -1,869 y 2,210 g- y peso seco -0,4683 y 0,594 g-, resultados correspondientes a [CO₂] ambientales y elevadas, respectivamente (datos no mostrados en resultados). Aún a pesar de que el peso fresco total de las plantas de trigo crecidas en CO₂ elevado también aumentó -9,96 frente a 11,22 g-, valores que representan un porcentaje de incremento de biomasa en torno a un 11%, notoriamente inferior al observado en otras especies vegetales (Wand et al., 1999), en las que ha sido frecuentemente encontrado un aumento de biomasa en las condiciones de crecimiento indicadas (Geiger et al., 1998, 1999; Wand et al., 1999; Matt et al., 2001a; Maroco et al., 2002; Pereira de Souza et al., 2008). Estos resultados contrastan con la ausencia de cambios en la acumulación de biomasa en plantas de maíz perfectamente hidratadas y fertilizadas (Kim et al., 2006). Sin embargo, la superficie verde de la hoja bandera del trigo -25,76 frente a 24,33 cm²- y el peso fresco de la misma -0,5495 frente a 0,5074 g- aumentaron significativamente en plantas crecidas en CO₂ elevado comparadas con aquellas crecidas en condiciones ambientales de CO₂, en conformidad con otros estudios (Wong et al., 1992; Xu et al., 1994; Roden & Ball, 1996; Ferrario-Mery et al., 1997; Geiger et al., 1999). Resultados que, en su conjunto, parecen mostrar que la reducción del contenido foliar de nitrógeno observado en las plantas de trigo en condiciones de CO₂ elevado podría derivarse de un efecto de dilución del nitrógeno consecuencia del mayor área foliar encontrado en las condiciones descritas (Farage et al., 1998; Rogers et al., 1998). Conviene también recordar que en los últimos años se han realizado varios estudios de expresión génica global en plantas crecidas a [CO₂] elevadas con el fin de investigar la correlación entre las respuestas fisiológicas y moleculares observadas (Taylor et al., 2005; Li et al., 2006; Kim et al., 2006; Ainsworth et al., 2006; Pereira de Souza et al., 2008; Li et al., 2008). En uno de ellos realizado con plantas de caña de azúcar de 13 semanas, etapa en la que tuvo lugar un incremento de la superficie verde (Pereira de Souza et al., 2008), pudo apreciarse que los genes diferencialmente expresados en condiciones de CO₂ elevado fueron aquellos relacionados con la expansión de las paredes celulares y el aumento de tamaño de la célula (Wu & Cosgrove, 2000; Pereira de Souza et al., 2008). Inducción que ha sido también encontrada en álamo (Taylor et al., 2003, 2005; Druat et al., 2006) y pudiera ser indicativa de un mayor potencial de las

células foliares para expandirse y acumular más carbohidratos (Pereira de Souza et al., 2008), apreciación en conformidad con el aumento de biomasa y superficie verde observado en las plantas de trigo de nuestro experimento en condiciones de CO₂ elevado, junto a otras especies vegetales (Xu et al., 1994; Ferrario-Mery et al., 1997; Geiger et al., 1999).

Un hallazgo importante relacionado con la temática discutida son los cambios en la morfología foliar encontrados en las hojas de plantas de trigo desarrolladas en CO₂ elevado, que condujeron a una disminución del peso seco por área (Gutiérrez et al., 2009b), lo que sugiere que no tuvo lugar un cambio en el grosor o volumen de las hojas, a diferencia de las observaciones indicadas por Sims et al. (1998), sino en la densidad (peso seco por unidad de volumen) foliar (Gutiérrez et al., 2009b). Pérdida de densidad foliar que se asoció con un aumento del agua de los tejidos más que con aumentos de los espacios con aire de la hoja, como observó Masle (2000) en plantas jóvenes de trigo. Además, la reducción del peso seco por área causada por el CO₂ elevado ocurrió a pesar del aumento de carbohidratos no estructurales en coherencia con otros estudios precedentes (Radoglou & Jarvis, 1992; Nie et al., 1995b; Moore et al., 1999; Pérez et al., 2005), lo que implicaría un descenso de componentes estructurales de la hoja. A diferencia de los incrementos observados en algodón (Wong, 1990) y plantas jóvenes de trigo (Masle, 2000).

En nuestro experimento, los resultados en su conjunto sugieren que la respuesta de aclimatación al crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado, en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo, representa una estrategia de optimización en la distribución del nitrógeno desde la maquinaria fotosintética a la expansión foliar y el crecimiento (Maroco et al., 1999; Poorter & Nagel, 2000). Dado que el incremento de biomasa observado que tuvo lugar aún a pesar del descenso en las concentraciones foliares de nitrato, aminoácidos y proteínas en las hojas, sugiere que la reducción en el contenido de nitrógeno podría ser un efecto de dilución del nitrógeno, debido al crecimiento acelerado y el mayor área foliar encontrado en condiciones de CO₂ elevado (Farage et al., 1998; Rogers et al., 1998). En este contexto, la aclimatación podría ser el resultado de un efecto indirecto de la desviación del nitrógeno para el crecimiento, más que consecuencia de un efecto directo del suministro de nitrógeno en la fotosíntesis. Por ello, la disminución foliar de nitrógeno sería el resultado de un cambio en la localización o distribución de nitrógeno a nivel de planta entera, y la espiga actuaría como un potente sumidero de asimilados. Así mismo, las modificaciones morfológicas encontradas en plantas crecidas en CO₂ elevado, asociadas a una reducción de componentes estructurales de la hoja,

conducirían probablemente a un descenso de la capacidad fotosintética por unidad de área foliar (Gutiérrez et al., 2009b).

En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo, **12 días después de la antesis** en la anualidad del **2004**, el crecimiento a concentraciones elevadas de CO₂ no modificó la pauta de cambio de los aminoácidos considerados individualmente, pues las concentraciones foliares de cada uno de ellos fueron muy similares a las descritas previamente en estadios más jóvenes del cultivo; salvo ciertas excepciones, tales como el descenso significativo de los niveles foliares de Glu que junto a la disminución de la Gln, condujo a una reducción de la razón Gln/Glu. Cambios que no se acompañaron de un aumento de aminoácidos minoritarios, sino de un descenso de los mismos, junto a los mayoritarios, totales y aromáticos. Los niveles de Ala sí que aumentaron significativamente y la razón Asn/Asp fue disminuida. Además, aunque los contenidos foliares de Gly y Ser fueron notablemente reducidos, la razón Gly/Ser no fue modificada con el CO₂ de crecimiento. Un aspecto relevante que muestran nuestros resultados es que la pérdida de aminoácidos totales fue más acentuada en plantas crecidas a temperaturas ambientales que elevadas. Si bien, sería plausible que la reducción del contenido foliar de aminoácidos en las plantas crecidas en CO₂ elevado fuese más acusada en interacción con la temperatura elevada, consecuencia de la previsible aceleración del crecimiento respecto a las condiciones ambientales. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que en plantas crecidas en CO₂ elevado, las temperaturas superiores a las ambientales facilitarían una mayor movilización del nitrógeno para satisfacer la mayor demanda de asimilados necesaria para el sostenimiento de un crecimiento acelerado y garantizar el mantenimiento del equilibrio entre órganos fuente-sumidero. Además, el crecimiento en CO₂ elevado condujo a una reducción notable de aminoácidos en plantas crecidas con un aporte de nitrógeno mayor, poniendo de manifiesto que la abundancia de dicho nutriente favorece el crecimiento de la planta y facilita la exportación de asimilados a otros órganos en desarrollo.

Los resultados, en su conjunto, sugieren que el nitrógeno fue empleado en paralelo a la formación de carbohidratos, ya que el contenido foliar de nitrato disminuyó en condiciones de CO₂ elevado. Y la aceleración del crecimiento condujo a una reducción del contenido de compuestos orgánicos nitrogenados, incluidas las proteínas y clorofilas, en la hoja bandera del trigo 12 dda, si bien, al igual que pudimos observar en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo no tuvo lugar una pérdida de nitrógeno total en la planta, puesto que su contenido osciló entre 43,38 y 44,50 mg de N en plantas crecidas a concentraciones ambientales y elevadas de CO₂. Sin embargo, a diferencia de los resultados descritos en el

estadio anterior, el contenido de nitrógeno total de la espiga no fue modificado con el CO₂ elevado, aunque sí que aumentó para el primer entrenudo, en el que el contenido de nitrógeno varió de 8,12, en condiciones ambientales, a 9,64 mg de N, en condiciones elevadas de CO₂. Aún a pesar de que el contenido de nitrógeno de la espiga, días después de la antesis, no fue modificado por el crecimiento en CO₂ elevado, en estas condiciones pudo apreciarse un incremento de su área -36,06 y 41,11 cm²-, peso fresco -2,522 y 2,931 g- y peso seco -0,963 y 1,070 g-, datos correspondientes a plantas crecidas a [CO₂] ambientales y elevadas, respectivamente. Además, al igual que en estadios tempranos del desarrollo del trigo, el peso fresco total de la planta fue aumentado -de 7,36 a 9,71 g-, siendo el porcentaje de incremento de biomasa superior al observado en estadios jóvenes del cultivo, en torno a un 24%, valores próximos a los observados en plantas herbáceas (Wand et al., 1999). No obstante, conviene resaltar que a la madurez del cultivo el incremento de biomasa real observado en el cultivo en condiciones de CO₂ elevado fue sensiblemente inferior, muy similar a la apreciación observada en estadios jóvenes del desarrollo, entre el 11-12%. Así mismo, de modo similar a las variaciones observadas a la emergencia de la espiga, el crecimiento en CO₂ elevado incrementó el área verde -de 17,81 a 22,97 cm²-, peso fresco -de 0,393 a 0,502 g- y peso seco -de 0,136 a 0,143 g- de la hoja bandera. Resultados que sugieren que la reducción en el contenido de compuestos nitrogenados foliares podría ser consecuencia de un cambio en la localización del nitrógeno a nivel de planta entera, en consonancia con las apreciaciones observadas en la emergencia de la espiga en esta anualidad.

En la anualidad del **2006** a la **emergencia de la espiga** el crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado condujo a variaciones en los niveles de aminoácidos muy similares a las observadas en el mismo estadio de desarrollo, en la anualidad anterior. Mientras que los contenidos foliares de Ser, Gly y Gln disminuyeron significativamente, descensos que desencadenaron también una disminución de la razón Gly/Ser, los de Asp y Glu tendieron a disminuir y los de Asn y Ala a aumentar. Los cambios en los aminoácidos individuales condujeron a un descenso significativo de los aminoácidos mayoritarios, minoritarios y totales, y tendieron a reducir los aromáticos. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos a la emergencia de la espiga del 2004, el crecimiento en CO₂ elevado condujo a una reducción muy marcada de aminoácidos en las plantas crecidas con nitrógeno abundante, variaciones que fueron también observadas en estadios avanzados del desarrollo del cultivo del trigo en la anualidad del 2004. Dicho hallazgo, pone de manifiesto nuevamente, como se ha indicado con anterioridad en los apartados 3.2 y 5.4,

que la deficiencia nutricional del cultivo en la anualidad del 2006 fue más intensa que la observada en la experimentación desarrollada en el 2004, sugiriendo que al incrementarse la biodisponibilidad de nutrientes, los recursos obtenidos son destinados por la planta a incrementar la biomasa y el crecimiento.

Del mismo modo, dado que la disponibilidad de nitrógeno de las plantas fue menor en esta anualidad, el descenso de los niveles foliares de nitrato en las plantas crecidas en CO₂ elevado fue mayor que en la anterior, y varió en interacción con los restantes factores ambientales. Además, el contenido foliar de clorofila y proteínas fue también menor en plantas crecidas a [CO₂] elevadas, aunque sus niveles cambiaron en interacción con la temperatura de crecimiento para el primero de los compuestos nitrogenados, y con la disponibilidad de nitrógeno para el segundo. Aún a pesar del descenso encontrado en el contenido de compuestos nitrogenados de la hoja bandera del trigo en las plantas crecidas en CO₂ elevado, no tuvo lugar una pérdida de nitrógeno total en la planta, parámetro que varió de 36,22 a 39,45 mg de N en plantas crecidas a concentraciones de CO₂ ambientales y elevadas, respectivamente. Sin embargo, a diferencia de la anualidad anterior, el CO₂ elevado no modificó el peso fresco total de la planta, aunque incrementó significativamente el área verde -de 21,42 a 26,64 cm²-, peso fresco -de 0,423 a 0,565 g- y peso seco -de 0,126 a 0,164 g- de la hoja bandera, y el peso fresco de la espiga -de 1,801 a 2,364 g-, parámetros que variaron en interacción con las temperaturas ambientales. Probablemente este incremento no se observase en plantas crecidas a temperaturas elevadas debido a las condiciones climatológicas inherentes a la primavera de esta anualidad, provocando un crecimiento más acelerado y mayor velocidad de desarrollo ontogénico con el consiguiente acortamiento del periodo de tiempo transcurrido entre los diferentes estadios de desarrollo del cultivo de trigo en comparación con la experimentación desarrollada en el 2004. Aunque existen evidencias de que a concentraciones elevadas de CO₂ tiene lugar una mayor estimulación del crecimiento de la planta a medida que aumenta la temperatura (Kimball, 1986; Rawson, 1992; Wolfe, 1994), nuestros resultados a la emergencia de la espiga en esta anualidad, 2006, muestran variaciones considerables en la respuesta en concordancia con otros estudios (Mitchell et al., 1995; Van Oijen et al., 1998; Batts et al., 1998; Laurila, 2001; Assenga et al., 2004).

En estadios avanzados del desarrollo de los cultivos de trigo, *15 dda*, en la anualidad del **2006**, las variaciones fueron muy similares a las descritas en el anterior estadio. El crecimiento a [CO₂] elevadas redujo significativamente los niveles foliares de Glu, Gln, Gly y Ser, cambios que se tradujeron en un aumento de la razón Gln/Glu y una

disminución de la razón Gly/Ser, descenso que no llegó a alcanzar significación estadística, al igual que 12 dda en la anualidad anterior. Mientras que la razón Asn/Asp aumentó significativamente, los contenidos foliares de Asn y Ala tendieron a aumentar y los de Asp a disminuir. Las variaciones en los niveles de los aminoácidos considerados individualmente condujeron a un descenso del contenido foliar de aminoácidos mayoritarios, totales, aromáticos y minoritarios. La reducción del contenido de aminoácidos foliares encontrado en plantas crecidas con nitrógeno abundante en condiciones de CO₂ elevado, fue corroborada, en estadios más avanzados del desarrollo del cultivo, consecuencia como se ha indicado previamente de la deficiencia nutricional más acusada en la experimentación desarrollada en esta anualidad, en comparación con la del 2004; en la que únicamente se puso de manifiesto en estadios más avanzados del desarrollo foliar del cultivo, en los que la pérdida de nitrógeno fuera posiblemente más intensa. Lo que permite concluir que la abundancia de nitrógeno desencadena un descenso del contenido foliar de compuestos nitrogenados más importante en condiciones de CO₂ elevado. Los niveles de nitrato disminuyeron en plantas crecidas a [CO₂] elevadas, sin embargo, los niveles de clorofila no fueron modificados y los de proteínas se incrementaron, variando la pauta de cambio observada en estadios avanzados de la anterior anualidad, posiblemente consecuencia de la aceleración del crecimiento y el acortamiento de este estadio de desarrollo del cultivo por las condiciones climatológicas de esta anualidad. Las cuales dificultaron también la recogida de muestras para los estudios de crecimiento del cultivo en el estadio de 15 días después de la antesis. Aunque desconocemos el contenido de nitrógeno total en la planta en dicho estadio, suponemos que el crecimiento en CO₂ elevado no condujo a una pérdida de nitrógeno total en la planta, ya que en la cosecha final -a la madurez del cultivo- dicho parámetro varió de 50,30 a 49,20 mg de N en plantas crecidas a concentraciones de CO₂ ambientales y elevadas, respectivamente.

A la *emergencia de la espiga* en la anualidad del 2004, en plantas de trigo crecidas a temperaturas superiores a las ambientales disminuyeron los niveles foliares de todos los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente, a excepción del Glu y Asp, cuyos niveles apenas fueron modificados con la temperatura de crecimiento. Este hecho condujo a un descenso significativo tanto de los aminoácidos mayoritarios como de los totales, mientras que los minoritarios y aromáticos disminuyeron sin alcanzar significación estadística. En dichas condiciones, se ha observado también un descenso de la razón Asn/Asp que podría asociarse a una limitación de la actividad asparragina sintetasa (Geiger

et al., 1998), en particular, de la enzima codificada por el gen *ASN2* (Lam et al., 1994), consecuencia de la disminución de sacarosa encontrada en plantas crecidas a temperaturas elevadas (Lam et al., 1998). En *Arabidopsis*, se ha puesto de manifiesto la existencia de varios genes que codifican la asparragina sintetasa, enzima que cataliza la síntesis de Asn y Glu a partir de Asp y Gln. Dichos genes se conocen como *ASN1*, *ASN2* y *ASN3* (Lam et al., 1998), y parece ser que la estructura de los genes *ASN2* y *ASN3* difiere respecto al gen *ASN1* (Lam et al., 1994; 1995; 1998), y que la regulación de los niveles de ARNm de *ASN1* y *ASN2* es también diferente (Lam et al., 1994). Mientras que los transcritos de *ASN1* son reprimidos, los de *ASN2* son inducidos, por luz y sacarosa, de un modo cinéticamente recíproco (Lam et al., 1998). Además, la Gln, Glu o Asn mitigan parcialmente la represión de *ASN1* mediada por sacarosa y la inducción de *ASN2* (Lam et al., 1994; 1998). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la regulación de la expresión del gen *ASN1* es mediada por el factor de transcripción bZIP11 (Hanson et al., 2008b), aunque se desconoce el mecanismo implicado para el gen *ASN2*.

El incremento de la temperatura de crecimiento redujo significativamente la razón Gly/Ser y los niveles foliares de cada uno de estos aminoácidos, si bien en el caso de la Gly, esta reducción únicamente se observó en plantas crecidas a [CO₂] ambientales. Scheible et al. (2000) propusieron que las concentraciones foliares de Gly y Ser parecen ser influenciadas tanto por el estado nitrogenado de la planta como por la fotorrespiración, por lo que parecería plausible inferir que de la contribución de ambos factores dependerán los niveles de los aminoácidos mencionados en las condiciones ambientales indicadas en nuestro experimento, aún a pesar del desconocimiento de la contribución de cada uno de ellos. Además, en las plantas de trigo crecidas a temperaturas superiores a las ambientales los cambios observados en los niveles de Gln y Glu se tradujeron en una disminución de la razón Gln/Glu; un descenso de dicha razón ha sido a menudo considerado como un marcador de la limitación en nitrógeno (Stitt & Krapp, 1999; Foyer et al., 2003; Fritz et al., 2006b; Tschoep et al., 2009). La elevación de la temperatura también disminuyó el contenido foliar de Gln, a ambos niveles de CO₂ de crecimiento, siendo más acusado el efecto en plantas crecidas a [CO₂] ambientales.

Varios estudios han tratado de esclarecer la influencia tanto del proceso fotorrespiratorio como de la asimilación de nitrógeno en el contenido foliar de Gln en plantas, puesto que el primer proceso es notablemente más rápido, incluso diez veces superior al segundo (Stitt et al., 2002; Heldt, 2005). Sin embargo, Novitskaya et al. (2002) en un estudio con diferentes especies vegetales, entre ellas el trigo, pusieron de manifiesto

que mientras que no hubo una correlación clara entre los niveles foliares de Gln y la razón Gln/Glu con el flujo fotorrespiratorio, sí que la hubo con la velocidad de fotosíntesis -y en nuestro experimento la fotosíntesis aumentó en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales-. Ello podría asociarse a que la asimilación primaria de nitrógeno es coordinada con la fotosíntesis, por lo que la aportación de amonio por esta vía pudiera afectar al contenido de Gln más fuertemente que el proceso fotorrespiratorio, más rápido, pero cíclico. En consonancia con estas argumentaciones se ha encontrado a menudo una fuerte correlación positiva entre actividad NR y contenido foliar de Gln en mutantes de tabaco y transformantes con rangos diversos de actividad NR cuando crecen en diferentes concentraciones de nitrato (Scheible et al., 1997c). Otros estudios también sostienen una fuerte influencia de la asimilación de nitrógeno en los niveles foliares de Gln de la hoja y/o la razón Gln/Glu; mientras que la sobre-expresión de la NR en tabaco condujo a un aumento significativo de Gln (Foyer et al., 1994a), en cebada la razón Gln/Glu disminuyó en hojas que sufren déficit hídrico, aún a pesar de que la fotorrespiración posiblemente fuese incrementada en estas condiciones (Wingler et al., 1999). Estas aportaciones son consistentes con la noción de que, en ciertas condiciones al menos, la asimilación de nitrógeno afecta el contenido de Gln más que la velocidad de fotorrespiración (Foyer et al., 2003). En nuestro experimento, se ha comentado con anterioridad que la temperatura elevada condujo a un descenso de actividad NR, que se acompañaría de un descenso de la reducción de nitrato y como consecuencia la Gln se acumularía en menor medida. También se explicó que las temperaturas superiores a las ambientales redujeron el estado de activación del enzima en plantas crecidas a [CO₂] ambientales por lo que la regulación post-traducciona del enzima posiblemente condujo a una mayor limitación de la NR, alterando la estabilidad del enzima, lo que justificaría que la disminución del contenido foliar de Gln fuese más acusada en comparación con plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado, consecuencia de una mayor limitación en la reducción de nitrato. Además, a [CO₂] ambientales el incremento de temperatura redujo significativamente los niveles de transcritos de la subunidad pequeña de la Rubisco con ambos niveles de adición de nitrógeno al suelo (ver apartado 5.3) que podrían traducirse en un descenso de los niveles de proteína Rubisco.

En conjunto, los resultados descritos en plantas crecidas a temperaturas elevadas parecen indicar que frente a la estimulación inicial de la reducción de nitrato tuvo lugar una ralentización posterior. El descenso de actividad NR, junto al relativamente constante nivel de nitrato encontrado en dichas condiciones, es consistente con dicha proposición.

Los aminoácidos Asp y Glu, apenas fueron modificados, sugiriendo que no tuvo lugar una inducción de la biosíntesis de aminoácidos minoritarios, puesto que ambos aminoácidos actúan como donadores de grupos amino en la mayoría de las rutas biosintéticas implicadas (Heldt, 1997); mientras que la Gln actúa únicamente como donador amino en varias reacciones específicas, en particular la síntesis de Asn. Los restantes aminoácidos mayoritarios disminuyeron significativamente y los aminoácidos minoritarios sólo mostraron un ligero descenso, indicando que posiblemente tuvo lugar una limitación de la biosíntesis proteica (Scheible et al., 2004). Cambios que se acompañaron de una disminución en los niveles de clorofila y de un contenido proteico similar al encontrado en plantas crecidas a temperaturas ambientales. Sin embargo, un crecimiento acelerado previsible a temperaturas elevadas (Morison & Lawlor, 1999), demandará una mayor provisión de nitrógeno, por lo que sería plausible que en estas condiciones tuviera lugar una removilización de aminoácidos desde las proteínas, posiblemente desde la Rubisco, la máxima reserva de nitrógeno en hojas (Stitt, 1991), conduciendo a una redistribución del nitrógeno foliar. Proceso que pudiera ser energéticamente menos costoso y rápido, que la absorción y reducción de nitrato; facilitándose una rápida provisión de aminoácidos para el mantenimiento del crecimiento y la propia síntesis proteica. En consonancia con esta apreciación, al igual que en las plantas crecidas a [CO₂] elevadas, en aquellas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales no tuvo lugar una pérdida de nitrógeno total en la parte aérea de la planta, parámetro que osciló entre 39,09 y 39,75 mg de N, a temperaturas ambientales y elevadas, respectivamente. Y el contenido de nitrógeno total en la hoja bandera y la espiga tampoco fue modificado por la temperatura de crecimiento, variando de 6,74 y 9,92 mg de N, a temperaturas ambientales, a 6,79 y 10,12 mg de N, a temperaturas superiores a las ambientales, respectivamente. Sin embargo, el crecimiento a temperaturas elevadas sí que incrementó significativamente el área de la espiga, de 31,75 a 33,80 cm², sugiriendo que dicho órgano actuaría como un fuerte sumidero de asimilados de la hoja bandera en las condiciones indicadas.

Por otra parte, se sabe que la ontogenia de la planta y la morfogénesis dependen fuertemente de la temperatura, la cual puede aumentar la velocidad de desarrollo ontogénico, siendo el resultado un acortamiento del periodo de crecimiento, con la reducción consiguiente del periodo de tiempo para la fijación del carbono y acumulación de biomasa antes del desarrollo de la semilla (Rawson, 1992; Morison, 1996; Bowes, 1996), que para el caso particular del trigo, podría afectar al desarrollo del cultivo por acortamiento del periodo desde la siembra a la emergencia (Addae & Pearson, 1992), por

cambio de la duración de la fase vegetativa (Angus et al., 1981) o por reducción de la duración del llenado del grano (Amir & Sinclair, 1992). En nuestro experimento con trigo, a diferencia del incremento observado con el CO₂ de crecimiento, hemos podido comprobar que en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, la biomasa total de la planta no fue aumentada significativamente. Sin embargo, el peso fresco del tallo por planta incrementó de 6,188 g en plantas crecidas a temperaturas ambientales a 6,812 g en aquellas crecidas a temperaturas elevadas, resultado que confirma el cambio fenotípico observado en las plantas crecidas a temperaturas elevadas, puesto que visualmente podía apreciarse una mayor altura en las plantas del cultivo. Aunque algunos estudios han mostrado un cambio en el crecimiento tanto del área foliar como de la biomasa de la planta por la temperatura elevada (Pinter et al., 1996, 1997), nuestros resultados no evidencian un incremento significativo de la biomasa total de la planta en este estadio de desarrollo del cultivo, con la excepción del aumento indicado del peso fresco del tallo por planta. Algo similar ocurrió con el área foliar, que no llegó a aumentar significativamente, sin embargo, el área de la espiga aumentó en las plantas desarrolladas a temperaturas superiores a las ambientales, como se ha mencionado en el párrafo anterior, sugiriendo que la espiga actuaría como un fuerte sumidero de asimilados. Conviene también resaltar, en referencia a la morfología foliar, que las temperaturas elevadas disminuyeron el peso seco por área foliar (Gutiérrez et al., 2009b), de acuerdo con hallazgos recientes (Dwyer et al., 2007), sin modificar significativamente el volumen foliar por unidad de superficie. A diferencia de los cambios encontrados en las plantas crecidas en CO₂ elevado, las temperaturas más cálidas no aumentaron la masa de líquido por unidad de superficie o volumen. Resultados que sugieren que posiblemente, las hojas en temperaturas elevadas tuvieron más espacios con aire, a diferencia con las hojas más hidratadas en CO₂ elevado que ambiente.

En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo, *12 días después de la antesis* en la anualidad del **2004**, el crecimiento a temperaturas elevadas redujo significativamente los niveles foliares de Glu, Gln, Asn y Ser, mientras que la Gly tendió a disminuir y la Ala apenas fue modificada por la temperatura de crecimiento. Los cambios en los aminoácidos individuales condujeron a un descenso de la razón Gln/Glu y Asn/Asp, si bien la razón Gly/Ser apenas fue modificada por la temperatura de crecimiento. El descenso de aminoácidos se acompañó de una reducción del contenido foliar de aminoácidos mayoritarios, minoritarios y totales, sintomático de la deficiencia en nitrógeno en plantas crecidas a temperaturas elevadas junto al descenso de la razón Gln/Glu. El menor

contenido de aminoácidos se tradujo también en una reducción de los niveles foliares de nitrato, clorofila y proteínas. No obstante, resulta relevante destacar que la temperatura elevada redujo notablemente el contenido de aminoácidos foliares en plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂, consecuencia de la predecible aceleración del crecimiento respecto a aquellas crecidas a temperaturas ambientales.

Sin embargo, aún a pesar del descenso foliar de aminoácidos y de otros compuestos nitrogenados encontrado en las plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, como ocurrió en el estadio de la emergencia de la espiga, el contenido de nitrógeno total por planta no fue modificado por la temperatura de crecimiento, parámetro que osciló entre 43,10 y 44,78 mg de N a temperaturas ambientales y elevadas, respectivamente. Si bien, el nitrógeno total de la espiga aumentó significativamente en las plantas crecidas a temperaturas elevadas con respecto a las ambientales -de 19,17 a 20,52 mg de N-, lo que sugiere que tuvo lugar una mayor exportación del nitrógeno foliar a la espiga en este estadio de desarrollo del cultivo de trigo. También se observó que en plantas crecidas con nitrógeno abundante, la temperatura elevada incrementó el peso fresco -de 2,630 a 3,039 g- y peso seco -de 1,001 a 1,117 g- de la espiga, lo que nos sugiere que el nitrógeno es esencial para el mantenimiento del crecimiento acelerado a temperaturas superiores a las ambientales en estadios avanzados del desarrollo del cultivo. A diferencia de lo ocurrido en estadios jóvenes, la temperatura elevada condujo a un incremento de la biomasa total, reflejado no sólo por el aumento del peso seco del primer entrenudo -de 0,573 a 0,620 g- y por las variaciones en los parámetros de crecimiento de la espiga arriba mencionadas, sino por el incremento en un 4,9% y 6%, del peso seco -de 2,90 a 3,05 g- y peso fresco -de 8,27 a 8,80 g- del total de la parte aérea de la planta, respectivamente.

En la anualidad del **2006** a la *emergencia de la espiga*, el crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales condujo a un descenso generalizado de los niveles de aminoácidos, cambios similares a los descritos en la experimentación del 2004, aunque no llegaron a alcanzar significación estadística, a excepción del Glu, la Gly y los aminoácidos minoritarios. Los efectos observados en las razones Asn/Asp y Gln/Glu en la anterior anualidad en el mismo estadio de desarrollo del cultivo desaparecieron. El contenido foliar de nitrato disminuyó notablemente en plantas crecidas a temperaturas elevadas en interacción con los restantes factores ambientales, sugiriendo que el crecimiento acelerado previsible en dichas condiciones facilitó la reducción de nitrato y posterior asimilación en compuestos nitrogenados. El crecimiento a temperaturas elevadas no afectó a los niveles de proteínas totales y modificó de manera variable los de clorofila en interacción con el

CO₂ de crecimiento, poniendo de manifiesto que en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, el CO₂ elevado redujo el contenido foliar de clorofila, consecuencia de la aceleración del crecimiento y la mayor exportación de asimilados a otros órganos en crecimiento.

Al igual que en la anualidad del 2004, no se observó una pérdida significativa de nitrógeno en la parte aérea de la planta que varió de 38,39 mg de N, en plantas crecidas a temperaturas ambientales, a 37,28 mg de N, en plantas crecidas a temperaturas elevadas. Y el nitrógeno total tanto de la hoja bandera como de la espiga tampoco fue modificado por la temperatura de crecimiento. Sin embargo, en esta anualidad, la temperatura elevada disminuyó el área -de 26,64 a 22,64 cm²-, peso seco -de 0,1640 a 0,1375 g- y fresco -de 0,565 a 0,478 g- de la hoja bandera en plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂, consecuencia posiblemente de la mayor limitación en el suministro de nitrógeno, con respecto a la anterior anualidad, para el sostenimiento de una velocidad de desarrollo acelerada predecible en las condiciones ambientales descritas. En conformidad con la escasez de nitrógeno, el peso fresco total de la planta también disminuyó -de 9,38 a 8,43 g- en plantas crecidas en deficiencia en nitrógeno respecto a aquellas desarrolladas con abundancia de dicho nutriente. La pérdida de biomasa en las condiciones indicadas, que representó en torno a un 10%, pone de manifiesto la fuerte dependencia del crecimiento de las plantas, en particular la ontogenia y la morfogénesis, de factores ambientales como la temperatura y la nutrición nitrogenada, más aún en condiciones de CO₂ elevado (Rawson, 1992; Morison, 1996; Bowes, 1996).

En estadios más avanzados de desarrollo del cultivo, **15 dda**, en la anualidad del **2006**, las diferencias observadas se hicieron más notables que en la emergencia de la espiga. El crecimiento a temperaturas elevadas redujo significativamente los niveles foliares de Ser, Gln, Gly y Ala. Los cambios en los niveles de los aminoácidos fotorrespiratorios no se acompañaron de un descenso de la razón Gly/Ser, mientras que la razón Gln/Glu disminuyó notablemente y la razón Asn/Asp tampoco fue modificada por la temperatura de crecimiento. Los aminoácidos minoritarios, mayoritarios y totales fueron menores en plantas crecidas a temperaturas elevadas, y aunque los niveles de nitrato fueron modificados en interacción con los demás factores ambientales, las proteínas totales y clorofilas disminuyeron. Variaciones que siguieron una pauta similar a las descritas en anualidad del 2004 en el mismo estadio de desarrollo.

En la hoja bandera del trigo, a la *emergencia de la espiga* en la anualidad del 2004, la abundancia de nitrógeno condujo a un aumento generalizado de aminoácidos tanto de los mayoritarios como los minoritarios y aromáticos, que se tradujo en un incremento del contenido foliar de aminoácidos totales. El contenido de aminoácidos foliares se correlaciona con el suministro de nitrógeno (Khamis et al., 1990; Scheible et al., 1997c). Existen evidencias de que los niveles de aminoácidos disminuyen cuando el nitrógeno es limitante (Stitt & Krapp, 1999) y se ha puesto de manifiesto en diferentes especies vegetales (Foyer et al., 2003), tales como tabaco (Geiger et al., 1999; Scheible et al., 2000; Fritz et al., 2006b), colza (Tilsner et al., 2005) y Arabidopsis (Loudet et al., 2003; Scheible et al., 2004; Lemaitre et al., 2008; Tschoep et al., 2009). De modo parecido, se ha observado un incremento del contenido de aminoácidos cuando el nitrato o el amonio fueron suministrados, a corto plazo, a hojas cortadas de maíz (Foyer et al., 1994b) y tabaco (Morcuende et al., 1998). Habiéndose propuesto que los efectos a corto plazo posiblemente reflejen un incremento en el suministro de nitrógeno y/o activación de la NR, mientras que los cambios a largo plazo podrían asociarse a modificaciones en la expresión génica del enzima (Scheible et al., 1997b).

En un estudio con plantas de tabaco fertilizadas con fuentes de nitrógeno inorgánico diferentes -nitrato o nitrato amónico-, los niveles de aminoácidos totales, minoritarios y mayoritarios aumentaron en la hoja más joven completamente expandida de las plantas crecidas con nitrógeno abundante comparadas con las deficientes en dicho nutriente (Geiger et al., 1999). Ahora bien, la magnitud de acumulación de los aminoácidos varió con la fuente de nitrógeno empleada, siendo mayor la concentración foliar de aminoácidos en las plantas crecidas con nitrato amónico, consecuencia del incremento notable de los niveles foliares de Gln, indicativo de que en dichas condiciones tuvo lugar una inducción de la asimilación de amonio (Stitt & Krapp, 1999). Además, se ha mostrado que el suministro de nitrato a hojas cortadas de tabaco condujo a una acumulación de aminoácidos mayoritarios, minoritarios y aromáticos, sugiriendo que la estimulación de la asimilación de nitrógeno por la abundancia de nitrato indujo la síntesis de aminoácidos y posterior síntesis de proteínas (Morcuende et al., 1998). Dichos resultados están en concordancia con los observados en la hoja bandera del trigo, ya que la abundancia de nitrógeno condujo a un aumento en el contenido de nitrato en interacción con los demás factores ambientales, un incremento generalizado de aminoácidos y de proteína total (Morcuende et al., 1998; Geiger et al., 1999; Tschoep et al., 2009). A su vez, el contenido en clorofila también se incrementó en dichas condiciones, aunque únicamente se observó

en plantas crecidas a temperaturas ambientales y en aquellas crecidas a [CO₂] ambientales; un aumento en el contenido foliar de clorofila en condiciones de abundancia de nitrógeno se ha puesto de manifiesto en distintas especies vegetales como trigo (Adam et al., 2000; Del Pozo et al., 2007) y tabaco (Terce-Laforgue et al., 2004).

Los aminoácidos mayoritarios considerados individualmente mostraron pautas de acumulación diferente, mientras que los niveles de Gln aumentaron, los de Glu no fueron modificados con el suministro de nitrógeno, lo que se tradujo en un ligero aumento, no significativo, de la razón Gln/Glu. Los niveles de Asn y Ser fueron incrementados significativamente, mientras que los de Gly y Ala tendieron a aumentar sin llegar a alcanzar significación estadística. Estos cambios se acompañaron de un incremento significativo de la razón Asn/Asp y de un descenso de la razón Gly/Ser. Análogas variaciones en los niveles de dichos aminoácidos han sido encontradas en plantas de tabaco cultivadas con nitrógeno abundante a horas similares durante el fotoperiodo (Fritz et al., 2006b). Scheible et al. (2000) en otro estudio también con tabaco encontraron un aumento de todos los aminoácidos mayoritarios y de las razones Gln/Glu y Asn/Asp, en plantas crecidas con abundancia de nitrógeno en comparación con aquellas deficientes en dicho nutriente; resultados similares a los observados con trigo, con la diferencia de que la razón Gly/Ser no fue alterada en las primeras horas de luz con la nutrición nitrogenada, razón que disminuyó en la hoja bandera del trigo.

Nuestros resultados revelan que mientras que existen grandes cambios transitorios en los niveles de Gln, los de Glu permanecen relativamente constantes, indicando que la GOGAT, posiblemente en conjunción con la glutamato deshidrogenasa, representa un importante punto de regulación (Stitt et al., 2002). Niveles relativamente estables de los contenidos foliares de Glu también han sido observados en las restantes condiciones ambientales objeto de este estudio. Se ha propuesto que la variabilidad en los niveles de Gln y el contenido de otros aminoácidos es a menudo dependiente de las condiciones de crecimiento (Matt et al., 1998) y considerando que los niveles de los aminoácidos dependerán de los precursores carbonados, del nitrógeno reducido disponible, así como los flujos en el metabolismo posterior (Lea et al., 2006), dicha variabilidad podría explicar que la abundancia de nitrógeno en el trigo tendiera a aumentar la razón Gln/Glu, sin alcanzar significación estadística, en consonancia con resultados previos de plantas fertilizadas con abundancia o deficiencia en dicho nutriente (Foyer et al., 2003; Scheible et al., 2004; Fritz et al., 2006b).

Se sabe que el nitrato no sólo sirve como fuente importante de nitrógeno inorgánico en plantas (Stitt & Krapp, 1999), sino que también actúa como molécula señalizadora que modula la expresión de genes involucrados en la absorción y asimilación de nitrato, en la biosíntesis de ácidos orgánicos, síntesis de almidón y glicólisis, entre otros procesos (Lam et al., 1994, 1996, 1998; Koch, 1997; Scheible et al., 1997b; Crawford & Glass, 1998; Forde & Clarkson, 1999; Stitt, 1999; Foyer et al., 2003; Wang et al., 2000, 2003; Scheible et al., 2004). Estos estudios de expresión génica han mostrado evidencias de que el nitrato actúa modulando la expresión de genes involucrados no sólo en el metabolismo del nitrógeno sino también del carbono (Wang et al., 2003). Recientemente, la respuesta transcripcional más llamativa encontrada tras el resuministro de nitrógeno a plántulas de *Arabidopsis* deficientes en dicho nutriente, fue la inducción coordinada de un conjunto de genes requeridos para la biosíntesis de aminoácidos, síntesis proteica y síntesis y procesamiento de ARN (Scheible et al., 2004). Aunque se desconoce si la inducción de dichos eventos fue mediada por el propio nitrato o algún otro intermediario de su asimilación posterior (Scheible et al., 2004).

Nuestros resultados, en su conjunto, muestran que a la emergencia de la espiga, la abundancia de nitrógeno en plantas de trigo condujo a un aumento de la absorción de nitrato e inducción de su reducción, y asimilación posterior, que se tradujo en una estimulación de la biosíntesis de aminoácidos, proteínas y clorofilas; como reflejan los incrementos de dichos compuestos encontrados en la hoja bandera de plantas crecidas en dichas condiciones. Cambios que se acompañaron de un incremento significativo tanto del contenido de nitrógeno total en la parte aérea de la planta -de 35,83 a 43,01 mg de N en deficiencia y abundancia de nitrógeno, respectivamente- como en cada una de las partes de la planta analizadas individualmente, es decir, tallo -de 12,37 a 14,46 mg de N-, espiga -de 9,29 a 10,75 mg de N-, hoja bandera -de 5,66 a 7,88 mg de N- y resto de hojas -de 8,51 a 9,91 mg de N-. Resultados en consonancia con otros estudios (Morcuende et al., 1998; Geiger et al., 1999; Adam et al., 2000; Del Pozo et al., 2007; Tschoep et al., 2009) y con los cambios de expresión génica observados por otros autores (Scheible et al., 1997b; Stitt, 1999; Wang et al., 2000, 2003; Scheible et al., 2004).

Por otra parte, es sabido que el suministro de nitrógeno posee efectos marcados en la biomasa y la productividad vegetal (Lawlor et al., 1989), y en nuestro experimento, el crecimiento en abundancia de nitrógeno no sólo aumentó los niveles de nitrógeno en cada una de las partes de la planta del trigo, sino que también incrementó el área -de 22,39 a 27,70 cm²-, peso fresco -de 0,4582 a 0,5987 g- y peso seco -de 0,1279 a 0,1619 g- de la

hoja bandera, así como el área de la espiga -de 31,39 a 34,17 cm²- y su peso fresco -de 1,965 a 2,114 g-. Además, el suministro alto de nitrógeno aumentó el grosor (razón volumen/superficie), de acuerdo con Rademacher & Nelson (2001), el peso seco por área y la densidad foliares (Gutiérrez et al., 2009b). Con más nitrógeno, aumentó la masa de líquido por unidad de superficie y volumen, como con CO₂ elevado comparado con ambiente. En cambio, con más nitrógeno la masa de agua aumentó proporcionalmente al aumento de masa foliar, de modo que el porcentaje de agua resultó inalterado. Puesto que el mayor grosor de las hojas en abundancia de nitrógeno que en deficiencia se asoció con mayor masa de agua, los cambios en la proporción de espacios con aire en la hoja, tales como la disminución encontrada por Rademacher & Nelson (2001), es probable que fueran de escasa consecuencia para el grosor foliar.

Estos resultados revelan que la nutrición nitrogenada no sólo aumentó la cantidad de nitrógeno en la planta entera sino que afectó también a su distribución entre órganos (Del Pozo, 1994; Dreccer et al., 2000), además de facilitar la expansión foliar y el crecimiento (Maroco et al., 1999; Poorter & Nagel, 2000) y modificar la anatomía foliar. Los cambios en la morfología foliar observados en las plantas crecidas con abundancia de nitrógeno, que difieren de aquellos observados en aquellas crecidas en condiciones de CO₂ elevado y a temperatura superiores a las ambientales, parecen excluir que los cambios anatómicos inducidos por estos dos últimos factores ambientales sean simple consecuencia de la disminución en el nitrógeno foliar encontrado en nuestro estudio y en otros (Del Pozo et al., 2007).

En estadios avanzados del desarrollo foliar del trigo, *12 días después de la antesis* en la anualidad del **2004**, la abundancia de nitrógeno aumentó significativamente los niveles foliares de Asn y Gln, además de las razones Gln/Glu y Asn/Asp, sugiriendo que se incrementó la disponibilidad de nitrógeno y que posiblemente tuvo lugar una estimulación de la actividad asparagina sintetasa. El incremento de la disponibilidad de nitrógeno, al igual que en estadios jóvenes del desarrollo del cultivo, se acompañó de una mayor acumulación de aminoácidos minoritarios, aromáticos y totales. Sin embargo, en este estadio de desarrollo observamos una interacción destacable del suministro de nitrógeno con el CO₂ de crecimiento, en la que la abundancia de nitrógeno condujo a un aumento de aminoácidos en plantas crecidas a concentraciones ambientales de CO₂, condiciones en las que la velocidad de crecimiento de la planta estaría ralentizada con respecto a las concentraciones elevadas de CO₂, lo que permitiría que los aminoácidos se acumulasen en mayor medida. Además, la abundancia de nitrógeno facilitó la absorción de dicho nutriente

conduciendo a un aumento de la concentración foliar de nitrato, si bien el contenido de clorofila no fue modificado y las proteínas totales disminuyeron. Sin embargo, al igual que en la emergencia de la espiga, el nitrógeno total de la parte aérea aumentó, parámetro que varió de 40,08 mg de N, en plantas crecidas en deficiencia de nitrógeno, a 47,80 mg de N, en plantas crecidas con abundancia en dicho nutriente, así como el contenido de nitrógeno de cada una de las partes de la planta, a excepción del resto de hojas. A diferencia de los cambios observados en estadios jóvenes del desarrollo del cultivo, el crecimiento en abundancia de nitrógeno no modificó el área de la hoja bandera respecto a las plantas crecidas en deficiencia de dicho nutriente; sin embargo, tanto el peso seco -0,1272 a 0,1518 g- como el peso fresco -0,4169 a 0,4778 g- de la misma fue incrementado. Por su parte, el área de la espiga también aumentó con la disponibilidad de nitrógeno -de 36,76 a 40,40 cm²-, peso seco -de 0,976 a 1,117 g- y peso fresco -de 2,667 a 3,039 g- en interacción con la temperatura de crecimiento. Resultados que, en su conjunto, muestran una pauta de cambio similar a la descrita previamente en estadios jóvenes del desarrollo del cultivo de trigo.

A la *emergencia de la espiga* en la anualidad del **2006**, la abundancia de nitrógeno condujo a un aumento significativo de todos los aminoácidos considerados individualmente, cambios que se acompañaron de un descenso de la razón Gly/Ser y aumento de la razón Gln/Glu y de los aminoácidos totales, mayoritarios, minoritarios, y aromáticos. A diferencia de los resultados descritos en la anualidad del 2004, la abundancia de nitrógeno aumentó el contenido foliar de aminoácidos en plantas crecidas en condiciones ambientales de CO₂, posiblemente consecuencia de las diferencias en la disponibilidad de nitrógeno entre los tratamientos de abundancia y deficiencia de dicho nutriente en esta experimentación con respecto a la desarrollada en la anterior anualidad. Por lo que sería previsible que al aumentar la provisión de nitrógeno, se facilitaría su asimilación, y puesto que el crecimiento en condiciones ambientales de CO₂ suele estar más ralentizado que en condiciones de CO₂ elevado, exigiría una menor demanda de asimilados desde los órganos en expansión; lo que conduciría a un descenso de la exportación respecto a las plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂ y se traduciría en un aumento de aminoácidos foliares en la hoja bandera del trigo.

Los cambios descritos en los aminoácidos sugieren que el aumento de la disponibilidad de nitrógeno se tradujo en una fuerte estimulación de la absorción de nitrógeno e inducción posterior de su asimilación en compuestos orgánicos nitrogenados, evidenciado por el fuerte descenso del contenido foliar de nitrato y el incremento de los niveles de clorofila y

proteínas. Junto con el aumento notable del contenido de nitrógeno total por tallo en plantas crecidas en abundancia de nitrógeno respecto a aquellas crecidas en deficiencia en dicho nutriente -31,96 y 43,71 mg de N-, así como del contenido de nitrógeno en cada una de las partes de la planta, con la excepción del resto de hojas.

En la experimentación desarrollada en esta anualidad, 2006, en la emergencia de la espiga, el incremento de la disponibilidad de nitrógeno supuso un beneficio más acentuado, sobre el crecimiento de la planta, con respecto a las plantas crecidas con deficiencia en nitrógeno, en comparación a la experimentación desarrollada en la anterior anualidad, que podría atribuirse a la deficiencia nutricional más intensa inducida en esta anualidad respecto a la del 2004 (ver apartados 3.2 y 5.4). Que puso de manifiesto que en plantas crecidas en abundancia de nitrógeno no sólo aumentó el área verde -de 20,41 a 26,91 cm²-, peso fresco -de 0,409 a 0,570 g- y peso seco -de 0,1208 a 0,1623 g- de la hoja bandera, sino que también aumentó el área -de 39,13 a 45,54 cm²-, peso fresco -de 1,652 a 2,180 g- y peso seco -de 0,405 a 0,591 g- de la espiga, junto al área -de 19,07 a 22,81 cm²-, peso fresco -de 1,373 a 1,687 g- y peso seco -de 0,342 a 0,392 g- del primer entrenudo, así como el área -de 154,3 a 195,4 cm²-, peso fresco -de 8,43 a 10,54 g- y peso seco -de 2,264 a 2,488 g- del total de la parte aérea. Ahora bien, el incremento del área y peso fresco tanto de la espiga como de la parte aérea total, únicamente fue observado en plantas crecidas a temperaturas elevadas, sugiriendo que la abundancia de nitrógeno facilitó el crecimiento acelerado previsible a temperaturas superiores a las ambientales en estadios jóvenes del desarrollo del cultivo de trigo, dada la fuerte dependencia del crecimiento y desarrollo de las plantas de los factores ambientales como la temperatura y la nutrición (Lawlor & Mitchell, 1991), aspectos que han sido reseñados con anterioridad.

En estadios avanzados del desarrollo de los cultivos de trigo, **15 dda**, en esta anualidad del **2006**, la pauta de cambio fue similar a la descrita en la emergencia de la espiga, aunque los cambios fueron más atenuados y se observaron ciertas excepciones, como la disminución de la razón Gln/Glu y la modificación variable de los aminoácidos minoritarios con la disponibilidad de nitrógeno dependiendo de los restantes factores ambientales. Los cambios en los niveles de aminoácidos individuales condujeron a un aumento significativo de los niveles de aminoácidos mayoritarios, minoritarios, aromáticos y totales. La interacción destacable del suministro de nitrógeno con el CO₂ de crecimiento, descrita en el mismo estadio de desarrollo, 12 dda, en la anualidad anterior, tuvo lugar nuevamente en esta anualidad, poniendo de manifiesto que se trata de un efecto robusto dependiente de la nutrición nitrogenada en estadios avanzados de desarrollo del cultivo de

trigo. La abundancia de nitrógeno, al igual que en el 2004, aumentó el contenido foliar de nitrato, sugiriendo que tuvo lugar una inducción de la absorción de nitrógeno, que se acompañó de una estimulación de la asimilación posterior del nitrógeno en compuestos orgánicos nitrogenados y se tradujo en un aumento de las concentraciones foliares de clorofilas y proteínas, pero desconocemos el contenido de nitrógeno en cada una de las partes de la planta y los datos de crecimiento en este estadio de desarrollo del cultivo, aunque sería predecible que al igual que en estadios jóvenes del desarrollo el incremento de la disponibilidad de nitrógeno beneficiara el crecimiento de las plantas de trigo y facilitase la distribución de nitrógeno a nivel de planta entera.

6. CONCLUSIONES

1. El crecimiento prolongado a concentraciones elevadas de CO₂ condujo a una pérdida de capacidad fotosintética en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo en ambas anualidades, y en estadios avanzados, en la primera de las dos anualidades estudiadas, atribuible a una pérdida de compuestos nitrogenados en la hoja bandera del trigo.
2. El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales en la primera anualidad, aumentó la fotosíntesis, la conductancia de los estomas y la concentración intercelular de CO₂ a la emergencia de la espiga. Por lo que en dicho estadio de desarrollo las temperaturas elevadas incrementaron la difusión del CO₂ a través de los estomas aumentando la fotosíntesis, pero no modificó la asimilación fotosintética del carbono en la experimentación desarrollada en el 2006 y días después de la anthesis en la anualidad del 2004.
3. La abundancia de nitrógeno aumentó la asimilación fotosintética del carbono, en ambos estadios de desarrollo, en la experimentación desarrollada en la primera anualidad, efecto que no llegó a alcanzar significación estadística en el 2006. La pérdida de capacidad fotosintética en plantas deficientes en nitrógeno podría ser atribuible a una reducción del contenido foliar de Rubisco.
4. Varios estudios han relacionado la pérdida de capacidad fotosintética en plantas crecidas en CO₂ elevado con un descenso de Rubisco, a menudo asociado con la represión génica del enzima mediada por la acumulación de carbohidratos foliares. Si bien nuestros resultados no muestran evidencias convincentes que apoyen dicha hipótesis. No obstante, a la emergencia de la espiga en la anualidad del 2004, el crecimiento en CO₂ elevado redujo los niveles de transcritos de *rbcS* en plantas de trigo crecidas con deficiencia en nitrógeno a temperaturas ambientales, condiciones en las que los carbohidratos foliares se acumularon notablemente. Sin embargo, a diferencia de los resultados mostrados por otros autores, no hemos observado que la aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado fuese más acusada en las plantas deficientes en nitrógeno. Por lo que dichos resultados no podrían ser interpretados como evidencia de que la represión génica de la Rubisco por carbohidratos opera más eficazmente en plantas limitadas en nitrógeno.
5. Este estudio muestra por primera vez, en estadios tempranos del desarrollo foliar del trigo, un descenso drástico de los transcritos de Rubisco con la temperatura elevada en plantas crecidas a [CO₂] ambientales, tanto en abundancia como deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, la temperatura elevada aumentó la fotosíntesis y disminuyó el contenido foliar de carbohidratos respecto a las plantas crecidas a temperaturas ambientales.
6. Nuestros resultados muestran evidencias de que las respuestas de aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado no pueden predecirse por cambios en los niveles de mensajero de la Rubisco. La variable correspondencia del nivel de transcritos de Rubisco con la acumulación de carbohidratos solubles, pone de manifiesto que la influencia de otros factores puede modular la expresión del enzima en plantas que crecen en ambientes naturales, entre ellos el nitrógeno, aspecto que ha sido discutido en este trabajo de investigación.
7. El crecimiento prolongado a concentraciones elevadas de CO₂ atmosférico condujo a un incremento de los niveles foliares de carbohidratos, en especial sacarosa y

fructanos, a la emergencia de la espiga en la experimentación del 2004. Sin embargo, en estadios posteriores del crecimiento, la acumulación de carbohidratos foliares no sólo desapareció sino que los niveles de sacarosa y fructanos tendieron a disminuir, consecuencia de la mayor demanda de carbohidratos requerida para el mantenimiento de un crecimiento acelerado en condiciones de CO₂ elevado a medida que avanza el desarrollo del cultivo.

8. En la experimentación desarrollada en la anualidad del 2006, se evitó el abonado de fondo con fertilizante nitrogenado, con el fin de conseguir diferencias más notables entre los tratamientos de abundancia y deficiencia en nitrógeno, por lo que la deficiencia nutricional en esta anualidad fue más intensa y condujo a una mayor acumulación de carbohidratos foliares, en ambos estadios del desarrollo foliar del trigo. En estas condiciones, el crecimiento en CO₂ elevado condujo a una mayor acumulación de carbohidratos de reserva, fructanos y almidón, mientras que los primeros se acumularon en estadios jóvenes del desarrollo, el segundo se acumuló en mayor medida en etapas más avanzadas del crecimiento del cultivo del trigo.
9. El crecimiento a temperaturas 2°C superiores a las ambientales a la emergencia de la espiga, a diferencia del CO₂ elevado, disminuyó el contenido foliar de carbohidratos, en particular sacarosa, cambios atribuibles tanto a la estimulación del crecimiento previsible a temperaturas elevadas como al consumo de carbohidratos en la glicólisis y respiración mitocondrial. Días después de la antesis, el crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales redujo notablemente los niveles de carbohidratos de almacenaje, fructanos y almidón.
10. La abundancia de nitrógeno aumentó los niveles foliares de hexosas y disminuyó ligeramente los de sacarosa y fructanos, sugiriendo que tuvo lugar una mayor exportación del carbono para satisfacer la estimulación de la asimilación del nitrógeno al aumentar la disponibilidad de nutrientes.
11. Aún a pesar de la mayor acumulación de carbohidratos foliares en condiciones de CO₂ elevado, la actividad nitrato reductasa sólo aumentó ligeramente, a la emergencia de la espiga en la anualidad 2004, consecuencia del notable descenso de los niveles foliares de nitrato. En estadios avanzados del desarrollo del cultivo, a [CO₂] elevadas la actividad NR disminuyó en plantas crecidas con nitrógeno abundante y aumentó en plantas deficientes en dicho nutriente. El primero de los efectos se atribuyó al descenso del contenido foliar de nitrato, y el segundo, sería el resultado del ligero aumento de nitrato y descenso de glutamina, cambios que facilitarían el aumento de actividad NR. A la emergencia de la espiga en la anualidad del 2006, en plantas crecidas a temperaturas ambientales, el CO₂ elevado aumentó la actividad del enzima, consecuencia de la mayor acumulación de carbohidratos foliares. Cambios que desaparecieron en etapas posteriores del crecimiento del cultivo.
12. La pérdida de actividad NR encontrada en plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, a la emergencia de la espiga en la anualidad del 2004, se asoció con el descenso del contenido foliar de sacarosa. Días después de la antesis la actividad NR sólo disminuyó ligeramente, aún a pesar del descenso del contenido foliar de nitrato, sin embargo, la sacarosa se acumuló en mayor medida en este estadio del desarrollo, lo que facilitaría que la pérdida de actividad fuese más atenuada que en la emergencia de la espiga. En la anualidad del 2006, en

etapas tempranas del desarrollo, la elevación de la temperatura disminuyó la actividad del enzima en plantas crecidas en condiciones de CO₂ elevado, y en etapas posteriores del desarrollo del cultivo, el crecimiento a temperaturas elevadas redujo la actividad NR en plantas deficientes en nitrógeno, pérdidas de actividad que se relacionaron con el descenso del contenido foliar de nitrato encontrado en las condiciones de crecimiento descritas.

13. Nuestros resultados muestran evidencias de un mecanismo alternativo, no descrito hasta el momento, para las plantas crecidas a temperaturas superiores a las ambientales, en las que el descenso de actividad NR podría atribuirse a una retroinhibición de la actividad del enzima por malato, que facilitaría un descenso de la asimilación de nitrato cuando se supere la velocidad de exportación de malato. El aumento del contenido foliar de malato en las mencionadas condiciones, evidencia dicha hipótesis, y podría asociarse a una fuerte estimulación inicial de la asimilación del nitrógeno al comienzo del fotoperiodo (en consonancia con nuestras investigaciones previas). Si bien, desconocemos la contribución de cada uno de los mecanismos propuestos al control de la actividad NR, por lo que serán necesarias investigaciones más exhaustivas para dilucidar el posible predominio de alguno de ellos.
14. En la experimentación desarrollada en el 2004, a la emergencia de la espiga, la abundancia de nitrógeno aumentó ligeramente la actividad NR, cambios que se relacionaron con una retroinhibición de la expresión y la actividad del enzima, mediada por glutamina. En estadios posteriores del crecimiento, la abundancia de nitrógeno aumentó la actividad NR en plantas crecidas a [CO₂] ambientales, cambio atribuible al notable incremento del contenido foliar de nitrato. En la experimentación realizada en la anualidad del 2006, mientras que a la emergencia de la espiga, la actividad NR no fue modificada con la disponibilidad de nitrógeno, en estadios avanzados del desarrollo, la abundancia de nitrógeno disminuyó dicha actividad en plantas crecidas a temperaturas ambientales, cambios que se asociaron al descenso de nitrato.
15. El crecimiento en CO₂ elevado, condujo a un descenso de 3PGA y aumentos de hexosas-P y ATP, mientras que los niveles de malato disminuyeron y los de 2-oxoglutarato no fueron modificados, cambios similares a los descritos en otros sistemas experimentales que conducen a una acumulación de carbohidratos foliares. Sugiriendo que la acumulación de azúcares induce la asimilación de nitrato, e incrementa la síntesis de ácidos orgánicos desde los intermediarios de la glicólisis, facilitando el flujo del carbono y nitrógeno hacia la biosíntesis de aminoácidos.
16. El crecimiento a temperatura superiores a las ambientales condujo a un descenso del contenido foliar de ATP, 3PGA, UDP-glucosa y hexosas-P, mientras que los niveles de malato y 2-OG incrementaron, cambios que sugieren que tuvo lugar un fuerte incremento del flujo del carbono desde la glicólisis hacia la síntesis de ácidos orgánicos y, por lo tanto, de las rutas respiratorias.
17. En plantas crecidas en abundancia de nitrógeno los niveles de hexosas-P y 3PGA disminuyeron, los de ATP y UDP-glucosa tendieron a disminuir, mientras que los niveles de 2-OG fueron notablemente aumentados y los de malato sólo ligeramente, lo que sugiere que la estimulación de la asimilación de nitrógeno en las plantas de trigo crecidas con nitrógeno abundante demandaría una adecuada provisión de

carbono, que se acompañó de una disminución de intermediarios glicolíticos seguida de la consiguiente acumulación de ácidos orgánicos.

18. La reducción de las concentraciones foliares de glicina y serina en plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂, en ambas experimentaciones y estadios de desarrollo del cultivo de trigo, ponen de manifiesto que se trata de una respuesta robusta al crecimiento en CO₂ elevado, atribuible a una inhibición de la fotorrespiración.
19. El descenso de aminoácidos encontrado en plantas de trigo crecidas a [CO₂] elevadas, se acompañó de una disminución de los niveles foliares de nitrato y de otros compuestos nitrogenados como las clorofilas y proteínas, revelando una pérdida generalizada de compuestos nitrogenados foliares. Cambios que unidos al aumento de la superficie verde de la hoja bandera, sugieren un efecto de dilución del nitrógeno consecuencia del mayor área foliar encontrado en las plantas crecidas en CO₂ elevado.
20. En estadios avanzados del desarrollo del cultivo en la anualidad del 2004, y en ambos estadios del desarrollo foliar del trigo en la anualidad del 2006, condiciones en las que la deficiencia nutricional del cultivo fue más intensa, el crecimiento en CO₂ elevado condujo a una reducción notable del contenido foliar de aminoácidos en las plantas crecidas con nitrógeno abundante en comparación con aquellas crecidas en deficiencia en dicho nutriente, sugiriendo que al incrementarse la disponibilidad de nitrógeno, los recursos disponibles para la planta, son destinados a satisfacer el previsible crecimiento acelerado en condiciones de CO₂ elevado.
21. La respuesta de aclimatación al crecimiento prolongado en condiciones de CO₂ elevado, representa una estrategia de optimización en la distribución del nitrógeno desde la maquinaria fotosintética a la expansión foliar y el crecimiento. La aclimatación podría ser el resultado de un efecto indirecto de la desviación del nitrógeno para el crecimiento, más que consecuencia de un efecto directo del suministro de nitrógeno en la fotosíntesis. Y la disminución foliar de nitrógeno sería el resultado de un cambio en la localización o distribución de nitrógeno a nivel de planta entera, de manera que la espiga actuaría como un potente sumidero de asimilados.
22. El crecimiento a temperaturas superiores a las ambientales, al igual que en plantas crecidas en CO₂ elevado, redujo el contenido foliar de aminoácidos y de otros compuestos nitrogenados, pérdida que no se relacionó con el aumento del área foliar de la hoja bandera del trigo sino con un incremento de la superficie de la espiga, sugiriendo que dicho órgano actuaría como un fuerte sumidero de asimilados de la hoja bandera en las condiciones indicadas.
23. En estadios jóvenes del desarrollo foliar del trigo, la mayor provisión de nitrógeno requerida para el sostenimiento de un crecimiento acelerado previsible a temperaturas elevadas, facilitaría la removilización de aminoácidos desde la máxima reserva de nitrógeno en hojas, la Rubisco. Proceso que pudiera ser energéticamente menos costoso y rápido, que la absorción y reducción de nitrato; y contribuiría a una rápida provisión de aminoácidos que permitiría la redistribución del nitrógeno foliar en proteínas fotosintéticas y/o foliares que aumentarían la

asimilación fotosintética del carbono y promoverían el mantenimiento del crecimiento.

24. El incremento de la disponibilidad de nitrógeno al suelo condujo a un aumento de la absorción, reducción y asimilación de dicho nutriente en compuestos orgánicos nitrogenados, que se tradujo en un incremento de los niveles foliares de aminoácidos, proteínas y clorofilas en la hoja bandera. El incremento de nitrógeno foliar, aumentó el contenido de nitrógeno total tanto en la parte área como en cada una de las partes de la planta del trigo analizadas, sugiriendo que el aumento de la disponibilidad de nitrógeno facilitó la distribución del nitrógeno a nivel de planta entera. La mejora del estado nitrogenado de la favoreció el aumento de la asimilación fotosintética del carbono observado en plantas crecidas con nitrógeno abundante y el crecimiento de la planta.
25. Los factores ambientales condujeron a cambios en la morfología foliar del trigo, las hojas de plantas desarrolladas en CO₂ elevado experimentaron una disminución del peso seco por área, acompañada de una pérdida de densidad foliar, que se asoció con un aumento del agua de los tejidos y una reducción de algunos componentes estructurales de la hoja. En plantas crecidas a temperaturas superiores tuvo también lugar una disminución del peso seco por área. Pero a diferencia de los cambios encontrados en las plantas crecidas en CO₂ elevado, no aumentó la masa de líquido por unidad de superficie o volumen, lo que sugiere que posiblemente tuvieron más espacios con aire. La abundancia de nitrógeno aumentó el grosor, el peso seco por área, la densidad foliar y el porcentaje de agua resultó inalterado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adam N.R., Wall G.W., Kimball B.A., Pinter P.J.Jr., LaMorte L.R., Hunsacker D.J., Adamsen F.J., Thompson T., Matthias A.D., Leavitt S.W., Webber A.N.** (2000) Acclimation response of spring wheat in a free-air CO₂ enrichment (FACE) atmosphere with variable soil nitrogen regimes. 1. Leaf position and phenology determine acclimation response. *Photosynthesis Research* 66, 65-77.
- Addae P.C. & Pearson C.J.** (1992) Thermal requirements for germination and seedling growth of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 43, 585-594.
- Ainsworth E.A. & Long S.P.** (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 Phytologist* 165, 351-372.
- Ainsworth E.A. & Rogers A.** (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment* 30, 258-270.
- Ainsworth E.A., Davey P.A., Bernacchi C.J., Dermody O.C., Heaton E.A., Moore D.J., Morgan P.B., Naidu S.L., Ra H.S.Y., Zhu X.G., Curtis P.S., Long S.P.** (2002) A metaanalysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biology* 8, 695-709.
- Ainsworth E.A., Rogers A., Leakey A.D.B.** (2008) Targets for crop biotechnology in a future high-CO₂ and high-O₃ world. *Plant Physiology* 147, 13-19.
- Ainsworth E.A., Rogers A., Leakey A.D.B., Heady L.E., Gibon Y., Stitt M., Schurr U.** (2007) Does elevated atmospheric [CO₂] alter diurnal C uptake and the balance of C and N metabolites in growing and fully expanded soybean leaves? *Journal of Experimental Botany* 58, 579-591.
- Ainsworth E.A., Rogers A., Nelson R., Long S.P.** (2004) Testing the “source-sink” hypothesis of downregulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitution in *Glycine max*. *Agricultural and Forest Meteorology* 122, 85-94.
- Ainsworth E.A., Rogers A., Vodkin L.O., Walter A., Schurr U.** (2006) The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. *Plant Physiology* 142, 135-147.
- Albritton D.L., Allen M.R., Baede A.P.M. et al.** (2001) Summary for policy makers. In: *Climate Change 2001: The Scientific Bases. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Houghton J.T., Ding Y., Griggs D.J., Noguer M., Van der Linden P.J., Dai X., Maskell K., Johnson C.A., Eds.). University Press, Cambridge UK/New York, NY, USA.
- Allen L.H., Vu J.V.C., Valle R.R., Boote K.J., Jones P.H.** (1988) Non-structural carbohydrates and nitrogen of soybean growth under carbon dioxide enrichment. *Crop Science* 28, 84-94.
- Allen L.H., Beldi S.E., Shinn J.H.** (1985) Modelling the feasibility of free-air carbon dioxide release for vegetation response research. In: *17th Conference on Agricultural and Forest Meteorology and Seventh Conference on Biometeorology and Aerobiology*. Scottsdale, Arizona. Boston, Massachusetts. American Meteorology Society, pp.161-164.
- Allen L.H., Bisbal E.C., Campbell W.J., Boote K.J.** (1990) Carbon dioxide effects on soybean developmental stages and expansive growth. *Soil and Crop Science Society of Florida, Proceedings* 49, 124-131.
- Allen L.H., Drake B.G., Rogers H.H., Shinn J.H.** (1992) Field techniques for exposure of plants and ecosystems to elevated CO₂ and other trace gases. In: *FACE: Free-air CO₂ Enrichment for Plant Research in the Field* (Hendrey G.R., Ed.). Boca Raton, CRC Press, pp. 85-119.
- Alonso A., Pérez P., Morcuende R., Martínez-Carrasco R.** (2008) Future CO₂ concentrations, though not warmer temperatures, enhance wheat photosynthesis temperature responses. *Physiologia Plantarum* 132, 102-112.

- Amir J. & Sinclair T.R.** (1991) A model of the water limitation on spring wheat growth and yield. *Field Crop Research* 28, 59-69.
- Andersson I. & Backlund A.** (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 275-291.
- Andersson I.** (2008) Catalysis and regulation in Rubisco. *Journal of Experimental Botany* 59, 1555-1568.
- Andrews B.A., Raven J.A., Sprent J.I.** (2001) Environmental effects on dry matter partitioning between shoot and root of crop plants: relations with growth and shoot protein concentration. *Annals of Applied Biology* 138, 57-68.
- Andrews M., Lea P.J., Raven J.A., Lindsey K.** (2004) Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. *Annals of Applied Biology* 145, 25-40.
- Andrews T.J. & Lorimer G.H.** (1978) Photo-respiration - Still unavoidable? *FEBS Letters* 90, 1-9.
- Andrews T.J.** (1988) Catalysis by cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase large subunits in the complete absence of small subunits. *Journal of Biological Chemistry* 263, 12213-12219.
- Andrews T.J., Hudson G.S., Mate C.J., von Caemmerer S., Evans J.R., Arvidsson Y.B.C.** (1995) Rubisco-the consequences of altering its expression and activation in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 46, 1293-1300.
- Angus J.F., McKenzie D.H., Morton R., Schafer C.A.** (1981) Phasic development in field crops: II. Thermal and photoperiodic responses of spring wheat. *Field Crop Research* 4, 269-283.
- ap Rees T., Wright B.W., Fuller A.** (1977) Measurement of starch breakdown as estimates of glycolysis during thermogenesis by spatix of *Arum maculatum*. *Planta* 134, 53-56.
- Aranjuelo I., Irigoyen J.J., Perez P., Martinez-Carrasco R., Sanchez-Diaz M.** (2005) The use of temperature gradient tunnels for studying the combined effect of CO₂, temperature and water availability in N₂ fixing alfalfa plants. *Annals of Applied Biology* 146, 51-60.
- Araus J.L., Släfer G.A., Reynolds M.P., Royo C.** (2002) Plant breeding and drought in C₃ cereals: What should we breed for? *Annals of Botany* 89, 925-940.
- Arnon, D.I.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts - Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15.
- Arp W.J.** (1991) Effect of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment* 14, 869-875.
- Arrhenius S.** (1896) On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature of the ground. *Philosophical Magazine and Journal of Science* 5, 237-76.
- Aslam M., Travis R., Huffaker R.** (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology* 99, 1124-1133.
- Aslam M., Travis R.L., Rains D.W., Huffaker R.C.** (1996) Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport systems in root of intact barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Planta* 200, 58-63.
- Assenga S., Jamieson P.D., Kimball B., Pinter P., Sayred K.** (2004) Simulated wheat growth affected by rising temperature, increased water deficit and elevated atmospheric CO₂. *Field Crops Research* 85, 85-102
- Athwal G.S. & Huber S.C.** (2002) Divalent cations and polyamines bind to loop 9 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *The Plant Journal* 29, 119-129.

- Atkin O.K., Evans J.R., Ball M.C., Lambers H., Pons T.L.** (2000) Leaf respiration of snow gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance. *Plant Physiology* 122, 915-923.
- Bachmann M., Huber J.L., Athwal G.S., Wu K., Ferl J.R., Huber S.C.** (1996b) 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase in a isoform specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Letters* 398, 26-30.
- Bachmann M., Huber J.L., Liao P.C., Gage D.A., Huber S.C.** (1996c) The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Letters* 387, 127-131.
- Bachmann M., Shiraishi N., Campbell W.H., Yoo B.C., Harmon A.C., Huber S.C.** (1996a) Identification of a ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *The Plant Cell* 8, 505-517.
- Baker J.T. & Allen L.H.** (1993) Contrasting crop species responses to CO₂ and temperature: rice, soybean and citrus. *Vegetatio* 104, 239-260.
- Ballicora M.A., Iglesias A.A., Preiss J.** (2004). ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynthesis Research* 79, 1-24.
- Barbanti L., Monti A., Venturi G.** (2007) Nitrogen dynamics and fertilizer use efficiency in leaves of different ages of sugar beet (*Beta vulgaris*) at variable water regimes. *Annals of Applied Biology* 150, 197-205.
- Bardgett R.D., Streeter T.C., Bol R.** (2003) Soil microbes compete effectively with plants for organic nitrogen inputs to temperate grasslands. *Ecology* 84, 1277-1287.
- Baroja-Fernandez E., Munoz F.J., Zanduetta-Criado A., Moran-Zorzano M.T., Viale A.M., Alonso-Casajus N., Pozueta-Romero J.** (2004) Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13080-13085.
- Barraclough R. & Ellis R.J.** (1980) Protein-synthesis in chloroplasts. 9. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea-chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 608, 19-31.
- BassiriRad H., Griffin K.L., Strain B.R., Reynolds J.F.** (1996) Effects of CO₂ enrichment on growth and root ¹⁵NH₄⁺ uptake rate of loblolly pine and ponderosa pine seedlings. *Tree Physiology* 16, 957-962.
- Batts G.R., Ellis R.H., Morison J.I.L., Nkemka P.N., Gregory P.J., Hadley P.** (1998) Yield and partitioning in crops of contrasting cultivars of winter wheat in response to CO₂ and temperature in field studies using temperature gradient tunnels. *Journal of Agriculture Science* 130, 17-27.
- Bazzaz F.A. & McConnaughay K.D.M.** (1992) Plant-plant interactions in elevated CO₂ environments. *Australian Journal of Botany* 40, 547-563.
- Beevers L. & Hageman R.H.** (1980) Nitrate and nitrite reduction. In: *Biochemistry of Plants. Band 5. Amino acids and derivatives*. (Miflin B.J., Ed.). New York, Academic Press. S., pp. 115-168.
- Behl R., Tischner R., Raschke K.** (1988) Induction of a high capacity nitrate uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low capacity mechanism. *Planta* 176, 235-240.
- Bengtsson M., Shen Y., Oki T.** (2006) A SRES-based gridded global population dataset for 1990-2100. *Population and Environment* 28, 113-131.
- Bernacchi C.J., Thompson J.N., Coleman J.S., McConnaughay K.D.M.** (2007) Allometric analysis reveals relatively little variation in nitrogen versus biomass accrual in four plant species

- exposed to varying light, nutrients, water and CO₂. *Plant, Cell and Environment* 30, 1216-1222.
- Berntson G.M. & Bazzaz F.A.** (1996) Belowground positive and negative feedbacks on CO₂ growth enhancement. *Plant and Soil* 187, 119-131.
- Berry J. & Björkman O.** (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 491-543.
- Berry J.A. & Raison J.K.** (1981) Responses of macrophytes to temperature. In: *Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment* (Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H., Eds.). Springer-Verlag, New York, pp. 277-337.
- Berry J.O., Nikolau B.J., Carr J.P., Klessig D.F.** (1986) Translational regulation of light-induced ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene-expression in Amaranth. *Molecular and Cellular Biology* 6, 2347-2353.
- Besford R.T., Ludwig L.J., Withers A.C.** (1990) The greenhouse effect: acclimation of tomato plants growing in high CO₂. Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase protein. *Journal of Experimental Botany* 41, 925-931.
- Bloom A.J., Smart D.R., Nguyen D.T., Searles P.S.** (2002) Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99, 1730-1735.
- Boldt R. & Zrenner R.** (2003) Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 117, 297-304.
- Bonnett G.D., Sims I.M., Simpson R.J., Cairns A.J.** (1997) Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist* 136, 11-17.
- Botrel A. & Kaiser W.M.** (1997) Nitrate reductase activation status in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta* 201, 496-501.
- Bowes G.** (1991) Growth at elevated CO₂ - photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant, Cell and Environment* 14, 795-806.
- Bowes G.** (1996) Photosynthetic responses to changing atmospheric carbon dioxide concentration. In: *Photosynthesis and the Environment. Advances in Photosynthesis* (Baker N.R., Ed.) Vol. 5. Kluwer, Dordrecht. pp. 387-407.
- Bowler J.M. & Press M.C.** (1996) Effects of elevated carbon dioxide, nitrogen form and concentration on growth and photosynthesis of a fast- and slow-growing grass. *New Phytologist* 132, 391-401.
- Breteler H. & Siegerist M.** (1984) Effect of ammonium on nitrate utilization of dwarf bean. *Plant Physiology* 75, 1099-1103.
- Briggle L.W.** (1980) Origin and botany of wheat. In: *Wheat documenta cibageigy* (Häfliger E., Ed.). Basle, Switzerland. MN, USA, American Association of Cereal Chemists, pp. 6-13.
- Britto D.T. & Kronzucker H.J.** (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159, 567-584.
- Brohan P., Kennedy J.J., Harris I., Tett S.F.B., Jones P.D.** (2006) Uncertainty estimates in regional and global observed temperature changes: A new data set from 1850. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 111, D12.
- Brooks A. & Farquhar G.D.** (1985) Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165, 397-406.
- Bulón A., Colonna P., Planchot V., Ball S.** (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.

- Bunce J.A.** (2000a) Acclimation to temperature of the response of photosynthesis to increased carbon dioxide concentration in *Taraxacum officinale*. *Photosynthesis Research* 64, 89-94.
- Bunce J.A.** (2000b) Acclimation of photosynthesis to temperature in eight cool and warm climate herbaceous C₃ species: temperature dependence of parameters of a biochemical photosynthesis model. *Photosynthesis Research* 63, 59-67.
- Bunce J.A.** (2004) Carbon dioxide effects on stomatal responses to the environment and water use by crops under field conditions. *Oecologia* 140, 1-10.
- Burkart S., Manderscheid R., Weigel H.J.** (2000) Interacting effects of photosynthetic photon flux density and temperature on canopy CO₂ exchange rate of spring wheat under different CO₂ concentrations. *Journal of Plant Physiology* 157, 31-39.
- Burlina A.** (1984) 2-Oxoglutarate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. VII (Bergmeyer, Ed.). 3rd Edition, pp. 20-24.
- Campbell W.H.** (2001) Structure and function of eukaryotic NAD(P)H nitrate reductase. *Cell and Molecular Life Science* 58, 194-204.
- Cassman K.G.** (1999) Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5952-5959.
- Cawse P.A.** (1967) The Determination of Nitrate in Soil Solutions by Ultraviolet Spectrophotometry. *Analyst* 92 (1094), 311-315.
- Chalmers J., Lidgett A., Cummings N., Cao Y., Forster J., Spangenberg G.** (2005) Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal* 3, 459-474.
- Chamberlin T.C.** (1897) The method of multiple working hypotheses. *Journal of Geology* 5, 837-848.
- Champigny M.L., Brauer M., Bismuth E., ThiManh C., Siegl G., Van Quy L., Stitt M.** (1992) The short term effect of NO₃⁻ and NH₄⁺ assimilation on sucrose synthesis in leaves. *Journal of Plant Physiology* 139, 361-368.
- Chaudhuri U.N., Kirkham M.B., Kanemasu E.T.** (1990) Root growth of winter wheat under elevated carbon dioxide and drought. *Crop Science* 30, 853-857.
- Chen S., Hajirezaei M., Börnke F.** (2005) Differential expression of sucrose phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology* 139, 1163-1174.
- Chen Z. & Spreitzer R.J.** (1989) Chloroplast intragenic suppression enhances the low specificity of mutante ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 264, 3051-3054.
- Cheng C.L., Acedo G.N., Christinsin M., Conkling M.A.** (1992) Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1861-1864.
- Cheng S.H., Moore D., Seeman J.R.** (1998) Effects of short- and long-term elevated carbon dioxide on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 116, 715-723.
- Cho Y.H., Yoo S.D., Sheen J.** (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signalling. *Cell* 127, 579-589.
- Chollet R., Vidal J., O'Leary H.** (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 273-298.

- Ciereszko I., Johansson H., Kleczkowski L.A.** (2001) Sucrose and light regulation of a cold inducible UDP glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. *Biochemical Journal* 354, 67-72.
- Cohen B.A., Wiles R., Campbell C.** (1996) Pouring It On: Nitrate Contamination of Drinking Water. Environmental Working Group, Washington, DC.
- Cohen M.J.** (2003) Food security: why do hunger and malnutrition persist in a world of plenty? In: *Plants, Genes, and Crop Biotechnology* (Chrispeels M.J. & Sadava D.E. Eds.). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, USA. 2nd Ed., pp. 52-75.
- Coleman J.S., McConnaughay K.D.M., Bazzaz F.A.** (1993) Elevated carbon dioxide and plant nitrogen use. Is reduced tissue nitrogen concentration size dependent? *Oecologia* 93, 195-200.
- Coleman J.S., Rochefort L., Bazzaz F.A., Woodward F.I.** (1991) Atmospheric CO₂, plant nitrogen status and the susceptibility of plants to acute heat stress. *Plant, Cell and Environment* 14, 667-674.
- Conroy J. & Hocking P.** (1993) Nitrogen nutrition of C₃ plants at elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Physiologia Plantarum* 89, 570-576.
- Cooper H.D. & Clarkson D.T.** (1989) Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals—a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany* 40, 753-762.
- Coruzzi G.M. & Last R.** (2000) Amino acids. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanam B., Gruissem W., Jones R., Eds.). American Society of Plants Physiologists, pp. 358-410.
- Coruzzi G.M. & Zhou L.** (2001) C and N sensing and signalling in plants emerging “matrix effects”. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 1247-1253.
- Crawford N.M. & Forde B.G.** (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: *The Arabidopsis Book* (Meyerowitz E. & Somerville C., Eds.). Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- Crawford N.M. & Glass A.D.M.** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3, 389-395.
- Crawford N.M.** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* 7, 859-868.
- Crawford N.M., Kahn M.L., Leustek T., Long S.R.** (2000) Nitrogen and sulphur. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanam B., Gruissem W., Jones R., Eds.). American Society of Plants Physiologists, pp. 786-846.
- Curtis B.C.** (2002) Wheat in the world. In: *Bread wheat. Improvement and Production* (Curtis B.C., Rajaram S., Gómez Macpherson H., Eds.). FAO, Rome.
- Curtis P.S. & Wang X.Z.** (1998) A metaanalysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113, 299-313.
- Daniel-Vedele F., Filleur S., Caboche M.** (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 235-239.
- Davey P.A., Hunt S., Hymus G.J., DeLucia E.H., Drake B.G., Karnosky D.F., Long S.P.** (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 Physiology* 134, 520-527.
- Davoren J.D., Nykiforuk C.L., Laroche A., Weselake R.J.** (2002) Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 719-725.

- De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J.M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H.** (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442, 939-942.
- De Souza A.P., Gaspar M., Da Silva E.A., Ulian E.C., Waclawovsky A.J., Nishiyama M.Y., Dos Santos R.V., Teixeira M.M., Souza G.M., Buckeridge M.S.** (2008) Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell and Environment* 31, 1116-1127.
- Del Pozo A.** (1994) Leaf area index and relative irradiance within the canopy of wheat and faba bean. In: *Proceedings of the 3rd European Society for Agronomy*. Abano-Padova, Italy, pp. 108-109.
- 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. *Environmental and Experimental Botany* 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 Science* 169, 908-916.
- Delgado E., Mitchell R.A.C., Parry M.A.J., Driscoll S.P., Mitchell V.J., Lawlor D.W.** (1994) Interacting effects of CO₂ concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves. *Plant, Cell and Environment* 17, 1205-1213.
- Deng M.D., Moureaux T., Lamaze T.** (1989) Diurnal and circadian fluctuation of malate levels and its close relationship to nitrate reductase-activity in tobacco-leaves. *Plant Science* 65, 191-197.
- Denyer K., Dunlap F., Thorbjornsen T., Keeling P., Smith A.M.** (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiology*, 112, 779-785.
- Der Leij M., Smith S.J., Miller A.J.** (1998) Remobilization of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* 205, 64-72.
- Díaz S., Grime J.P., Harris J., McPherson E.** (1993) Evidence of a feedback mechanism limiting plant response to elevated carbon dioxide. *Nature* 364, 616-617.
- Dijk E. & Eck N.** (1995) Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist* 131, 361-367.
- Drake B.G., González-Meler M.A., Long S.P.** (1997) More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 609-639.
- Dreccer M.F., van Oijen M., Schapendonk A.H.C.M., Pot C.S., Rabbinge R.** (2000) Dynamics of vertical leaf nitrogen distribution in a vegetative wheat canopy. Impact on canopy photosynthesis. *Annals of Botany* 86, 821-831.
- Druart N., Rodríguez-Buey M., Barron-Gafford G., Sjödin A., Bhalerao R., Hurry V.** (2006) Molecular targets of elevated [CO₂] in leaves and stem of *Populus deltoides*: implications for future tree growth and carbon sequestration. *Functional Plant Biology* 33, 121-131.
- Dubois F., Tercé-Laforgue T., González-Moro M.-B., Estavillo J.-M., Sangwan R., Gallais A., Hirel B.** (2003) Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new store for an old enzyme. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 565-576.
- Duff A.P., Andrews T.J., Curmi P.M.G.** (2000) The transition between the open and closed states of Rubisco is triggered by the inter-phosphate distance of the bound bisphosphate. *Journal of the Molecular Biology* 298, 903-916.

- Duff S.M.G. & Chollet R.** (1995) In vivo regulation of wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiology* 107, 775-782.
- Dwyer S.A., Ghannoum O., Nicotra A., Von Caemmerer S.** (2007) High temperature acclimation of C₄ photosynthesis is linked to changes in photosynthetic biochemistry. *Plant, Cell and Environment* 30, 53-66.
- Eckardt N.A.** (2005) Photorespiration revisited. *The Plant Cell* 17, 2139-2141.
- El-Kohen A. & Mousseau M.** (1994) Interactive effects of elevated carbon dioxide and mineral nutrition on growth and carbon dioxide exchange of sweet chestnut seedlings. *Tree Physiology* 14, 679-690.
- Ellis R.J.** (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Science* 4, 241-244.
- Ellis R.P., Foster B.P., Robinson D., Handle L.L., Gordon D.C., Russell J.R., Powell W.** (2000) Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century. *Journal of Experimental Botany* 51, 9-17.
- Esquivel M.G., Anwaruzzaman M., Spreitzer R.J.** (2002) Deletion of nine carboxy-terminal residues of the Rubisco small subunit decreases thermal stability but does not eliminate function. *FEBS Letters* 520, 73-76.
- Evans J.R. & Seemann J.R.** (1989) The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: Costs, consequences, and control. In: *Photosynthesis* (Briggs W.R., Ed.). New York, Alan R. Liss, Inc., pp. 183-205.
- Eviner V.T. & Chapin F.S.** (1997) Plant microbial interactions. *Nature* 385, 26-27.
- Fallai H., Scofield G.N., Badger M.R., Chow W.S., Furbank R.T., Ruang Y.L.** (2008) Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *Journal of Experimental Botany* 59, 3283-3295.
- FAO** (2006) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estadísticas de producción agrícola basados en datos oficiales. <http://faostat.fao.org>.
- Farage P.K., McKee I.F., Long S.P.** (1998) Does a low nitrogen supply necessarily lead to acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? *Plant Physiology* 118, 573-580.
- Farrar J.F. & Williams M.L.** (1991) The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, Cell and Environment* 14, 819-828.
- Faure J.D., Meyer C., Caboche M.** (2001) Nitrate assimilation: nitrate and nitrite reductases. In: *Nitrogen Assimilation in Plants* (Morot-Gaudry J.F., Ed.). Enfield, Science Publishers Inc., pp. 33-52.
- Ferrario S., Valadier M.H., Foyer C.H.** (1996) Short-term modulation of nitrate reductase activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays* leaves. *Planta* 199, 366-371.
- Ferrario S., Valadier M.H., Morot-Gaudry J.F., Foyer C.H.** (1995) Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. *Planta* 196, 288-294.
- Ferrario-Mery S., Thibaud M.C., Betsche T., Valadier M.H., Foyer C.H.** (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.
- Ferrario-Mery S., Valadier M.H., Foyer C.H.** (1998) Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiology* 117, 293-302.

- Fichtner K. & Schulze E.D.** (1992) The effect of nitrogen nutrition on growth and biomass partitioning of annual plants originating from habitats of different nitrogen availability. *Oecologia* 92, 236-241.
- Finkelstein R.R. & Gibson S.I.** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 26-32.
- Fischer K., Barbier G.C., Hecht H.J., Mendel R.R., Campbell W.H., Schwarz G.** (2005) Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase activity site. *The Plant Cell* 17, 1167-1179.
- Flugge U.I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F., Eckerskorn C.** (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate phosphate translocator from spinach-chloroplasts -nucleotide-sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *Embo Journal* 8, 39-46.
- Fonseca F., Bowsher C.G., Stulen I.** (1997) Impact of elevated CO₂ on nitrate reductase transcription and activity in leaves and roots of *Plantago major*. *Physiologia Plantarum* 100, 940-948.
- Forde B.G. & Clarkson D.T.** (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research* 30, 1-90.
- Forde B.G.** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 219-235.
- Forde B.G.** (2002) Local and long-range signalling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology* 53, 203-224.
- Fourier, J.** (1824) Remarques Générales sur les Températures Du Globe Terrestre et des Espaces Planétaires. *Annales de Chimie et de Physique* 27, 136-67.
- Foyer C.H. & Ferrario S.** (1994) Modulation of carbon and nitrogen metabolism in transgenic plants with a view to improved biomass production. *Biochemical Society Transactions* 22, 909-915.
- Foyer C.H. Parry M., Noctor G.** (2003) Markers and signals associated with N assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 54, 585-593.
- Foyer C.H., Bloom A.J., Queval G., Noctor G.** (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 60, 455-484.
- Foyer C.H., Lescure J.C., Lefebvre C., Morot-Gaudry J.F., Vincentz M., Vaucheret H.** (1994a) Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104, 171-178.
- Foyer C.H., Noctor G., Lelandais M., Lescure J.C., Valadier M.H., Boutin J.P., Horton P.** (1994b) Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta* 192, 211-220.
- French, A.D.** (1989) Chemical and physical properties of fructans. *Plant Physiology* 134, 125-136.
- Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R., Stitt M.** (2006b) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal* 46, 533-548.
- Fritz, C., Mueller, C., Matt, P., Feil, R., Stitt, M.** (2006a) Impact of the C-N status on the amino acid profile in tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment* 29, 2055-2076.
- Gadegaard G., Didion T., Folling M., Storgaard M., Andersen C. H., Nielsen K.K.** (2008) Improved fructan accumulation in perennial ryegrass transformed with the onion fructosyltransferase genes 1SST and 6G-FFT. *Journal of Plant Physiology* 165, 1214-1225.

- Galangau F., Daniel-Vedèle F., Moureaux T., Dorbe M.F., Leydecker M.T., Caboche M.** (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiology* 88, 383-388.
- Gallais A. & Hirel B.** (2004) An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany* 55, 295-306.
- Gancedo J.M.** (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry* 206, 297-313.
- Gatenby A.A. & Ellis F.R.** (1990) Chaperone function: the assembly of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Annual Review of Cell Biology* 6, 125-149.
- Gazzarini S., Lejay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W.B.** (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 11, 937-947.
- Geigenberger P., Kolbe A., Tiessen A.** (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* 56, 1469-1479.
- Geigenberger P., Lerchl J., Stitt M., Sonnewald U.** (1996) Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits longdistance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant, Cell and Environment* 19, 43-55.
- Geiger D.R. & Servaites J.C.** (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C₃ plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 235-256.
- Geiger M., Haake V., Ludewig F., Sonnewald U., Stitt M.** (1999) The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment* 22, 1177-1199.
- Geiger M., Walch-Liu P., Harnecker J., Schulze E.D., Ludewig F., Sonnewald U., Scheible W.R., Stitt M.** (1998) Enhanced C 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 higher plants. *Plant, Cell and Environment* 21, 253-268.
- Gerhardt R., Stitt M., Heldt H.W.** (1987) Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthesis. *Plant Physiology* 83, 399-407.
- Gerrits N., Turk S.C., Van Dun K.P., Hulleman S.H., Visser R.G., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.** (2001) Sucrose metabolism in plastids. *Plant Physiology* 125, 926-934.
- Gesch R.W., Boote K.J., Vu J.C.V., Allen H.Jr., 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 Physiology* 118, 521-529.
- Gesch R.W., Kang I-H., Gallo-Meagher M., Vu J.C.V., Boote K.J., Allen L.H., Bowes G.** (2003) Rubisco expression in rice leaves is related to genotypic variation of photosynthesis under elevated growth CO₂ and temperature. *Plant, Cell and Environment* 26, 1941-1950.
- Gessler A., Schneider S., Von Sengbusch D., Weber P., Hanemann U., Huber C., Rothe A., Kreutzer K., Rennenberg SH.** (1998) Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytologist* 138, 275-285.
- Gifford R.M.** (1992) Interaction of carbon dioxide and growth limiting environmental factors in vegetation productivity: Implications for the global carbon cycle. *Advances in Bioclimatology* 1, 24-58.
- Glass A.D.M., Britto D.T., Kaiser B.N., Kinghorn J.R., Kronzucker H.J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S., Siddiqi M.Y., Unkles S.E., Vidmar J.J.** (2002) The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 855-864.

- Glass A.D.M., Shaff J.E., Kochian L.V.** (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiology* 99, 456-463.
- Gojon A., Dapoigny L., Lejay L., Tillard P., Rufty T.W.** (1998) Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant, Cell and Environment* 21, 43-53.
- Goldschmidt E.E. & Huber S.C.** (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* 99, 1443-1448.
- Gollan T.G., Schurr U., Schulze E.D.** (1992) Stomatal response to the drying of soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. The concentration of cations, anions, amino acids and pH of the xylem sap. *Plant, Cell and Environment* 15, 551-559.
- Good A.G., Shrawat A.K., Muench D.G.** (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* 9, 597-605.
- Gunderson C.A., Norby R.J., Wullschlegel S.D.** (1993) Foliar gas exchange of two deciduous hardwoods during three years of growth in elevated CO_2 : no loss of photosynthetic enhancement. *Plant, Cell and Environment* 16, 797-807.
- Gutiérrez D., Gutiérrez E., Pérez P., Morcuende R., Verdejo A.L., Martínez-Carrasco R.** (2009a) Acclimation to future atmospheric CO_2 levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiologia Plantarum* 137, 86-100.
- Gutiérrez E., Gutiérrez D., Morcuende R., Verdejo A.L., Kostadinova S., Martínez-Carrasco R., Pérez P.** (2009b) Changes in leaf morphology and composition with future increases in CO_2 and temperature revisited, Wheat in field chambers. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 349-357.
- Gutiérrez E., Morcuende R., Verdejo A.L., Hernández L., Pérez P., Martínez-Carrasco R.** (2010) Efecto del nitrógeno en la regulación diurna de la nitrato reductasa en plantas de trigo en respuesta al cambio climático. Cambio Climático, Agricultura y Medio Ambiente. Servicio de Publicaciones de la Junta de Castilla y León, 8 páginas (En prensa).
- Gutteridge S. & Julien B.** (1989) A phosphatase from chloroplast stroma of *Nicotiana tabacum* hydrolyses 2'-carboxyarabinitol. *FEBS Letters* 254, 225-230.
- Gutteridge S., Rhoades D.F., Herrmann C.** (1993) Site-specific mutations in a loop region of the C-terminal domain of the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase that influence substrate partitioning. *Journal of Biological Chemistry* 268, 7818-7824.
- Habash D.Z., Massiah A.J., Rong H.L., Wallsgrave R.M., Leigh R.A.** (2001) The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology* 138, 83-89.
- Hall N.P. & Keys A.J.** (1983) Temperature dependence of the enzymic carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate in relation to effects of temperature on photosynthesis. *Plant Physiology* 72, 945-958.
- Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M.M.W.B., Smeekens S.** (2008b) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *The Plant Journal* 53, 935-949.
- Hanson P.J., Classen A., Kueppers L. et al.**, (2008a) Ecosystem experiments: understanding climate change impacts on ecosystems and feedbacks to the physical climate. *Report of the Workshop on Exploring Science Needs for the Next Generation of Climate Change and Elevated CO_2 Experiments in Terrestrial Ecosystems*. United States Department of Energy, Office of Science, Biological and Environmental Research.
- Hare P.E.** (1977) Subnanomole range amino acid analyses. *Methods in enzymology* 43, 3-18.

- Hatfield J.L., Sauer T.J., Prueger J.H.** (2001) Managing soils to achieve greater water use efficiency; a review. *Agronomy Journal* 93, 271-280.
- Hatzfeld Y. & Saito K.** (1999) Identification of two putative nitrate transporters highly homologous to CHL1 from *Arabidopsis thaliana* (Accession Nos. AJ011604 and AJ131464) (PGR 99-018). *Plant Physiology* 119, 805.
- Hayakawa T., Yamaya T., Kamachi K., Ojima K.** (1992) Purification, characterization and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. *Plant Physiology* 98, 1317-1322.
- Heineke D., Wildenburger K., Sonnewald U., Willmitzer L., Heldt H.W.** (1994) Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: studies with transgenic plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplasm. *Planta* 194, 29-33.
- Heldt H.W.** (1997) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademisches Verlag, Heidelberg.
- Heldt H.W.** (2005) Nitrate assimilation is essential for the synthesis of organic matter. In: *Plant Biochemistry*. 3rd Edition (Cella D. Ed). Elsevier Academic Press, San Diego, CA (USA), pp. 275-308.
- Hendrey G.R. & Kimball B.A.** (1994) The FACE program. *Agricultural and Forest Meteorology* 70, 3-14.
- Hendrey G.R.** (1992) Global greenhouses studies- Need for a new approach to ecosystem manipulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11, 61-74.
- Hendrey G.R., Lewin K.F., Nagy J.** (1994) Control of carbon dioxide in unconfined field plots. In: *Design and Execution of Experiments in CO₂ Enrichment*. (Schulze E.D. & Mooney H.A., Eds.). Reidel, Dordrecht, Germany, EEC Publications.
- Hendrik J.H.M., Kolbe A., Gibon Y., Stitt M., Geigenberger P.** (2003) ADP glucose pyrophosphorylase is activated by post-translational redox modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other species. *Plant Physiology* 133, 838-849.
- Hendry G.A.F.** (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *Plant Biotechnology Journal* 123, 3-14.
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B.** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 5, 553-564.
- Herold A.** (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity. The missing link. *New Phytologist* 86, 131-144.
- Hincha D.K., Zuther E., Hellwege E.M., Heyer A.G.** (2002) Specific effects of fructo and oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12, 103-110.
- Hirel B. & Lea P.J.** (2002) The biochemistry, molecular biology, and genetic manipulation of primary ammonia assimilation. In: *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol. 12. (Foyer C.H., Noctor G., Eds.). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 71-92.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 58, 2369-2387.
- Hocking P.J. & Meyer C.P.** (1991) Effects of CO₂ enrichment and nitrogen stress on growth, and partitioning of dry matter and nitrogen in wheat and maize. *Australian Journal of Plant Physiology* 18, 339-356.
- Hodges M.** (2002) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany* 53, 905-917.

- Hoff T., Truong H.N., Caboche M.** (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate metabolism. *Plant, Cell and Environment* 17, 486-506.
- Holbrook G.P., Bowes G., Salvucci M.E.** (1989) Degradation of 2-carboxyarabinitol-1-phosphate by a specific chloroplast phosphatase. *Plant Physiology* 90, 673-678.
- Howitt S.M. & Udvardi M.** (2000) Structure, function, and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 152-170.
- Huang J.Z. & Huber S.C.** (2001) Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. *Plant Cell Physiology* 42, 1079-1087.
- Huang N.C., Liu K.H., Lo H.J., Tsay Y.F.** (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of a low affinity uptake. *The Plant Cell* 11, 1381-1392.
- Huber J.L., Huber S.C., Campbell W.H., Redinbaugh M.G.** (1992) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysic* 296, 58-65.
- Huber J.L.A., Huber S.C., Nielsen T.H.** (1989) Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 270, 681-690.
- Huber J.L.A. & Huber S.C.** (1996) Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 431-444.
- Huber S.C. & Huber J.L.A.** (1992) Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiology* 99, 1275-1278.
- Huber S.C., Bachmann M., Huber J.L.** (1996) Post-translational regulation of nitrate reductase activity in higher plants: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. *Trends in Plant Science* 1, 432-438.
- Hummel M., Rahmani F., Smeekens S., Hanson J.** (2009) Sucrose-mediated translational control. *Annals of Botany* 104, 1-7.
- Hungate B.A., Dukes J.S., Shaw M.R., Luo Y., Field C.B.** (2003) Nitrogen and climate change. *Science* 320, 1512-1513.
- Huppe H.C. & Turpin D.H.** (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 577-607.
- Huppe H.C., Vanlerberghe G.C., Turpin D.H.** (1992) Evidence for activation of oxidative pentose phosphate pathway during photosynthesis assimilation of NO_3^- but not NH_4^+ by green alga. *Plant Physiology* 100, 2096-2099.
- Hylton C. & Smith A.M.** (1992) The RB mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP glucose pyrophosphorylase from developing embryos. *Plant Physiology* 99, 1626-1634.
- Idso S.B. & Kimball B.A.** (1992) Effects of atmospheric CO_2 enrichment on photosynthesis, respiration and growth of sour orange trees. *Plant Physiology* 99, 341-343.
- Imساند J. & Touraine B.** (1994) N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* 105, 3-7.
- Imساند J.** (1992) Agronomic characteristics that identify high yield, high protein soybean genotypes. *Agronomy Journal* 84, 409-414.
- IPCC** (2001) Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Houghton J.T., Ding Y., Griggs D.J., Noguer M., Van der Linden P.J., Dai X., Maskell K., Johnson C.A., Eds.]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA .

- IPCC (2007)** Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L., (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Iraqi D. & Tremblay F.M.** (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany* 52, 2301-2311.
- Ireland R.** (1997) Amino acid and ureide metabolism. In: *Plant Metabolism* (Dennis D.T., Turpin D.H., Lefebvre D.D., Layzell D.B. Eds.). Addison Wesley Longman Limited, Harlow, pp. 509-524.
- Ishiyama K., Kojima S., Takahashi H., Hayakawa T., Yamaya T.** (2003) Cell type distinct accumulation of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 643-647.
- Jackson R.B. & Caldwell M.M.** (1993) The scale of nutrient heterogeneity around individual plants and its quantification with geostatics. *Ecology* 74, 612-614.
- Jacob J., Greitner C., Drake B.G.** (1995) Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and non-structural carbohydrate contents and *in situ* carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated CO_2 in the field. *Plant, Cell and Environment* 18, 875-884.
- Jahnke S. & Krewitt M.** (2002) Atmospheric CO_2 concentration may directly affect leaf respiration measurement in tobacco, but not respiration itself. *Plant, Cell and Environment* 25: 641-651.
- Jamieson P.D., Berntsen J., Ewert F., Kimball B.A., Olesen J.E., Pinter P.J., Porter J.R., Semenov M.A.** (2000) Modelling CO_2 effects on wheat with varying nitrogen supplies. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 82, 27-37.
- Jang J.C. & Sheen J.** (1994) Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6, 1665-1679.
- Jang J.C. & Sheen J.** (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* 2, 208-214.
- Jang J.C., Leon P., Zhou L., Sheen J.** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* 9, 5-19.
- Jenkins P.D. & Mahmood S.** (2003) Dry matter production and partitioning in potato plants subjected to combined deficiencies of nitrogen, phosphorus and potassium. *Annals of Applied Biology* 143, 215-229.
- Jensen A., Lorenzen B., Spelling-Ostergaard H., Kloster-Hvelplund E.** (1990) Radiometric estimation of biomass and N content of barley grown at different nitrogen levels. *International Journal of Remote Sensing* 11, 1809-1820.
- Jones M.G.K., Outlaw W.H., Lowry O.H.** (1977) Enzymatic assay of 10^{-7} to 10^{-14} moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiology* 60, 379-383.
- Jordan D.B. & Ogren W.L.** (1984) The CO_2/O_2 specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 161, 308-313.
- Joy K.W.** (1988) Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany* 66, 2103-2109.
- Kaiser W.M. & Foster J.** (1989) Low CO_2 prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiology* 91, 970-974.
- Kaiser W.M. & Huber S.C.** (1994) Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiology* 106- 817-821.
- Kaiser W.M. & Huber S.C.** (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* 52, 1981-1989.

- Kaiser W.M. & Spill D.** (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. 2. *In vitro* modulation by ATP and AMP. *Plant Physiology* 96, 368-375.
- Kaiser W.M., 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 W.M., Weiner H., Kandlbinder A., Tsai C.H.B., Rockel P., Sonoda M., Planchet E.** (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* 53, 875-882.
- Karungi J., Kyamanywa S., Ekbohm B.** (2006) Comparison of the effect of market crop wastes and chemical soil fertility amendments on insect pests, natural enemies and yield of *Brassica oleracea*. *Annals of Applied Biology* 149, 103-109.
- Kawakami A. & Yoshida M.** (2002) Molecular characterisation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66, 2297-2305.
- Kawakami A. & Yoshida M.** (2005) Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta* 21, 1-5.
- Keeling C.D.** (1960) The Concentration and Isotopic Abundances of Carbon Dioxide in the Atmosphere. *Tellus* 12, 200-203.
- Kelly D.W., Hicklenton P.R., Reekie E.G.** (1991) Photosynthetic response of geranium to elevated CO₂ as affected by leaf age and time of CO₂ exposure. *Canadian Journal of Botany* 69, 2482-2488.
- Kent N.L.** (1983) *Technology of Cereals: An introduction for students of food science and agriculture.* Pergamon Press Ltd, Oxford.
- Keys A.J.** (1986) Rubisco: its role in photorespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, London, B 313, 325-336.
- Keys A.J., Bird I.F., Cornelius M.J., Lea P.J., Mifflin B.J., Wallsgrave R.M.** (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275, 741-743.
- Khamis S., Lamaze T., Lemoine Y., Foyer C.** (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. Relationships between electron transport and carbon assimilation. *Plant Physiology* 94, 1436-1443.
- Kielland K.** (1994) Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology* 75, 2373-2383.
- Kim S.H., Sicher R.C., Bae H., Gitz D.C., Bakers J.T., Timlin D.J., Reddy V.R.** (2006) Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. *Global Change Biology* 12, 588-600.
- Kimball B.A.** (1986) CO₂ stimulation of growth and yield under environmental restraints. In: *Carbon Dioxide Enrichment of Greenhouse Crops. II. Physiology, Yield and Economics* (Enoch H.Z., Kimball B.A., Eds.). Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 53-68.
- King B.J., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Warner R.H., Glass A.D.M.** (1993) Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiology* 102, 1279-1286.
- Kleczkowski L.A., Villand P., Luthi E., Olsen O.A., Preiss J.** (1993) Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiology* 101, 179-186.
- Klein D., Morcuende R., Krapp A., Stitt M.** (2000) Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fell below a critical level. *Plant, Cell and Environment* 23, 863-871.

- Knight S., Andersson I., Brändén C.I.** (1990) Crystallographic analysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution: subunit interactions and the active site. *Journal of Molecular Biology* 215, 113-160.
- Kobza J. & Edwards G.E.** (1987) Influences of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat. *Plant Physiology* 83, 69-74.
- Koch K.E.** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 509-40.
- Kock K.E.** (1997) Molecular crosstalk and the regulation of C- and N-responsive genes. In: *A Molecular Approach to Primary Metabolism in Higher Plants* (Foyer C.H., Quick W.P., Eds.). London: Taylor and Francis, pp. 105-124.
- Konstantinova T., Parvanova D., Atanassov A., Djilianov D.** (2002) Freezing tolerant tobacco transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* 163, 157-164.
- Koprivova A., Suter M., Op den Camp R., Brunold Ch., Kopriva S.** (2000) Regulation of sulphate assimilation by nitrogen in Arabidopsis. *Plant Physiology* 122, 737-746.
- Körner C.** (1995) Towards a better basis for upscaling plant responses to elevated CO₂ and climate warming. *Plant, Cell and Environment* 18, 1101-1110.
- Körner C.** (2006) Plant CO₂ response: an issue of definition, time and response supply. *New Phytologist* 172, 393-411.
- Koroleva O.A., Farrar J.F., Tomos A.D., Pollock C.J.** (1998) Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll, and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. *Plant Physiology* 118, 1525-1532.
- 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.
- Krapp A., Hofmann B., Schäfer C., Stitt M.** (1993) Regulation of the expression of *RbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink' regulation of photosynthesis? *The Plant Journal* 3, 817-828.
- Krapp A., Quick W.P., 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.
- Krömer S. & Heldt H.W.** (1991) On the role of mitochondrial oxidative phosphorylation in photosynthesis metabolism as studied by the effect of oligomycin on photosynthesis in protoplasts and leaves of barley. *Plant Physiology* 95: 1270-1276
- Krömer S.** (1995) Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46, 45-70.
- Krömer S., Stitt M., Heldt H.W.** (1988) Mitochondrial oxidative phosphorylation participating in photosynthesis metabolism of a leaf cell. *FEBS Letters* 226, 352-356
- Kronzucker H.J., Glass A.D.M., Siddiqi M.Y.** (1999) Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of components fluxes. *Plant Physiology* 120, 283-291.
- Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M.** (1995) Kinetics of NO₃⁻ influx in spruce. *Plant Physiology* 109, 319-326.
- Laing W.A., Ogren W.L., Hageman R.H.** (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiology* 54, 85-92.

- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M.** (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 569-593.
- Lam H.M., Coschigano, K., Schultz C., Melo-Oliveira R., Tjaden G., Oliveira I., Ngai N., Hsieh M.H., Coruzzi G.M.** (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 887-898.
- Lam H.M., Hsieh M.H., Coruzzi G.M.** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16, 345-353.
- Lam H.M., Peng S.S.Y., Coruzzi, G.M.** (1994) Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 106, 1347-1357.
- Lancien M., Gadal P., Hodges M.** (2000) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiology* 123, 817-824.
- Lancien M., Martin M., Hsieh M.H., Leustek T., Goodman H., Coruzzi G.M.** (2002) *Arabidopsis* glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *The Plant Journal* 29, 347-358.
- Langenkämper G., Fung R.W.M., Newcomb R.D., Atkinson R.G., Gardner R.C., MacRae E.A.** (2002) Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *Journal of Molecular Evolution* 54, 322-332.
- Larcher W.** (2003) *Physiological Plant Ecology*. pp 57-166. Springer-Verlag. Berlin.
- Lasseur B., Lothier J., Djoumad A., De Coninck B.D., Smeekens S., Van Laere A., Morvan-Bertrand A., Van den Ende W., Prud'homme M.P.** (2006) Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G fructosyltransferase (1FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Experimental Botany* 11, 2719-2734.
- Laurila H.** (2001) Simulation of spring wheat responses to elevated CO₂ and temperature by using CERES-wheat crop model. *Agricultural Food Science Finland* 10, 175-196.
- Lauter F.R., Ninnemann O., Bucher M., Riesmeier J., Frommer W.B.** (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93, 8139-8144.
- Lawlor D.W. & Keys A.J.** (1993) Understanding photosynthetic adaptation to changing climate. In: *Plant Adaptation to Environmental Stress* (Fowden L., Mansfield T., Stoddart J., Eds). Chapman and Hall. Londres.
- Lawlor D.W. & Mitchell R.A.C.** (1991) The effects of increasing CO₂ on crop photosynthesis and productivity: a review of field studies. *Plant, Cell and Environment* 14, 807-818.
- Lawlor D.W.** (1993) *Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes*. 2nd Ed. Burnt Mill, Harlow: Longman Scientific and Technical. Essex, CM20 JE, England.
- Lawlor D.W.** (2002) Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany* 53, 773-787.
- Lawlor D.W., Kontturi M., Young A.T.** (1989) Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose bisphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany* 40, 43-52.
- Lea P. & Forde B.** (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant, Cell and Environment* 17, 541-556.
- Lea P.J. & Azevedo R.A.** (2006) Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* 149, 243-247.

- Lea P.J. & Azevedo R.A.** (2007) Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. *Annals of Applied Biology* 151, 269-275.
- Lea P.J. & Ireland R.J.** (1999) Nitrogen metabolism in higher plants. In: *Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology* (Singh B.K., Ed.). Dekker, New Cork, pp. 1-47.
- Lea P.J. & Mifflin B.J.** (2003) Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 555-564.
- Lea P.J., Blackwell R.D., Murray A.J.S., Joy K.W.** (1989) The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. In: *Recent Advances in Phytochemistry* (Poulton J.E., Romeo J.T., Conn E.E., Eds.). New York: Plenum Press, pp. 569-607.
- Lea U.S, Leydecker M.T., Quilleré I., Meyer CH., Lillo C.** (2006) Post-translational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiology* 140, 1085-1094.
- Leakey A.D.B., Ainsworth E.A., Bernacchi, C.J., Rogers A., Long S.P., Ort D.R.** (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* 60, 2859-2876.
- Leakey A.D.B., Bernacchi C.J., Ort D.R., Long S.P.** (2006) Long term growth of soybean at elevated [CO₂] does not cause acclimation of stomatal conductance under fully open-air conditions. *Plant, Cell and Environment* 29, 1794-1800.
- Lee T.D., Tjoelker M.G., Ellsworth D.S., Reich P.B.** (2001) Leaf gas exchange responses of 13 prairie grassland species to elevated and increased nitrogen supply. *New Phytologist* 150, 405-418.
- Leegood R.C.** (1990) Enzymes of the Calvin cycle. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 3 (Lea P.J., Ed.). Academic press, London, pp. 15-37.
- Leegood R.C., Lea P.J., Adcock M.D., Häusler R.E.** (1995) The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany* 46, 1397-1414.
- Lemaitre T., Gaufichon L., Boutet-Mercey S., Christ A., Masclaux-Daubresse C.** (2008) Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant and Cell Physiology* 49, 1056-1065.
- Lerchl J., Geigenberger P., Stitt M., Sonnewald U.** (1995) Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *The Plant Cell* 7, 259-270.
- Lewis C.E., Noctor G., Causton D., Foyer C.H.** (2000) Regulation of assimilate partitioning in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 507-517.
- Li B., Zhang X.Q., Chollet R.** (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize. *Plant Physiology* 111, 497-505.
- Li P., Ainsworth E.A., Leakey A.D.B., Ulanov A., Lozovaya V., Ort D.R., Bohnert H.J.** (2008) Arabidopsis transcript and metabolite profiles: ecotype-specific responses to open-air elevated [CO₂]. *Plant, Cell and Environment* 31, 1673-1687.
- Li P., Sioson A., Mane S.P., Ulanov A., Grothaus G., Heath L.S., Murali T.M., Bohnert H.J., Grene R.** (2006) Response diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes in elevated [CO₂] in the field. *Plant Molecular Biology* 62, 593-609.
- Li P., Sioson A., Mane S.P., Ulanov A., Grothaus G., Heath L.S., Murali T.M., Bohnert H.J., Grene R.** (2006) Response diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes in elevated [CO₂] in the field. *Plant Molecular Biology* 62, 593-609.

- Liepman A.H. & Olsen L.J.** (2001) Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 25, 487-498.
- Liepman A.H. & Olsen L.J.** (2003) Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131, 215-227.
- Lillo C., Meyer CH., Lea U.S., Provan F., Oltedal S.** (2004) Mechanisms and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* 55, 1275-1282.
- Lin Y., Hwang C.F., Brown J.B., Cheng C.L.** (1994) 5' proximal regions of *Arabidopsis* nitrate reductase genes direct nitrate induced transcription in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 106, 477-484.
- Lodge R.J., Dijkstra P., Drake B.G., Morison J.I.L.** (2001) Stomatal acclimation to increased CO₂ concentration in a Florida scrub oak species *Quercus myrtifolia* Willd. *Plant, Cell and Environment* 24, 77-88.
- Logemann J., Schell J., Willmitzer L.** (1987). Improved method for the preparation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163, 16-20.
- Long S.P. & Drake B.G.** (1992) Photosynthetic CO₂ assimilation and rising atmospheric CO₂ concentrations. In: *Crop Photosynthesis Spatial and Temporal Determinants* (Baker N.R., Thomas H., Eds.). Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 69-103.
- Long S.P.** (1991) Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations. Has its importance been underestimated? *Plant, Cell and Environment* 14, 729-739.
- Long S.P., Ainsworth E.A., Rogers A., Ort D.R.** (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology* 55, 591-628.
- Lorenz M.C. & Heitman J.** (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 17, 1236-1247.
- Lorimer G.H. & Miziorko H.M.** (1980) Carbamate formation on the ε-amino group of a lysyl residues as the basis for the activation of ribulose biphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry* 19, 5321-5328.
- Loudet O., Chaillou S., Merigout P., Talbotec J., Daniel-Vedele F.** (2003) Quantitative trait loci analysis of nitrogen use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131, 345-358.
- Lowry O.H. & Passoneau J.V.** (1972) *A Flexible System of Enzymic Analysis*. Academic Press, New York.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Ludewig F. & Sonnewald U.** (2000) High CO₂-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Letters* 479, 19-24.
- Lunn J.E. & Furbank R.T.** (1999) Sucrose biosynthesis in C₄ plants. *New Phytologist* 143, 221-237.
- Lunn J.E. & MacRae E.** (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 208-214.
- Lunn J.E.** (2007) Compartmentation in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 58, 35-47.
- Luo Y., Su B., Currie W.S., Dukes J.S., Finzi A., Hartwig U., Hungate B., McMurtrie R.E., Oren R., Parton W.J., Pataki D.E., Shaw M.R., Zak D.R., Field C.B.** (2004) Progressive

- nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *Bioscience* 54, 731-739.
- Lynch J.P. & St.Clair S.B.** (2004) Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crops Research* 90, 101-115.
- Mackintosh C. & Meek S.E.M.** (2001) Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell and Molecular Life Science* 58, 205-214.
- Mackintosh C.** (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1137, 121-126.
- Mackintosh C., Douglas P., Lillo C.** (1995) Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiology* 107, 451-457.
- Maevskaya S.N., Andreeva T.F., Voedudskaya S.Y.U., Cherkanova S.** (1990) Effect of high carbon dioxide concentration on photosynthesis and nitrogen metabolism in leaf mustard plants. *Fisiología Rastanii* 37, 921-927.
- Mahn C.T., Bismuth E., Boutin J.P., Provot M., Champigny M.L.** (1993) Metabolite effectors for short-term enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and decrease of net sucrose synthesis in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 89, 460-466.
- Makino A., Harada M., Sato T., Nakano H., Mae T.** (1997) Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiology* 115, 199-203.
- Maldonado J.M., Agüera E., Pérez R.** (2000) Asimilación del nitrógeno y del azufre. En: Fundamentos de Fisiología vegetal (Azcón-Bieto J., Telón M., Eds.). McGraw Hill Interamericana. Madrid, pp.235-246.
- Malkin R. & Niyogi K.** (2000) Photosynthesis. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B., Gruissem W., Jones R., Eds.) American Society of Plant Physiologists. pp. 568-628.
- Markham J.E. & Kruger N.J.** (2002) Kinetic properties of bifunctional 6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from spinach leaves. *European Journal of Biochemistry* 269, 1267-1277.
- Maroco J.P., Breia E., Faria T., Pereira J.S., Chaves M.M.** (2002) Effects of long-term exposure to elevated CO₂ and N fertilization on the development of photosynthetic capacity and biomass accumulation in *Quercus suber* L. *Plant, Cell and Environment* 25, 105-113.
- Maroco J.P., Edwards G.E., Ku M.S.B.** (1999) Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. *Planta* 210, 115-125.
- Marschner H.** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic.
- Martínez N.G., Tognetti J.A., Pontis H.G.** (2001) Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. *Planta* 213, 640-646.
- Martínez-Carrasco R., Cervantes E., Pérez P., Morcuende R., Martín del Molino I.** (1993) Effect of sink size on photosynthesis and carbohydrate content of leaves of three spring wheat varieties. *Physiologia Plantarum* 89, 453-459.
- 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. *Environmental and Experimental Botany* 54, 49-59.
- Martinoia E. & Rentsch D.** (1994) Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 447-467.
- Masclaux C., Quilleré I., Gallais A., Hirel B.** (2001) The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology* 138, 69-81.

- Masle J.** (2000) The effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization and genotype. *Plant Physiology* 122, 1399-1415.
- Maslin, M.** (2004) *Global Warming, a very short introduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Matt P., Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Krapp A., Stitt M.** (2001a) Elevated C dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment* 24, 1119-1137.
- Matt P., Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Krapp A., Stitt M.** (2001b) The immediate cause of the diurnal changes of N metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant, Cell and Environment* 24, 177-190.
- Matt P., Schurr U., Krapp A., Stitt M.** (1998) Growth of tobacco in short day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes of the NIA transcript and low nitrate reductase activity, and an inhibition of amino acid synthesis. *Planta* 207, 27-41.
- Mayoral M.L., Plaut Z., Reinhold L.** (1985) Effect of sink-source manipulations on the photosynthetic rate and carbohydrate content of cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany* 36, 1551-1558.
- McCleary B.V. & Blakeney A.B.** (1999) Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Foods World* 44, 398-406.
- McDonald E.P., Erickson J.E., Kruger E.L.** (2002) Can decreased transpiration limit plant nitrogen acquisition in elevated CO₂? *Functional Plant Biology* 29, 1115-1120.
- McMichael R.W.Jr., Kochansky J., Klein R.R., Huber S.C.** (1995) Characterization of the substrate specificity of sucrose phosphate synthase protein kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321, 71-75.
- Medrano H. & Flexas J.** (2000) Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. In: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. (Azcón-Bieto J., Talón M., Eds.) McGraw-Hill Interamericana, pp. 173-185.
- Mifflin B.J. & Habash D.Z.** (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilisation of crops. *Journal of Experimental Botany* 53, 979-987.
- Miglietta F., Giuntoli A., Bindi M.** (1996) The effect of free air carbon dioxide enrichment and soil nitrogen availability on the photosynthetic capacity of wheat. *Photosynthesis Research* 47, 281-290.
- Miller A., Tsai C.H., Hemphill D., Endres M., Rodermeil S., Spalding M.** (1997) Elevated CO₂ during leaf ontogeny. A new perspective on acclimation. *Plant Physiology* 115, 1195-1200.
- Mitchell R.A.C., Gibbard C.L., Mitchell V.J., Lawlor D.W.** (1996) Effects of shading in different developmental phases on biomass and grain yield of winter wheat at ambient and elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment* 19, 615-621
- Mitchell R.A.C., Lawlor D.W., Mitchell V.J., Gibbard C.L., White E.M., Porter J.R.** (1995) Effects of elevated CO₂ concentration and increased temperature on winter-wheat-test of arcwheat1 simulation-model. *Plant, Cell and Environment* 18, 736-748.
- Mitchell R.A.C., Mitchell V.J., Driscoll S.P., Franklin J., Lawlor D.W.** (1993) Effects of increased CO₂ concentration and temperature on growth and yield of winter-wheat at 2 levels of nitrogen application. *Plant, Cell and Environment* 16, 521-529.
- Moll R.H., Kamprath E.J., Jackson W.A.** (1982) Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency to nitrogen utilization. *Agronomy Journal* 74, 562-564.

- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J.** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332-336.
- Moore B.D., Cheng S.H., Rice J., Seemann J.R.** (1998) Sucrose cycling, Rubisco expression and prediction of photosynthetic acclimation to elevated carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* 21, 905-915.
- Moore B.D., Cheng S.H., Sims D., Seemann J.R.** (1999) The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment* 22, 567-582.
- Moore B.D., Palmquist D.E., Seemann J.R.** (1997) Influence of plant growth at high CO₂ concentrations on leaf content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and intracellular distribution of soluble carbohydrates in tobacco, snapdragon, and parsley. *Plant Physiology* 115, 241-248.
- Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A., MacKintosh C.** (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Current Biology* 6, 1104-1113.
- Morcuende R., Kostadinova S., Pérez P., Martín del Molino I., Martínez-Carrasco R.** (2004a) Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the fructosyltransferase-inducing trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. *New Phytologist* 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 Phytologist* 168, 567-574.
- Morcuende R., Krapp A., Hurry V., Stitt M.** (1998) Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* 206, 394-409.
- Morcuende R., Martínez-Carrasco R., Pérez P.** (2004b) Efecto del nitrógeno en la regulación diurna de las asimilaciones de carbono y nitrógeno en plantas de trigo en respuesta al cambio climático. En: *Nutrición Mineral: Causas y Consecuencias de la Dependencia de Fertilizantes* (Martins-Loucao M.A., Cruz C., Eds.). Servicio de publicaciones de la Universidad de Lisboa, pp. 448-462.
- Morcuende R., Pérez P., Martínez-Carrasco R.** (1997) Short-term feedback inhibition of photosynthesis in wheat leaves supplied with sucrose and glycerol at two temperatures. *Photosynthetica* 33, 179-188
- Morcuende R., Pérez P., Martínez-Carrasco R., Martín del Molino I., Sánchez de la Puente L.** (1996) Long and short term responses of leaf carbohydrate levels and photosynthesis to decreased sink demand in soybean. *Plant, Cell and Environment* 19, 976-982.
- Morison J.I.L. & Lawlor D.W.** (1999) Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment* 22, 659-682.
- Morison J.I.L.** (1996) Global environmental change impacts on crop growth and production in Europe. Implications of global environmental change for crops in Europe. *Aspects of Applied Biology* 45, 62-74.
- Morrel M.K., Wilkin J.M., Kane H.J., Andrews T.J.** (1997) Side reactions catalysed by ribulose-bisphosphate carboxylase in the presence and absence of small subunits. *Journal of Biological Chemistry* 272, 5445-5451.
- Morrel S. & ap Rees T.** (1986) Control of the hexose content of potato tubers. *Phytochemistry* 25, 1073-1076.

- Morvand-Betrand A., Boucaud J., Le Saos J., Prud'homme M.P.** (2001) Roles of the fructans from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta* 213, 109-120.
- Muller B. & Touraine B.** (1992) Inhibition of NO₃⁻ uptake by various phloem- translocated amino acids in soybean seedlings. *Journal of Experimental Botany* 43, 617-623.
- Müller C., Scheible W.R., Stitt M., Krapp. A.** (2001) Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript and nitrate reductase activity in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* 24, 191-203.
- Müller J., Aeschbacher R.A., 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 Physiology* 123, 265-273.
- Müller-Röber B., Kossmann J., Hannah L.C., Willmitzer L., Sonnewald U.** (1990) One of two different ADP glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Molecular and General Genetics* 224, 136-146.
- Nakano H., Makino A., Mae T.** (1997) The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and nitrogen content in rice leaves. *Plant Physiology* 115, 191-198.
- Nelson N. & Yocum Ch.F.** (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology* 57, 521-565.
- Neuhaus H.E., Hausler R.E., Sonnewald U.** (2005) No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends in Plant Science* 10, 154-156.
- Nie G.Y., Hendrix D.L., Webber A.N., Kimball B.A., Long S.P.** (1995b). Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO₂ concentration in the field. *Plant Physiology* 108, 975-983.
- Nie G.Y., Long S.P., Garcia R.L., Kimball B.A., Lamorte R.L., Pinter P.J., Wall G.W., Webber A.N.** (1995a) Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant, Cell and Environment* 18, 855-864.
- Nielsen T.H, Krapp A., Röper-Schwarz U., Stitt M.** (1998) The sugar mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by nitrogen and phosphate. *Plant, Cell and Environment* 21, 443-455.
- Nielsen T.H., Rung J.H., Villadsen D.** (2004) Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends in Plant Science* 9, 556-563.
- Niittyla T., Messerly G., Trevisan M., Chen J., Smith A.M., Zeemann S.C.** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303, 87-89.
- Nijs I., Kockelbergh F., Teughels H., Blum H., Hendrey G.R., Impens I.** (1996b) Free Air Temperature Increase (FATI): a new tool to study global warming effects on plants in the field. *Plant, Cell and Environment* 19, 495-502.
- Nijs I., Teughels H., Blum H., Hendrey G., Impens I.** (1996a) Simulation of climate change with infrared heaters reduces the productivity of *Lolium perenne* L. in summer. *Environmental and Experimental Botany* 36, 271-280.
- Ninnemann O., Jauniaux J.C., Fommer W.B.** (1994) Identification of a high-affinity ammonium transporter from plant. *The EMBO Journal* 13, 3464-3471.
- Noctor G., Novitskaya L., Lea P.J., Foyer C.H.** (2002) Co-ordination of leaf minor amino acid contents in crop species: significance and interpretation. *Journal of Experimental Botany* 53, 939-945.

- Norby R.J., Wullschleger S.D., Gunderson C.A., Johnson D.W., Ceulemans R.** (1999) Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant, Cell and Environment* 22, 683-714.
- Novitskaya L., Trevanion S., Driscoll S.D., Foyer C.H., Noctor G.** (2002) How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant, Cell and Environment* 25, 821-836.
- Nowak R.S., Ellsworth D.S., Smith S.D.** (2004) Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂: Do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytologist* 162, 253-280.
- Nussaume L., Vincentz M., Meyer C., Boutin J.P., Caboche M.** (1995) Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. *The Plant Cell* 7, 611-621.
- Oberbauer S.F., Sionit N., Hastings S.J., Oechel W.C.** (1986) Effects of CO₂ enrichment and nutrition on growth, photosynthesis and nutrient concentration of Alaskan tundra plant species. *Canadian Journal of Botany* 64, 2993-2998.
- Ohto M., Onai K., Furkawa Y., Aoki E., Araki T., Nakamura K.** (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127, 252-261.
- Okamoto M., Vidmar J.J., Glass A.D.M.** (2003) Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* 44, 304-317.
- Okar D.A., Manzano A., Navarro-Sabatè A., Riera Ll., Bartrons R., Lange A.J.** (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 30-35.
- Olive M.R., Ellis R.J., Schuch W.W.** (1989) Isolation and nucleotide-sequences of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf and endosperm. *Plant Molecular Biology* 12, 525-538.
- Oren R., Ellsworth D.S., Johnsen K.H., Phillips N., Ewers B.E., Maier C., Schafer K.V.R., McCarthy H., Hendrey G., McNulty S.G., Katul G.G.** (2001) Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂ enriched atmosphere. *Nature* 411, 469-472.
- Orsel M., Filleur S., Fraisier V., Daniel-Vedele F.** (2002) Nitrate transport in plants: which gene and which control? *Journal of Experimental Botany* 53, 825-833.
- Orth R.A. & Shellenberger J.A.** (1988) Origin, production, and utilization of wheat. In: *Wheat Chemistry and Technology*. Vol. 3 (Pomeranz Y., Ed.). St Paul, MN, USA, American Association of Cereal Chemists.
- Osborne C.P., LaRoche J., Garcia R.L., Kimball B.A., Wall G.W., Pinter P.J., LaMorte L.R., Hendrey G.R., Long S.P.** (1998) Does leaf position within a canopy affect acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? Analysis of a wheat crop under free-air CO₂ enrichment. *Plant Physiology* 117, 1037-1045.
- Osmond C.B.** (1981) Photorespiration and photoinhibition: some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 639, 77-98.
- Osuna D., Usadel B., Morcuende R., Gibon Y., Bläsing O.E., Höhne M., Günter M., Kamlage B., Trethewey R., Scheible W.R., Stitt M.** (2007) Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* 49, 463-491.
- Oswald O., Martin T., Dominy P.J., Graham I.A.** (2001) Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proceedings of the National Academia of Science of the United States of America* 98, 2047-2052.
- Oweis T., Pala M., Ryan J.** (1998) Stabilizing rainfed wheat yields with supplemental irrigation and nitrogen in a Mediterranean climate. *Agronomy Journal* 90, 672-681.

- Pace G.H., Volk R.J., Jackson W.A.** (1990) Nitrate reduction in response to CO₂-limited photosynthesis. Relationship to carbohydrate supply and nitrate reductase activity in maize seedlings. *Plant Physiology* 92, 286-292.
- Pagani M., Freeman K.H., Arthur M.A.** (1999) Late Miocene atmospheric CO₂ concentrations and the expansion of C₄ grasses. *Science* 285, 876-879.
- Parry M.A.J., Keys A.J., Madgwick P.J., Carmo-Silva A.E., Andraloj P.J.** (2008) Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany* 59, 1569-1580.
- Parry M.A.J., Madgwick P.J., Carvahlo J.F.C., Andraloj P.J.** (2007) Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *Journal of Agricultural Science* 145, 31-43.
- Passioura J.B.** (2002) Environmental biology and crop improvement. *Functional Plant Biology* 29, 537-546.
- Paul M. & Stitt M.** (1993) Effects of nitrogen and phosphate deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco, and their response to exogenous sucrose. *Plant, Cell and Environment* 16, 1047-1057.
- Pavis N., Boucaud J., Prud'homme M.P.** (2001) Fructans and fructan metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 150, 97-109.
- Pearson J. & Stewart G.R.** (1993) The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist* 125, 283-305.
- Pearson P.N. & Palmer M.R.** (2000) Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. *Nature* 406, 695-699.
- Peeters K.M.U. & Laere A. J.** (1992). Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiologia Plantarum* 84, 243-249.
- Pérez P., Morcuende R., Martín del Molino I., Martínez-Carrasco R.** (2005) Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* 53, 13-27.
- Pérez P., Morcuende R., Martín del Molino I., Sánchez de la Puente L., Martínez-Carrasco R.** (2001) Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. *Physiologia Plantarum* 112, 478-486.
- 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 A.G., Ball J.T., Luo Y., Field C.B., Reich P.B., Curtis P.S., Griffin K.L., Gunderson C.A., Norby R.J., Tissue D.T., Forstreuter M., Rey A., Vogel C.S.** (1999) The photosynthesis leaf nitrogen relationship at ambient and elevated atmospheric carbon dioxide: a meta-analysis. *Global Change Biology* 5, 331-346.
- Peterson G. L.** (1977) A Simplification of Protein Assay Method of Lowry et al. Which Is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
- Pettersson R. & MacDonald J.S.** (1994) Effects of nitrogen supply on the acclimation of photosynthesis to elevated CO₂. *Photosynthesis Research* 39, 389-400.
- Pettersson R., MacDonald J.S., Stadenburg I.** (1993) Response of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) to elevated CO₂ and nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* 16, 1115-1121.
- Pinter P.J., Jr Kimball B.A., Wall G.W., LaMorte R.L., Adamsen F., Hunsaker D.J.** (1996) Free-air CO₂ enrichment of cotton and wheat crops. In: *Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems* (Koch G.W. & Mooney H.A., Eds.). Academic Press, San Diego C.A., pp. 215-250.

- Pinter P.J., Jr Kimball B.A., Wall G.W., LaMorte R.L., Adamsen F., Hunsaker D.J.** (1997) Effect of elevated CO₂ and soil nitrogen fertilizer on final grain yields of spring wheat. *Annual Research Report*. US Water Conservation Laboratory, Phoenix, AZ., pp. 71-74.
- Plaut Z., Mayoral M.L., Reinhold L.** (1987) Effect of altered sink-source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. *Plant Physiology* 85, 786-791.
- Polley H.W., Johnson H.B., Tischler C.R., Torbert H.A.** (1999) Links between transpiration and plant nitrogen: Variation with atmospheric CO₂ concentration and nitrogen availability. *International Journal of Plant Sciences* 160, 535-542.
- Pollock C. & Cairns A.** (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 77-101.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 54, 489-494.
- Poorter H. & Nagel O.** (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 1191-1191.
- Poorter H. & Pérez-Soba M.** (2001) The growth response of plants to elevated CO₂ under non-optimal environmental conditions. *Oecologia* 129, 1-20.
- Poorter H.** (1993) Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio* 104, 77-97.
- Poorter H., Van Berkel Y., Baxter B., Den Hertog J., Dijkstra P., Gifford R.M., Griffin K.L., Roumet C., Roy J., Wong S.C.** (1997) The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant, Cell and Environment* 20, 474-482.
- Portis A.R.Jr. & Parry M.A.** (2007) Discoveries in Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynthesis Research* 94, 121-143.
- Portis A.R.Jr.** (2003) Rubisco activase-Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75, 11-27.
- Preiss J.** (1988) Biosynthesis of starch and its regulation. In: *The Biochemistry of Plants*. Vol.14 (Preiss J., Ed.). Academic Press, San Diego, pp. 181-254.
- Pritchard S.G. & Rogers H.H.** (2000) Spatial and temporal deployment of crop roots in CO₂-enriched environments. *New Phytologist* 147, 55-71.
- Provan F. & Lillo C.** (1999) Photosynthetic post-translational activation of nitrate reductase. *Journal of Plant Physiology* 154, 605-609.
- Rademacher I.F. & Nelson C.J.** (2001) Nitrogen effects on leaf anatomy within the intercalary meristems of tall fescue leaf blades. *Annals of Botany* 88, 893-903.
- Radoglou K.M. & Jarvis P.G.** (1992) The effects of CO₂ enrichment and nutrient supply on growth morphology and anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Annals of Botany* 70, 245-256.
- Radoglou K.M., Aphalo P., Jarvis P.G.** (1992) Response of photosynthesis, stomatal conductance and water use efficiency to elevated carbon dioxide and nutrient supply in acclimated seedlings of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany* 70, 257-264.
- Radwanski E.R. & Last R.L.** (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell* 7, 921-934.
- Raines Ch.A., Lloyd J.C., Dyer T.A.** (1999) New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, an important but neglected Calvin cycle enzyme. *Journal of Experimental Botany* 50, 1-8.

- Raun W.R. & Jonson G.V.** (1999) Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal* 91, 357-363.
- Raven J.A.** (1988) Acquisition of nitrogen by the shoots of land plants: its occurrence and implications for acid-base regulation. *New Phytologist* 109, 1-20.
- Raven J.A., Wollenweber B., Handley L.L.** (1992) Ammonia and ammonium fluxes between photolithotrophs and the environment in relation to the global nitrogen cycle. *New Phytologist* 121, 5-18.
- Rawson H.M.** (1992) Plant responses to temperature under conditions of elevated CO₂. *Australian Journal of Botany* 40, 473-490.
- Rawson H.M., Gifford R.M., Condon B.N.** (1995) Temperature gradient chambers for research on global environment change. I. Portable chambers for research on short-stature vegetation. *Plant, Cell and Environment* 18: 1048-1054.
- Riesmeier J., Willmitzer L., Frommer W.B.** (1994) Antisense repression of sucrose transporter affects assimilate partitioning in transgenic potato plants. *EMBO Journal* 13, 1-7.
- Ritsema T. & Smeekens S.** (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 223-230.
- Ritsema T., Joling J., Smeekens S.** (2003) Fructan patterns synthesized by onion fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT) expressed in tobacco BY2 cells -is fructan:fructan 1-fructosyltransferase needed in onion? *New Phytologist* 170, 61-66.
- Riviere-Rolland H., Contard P., Betsche T.** (1996) Adaptation of pea to elevated atmospheric CO₂: Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. *Plant, Cell and Environment* 19, 109-117.
- Rivoal J., Gage D.A., Plaxton W.C., Turpin D.H.** (1997) Further characterisation of a high molecular mass isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase from green algae *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 114, 33.
- Roberfroid M.B. & Delzenne N.M.** (1998) Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition* 18, 117-143.
- Roberntz P. & Linder S.** (1999) Effects of long-term CO₂ enrichment and nutrient availability in Norway spruce. II. Foliar chemistry. *Trees* 14, 17-27.
- Robinson S.P. & Portis A.R.Jr.** (1988) Release of the nocturnal inhibitor, carboxyarabinitol, from ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase by Rubisco activase. *FEBS Letters* 233, 413-416.
- Roden J.S. & Ball M.C.** (1996) Growth and photosynthesis of two eucalypt species during high temperature stress under ambient and elevated [CO₂]. *Global Change Biology* 2, 115-128.
- Rogers A. & Humphries S.W.** (2000) A mechanistic evaluation of photosynthetic acclimation at elevated CO₂. *Global Change Biology* 6, 1005-1011.
- Rogers A., Ainsworth E.A., Kammann C.** (2006a) Perspectives of the future of free air CO₂ enrichment studies. In: *Managed Ecosystems and CO₂. Case Studies, Processes and Perspectives* (Nösberger J., Long S.P., Norby R.J., Stitt M., Hendrey G.R., Blum H., Eds.). Heidelberg, Germany. Springer-Verlag, pp. 431-450.
- Rogers A., Gibon Y., Stitt M., Morgan P.B., Bernacchi C.J., Ort D.R., Long S.P.** (2006b) Increased C availability at elevated carbon dioxide concentration improves N assimilation in a legume. *Plant, Cell and Environment* 29, 1651-1658.
- Rogers G.S., Gras P.W., Batey I.L., Milham P.J., Payne L., Conroy J.P.** (1998) The influence of atmospheric CO₂ concentration on the protein, starch and mixing properties of wheat flour. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 387-393.

- Rogers G.S., Milham P.J., Gillings M., Conroy J.P.** (1996) Sink strength may be the key to growth and nitrogen responses in N deficient wheat at elevated CO₂. *Australian Journal of Plant Physiology* 23, 253-264.
- Rogers H.H., Heck W.W., Heagle A.S.** (1983) A field technique for the study of plant response to elevated carbon dioxide concentration. *Journal of Air Pollution Control Association* 33, 42-44.
- Rogers H.H., Peterson C.M., Mc Crimmon J.N., Cure J.D.** (1992) Response of plant roots to elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* 15, 749-752.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J.** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 675-709.
- Rook F., Corke F., Card R., Munz G., Smith C., Bevan M.W.** (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *The Plant Journal* 26, 421-433.
- Roover J., Vandenbranden K., Van Laere A., Van den Ende W.** (2000) Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus L.*). *Planta* 210, 808-814.
- Rose M., Albig W., Entian K.D.** (1991) Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by Hexokinase-PI and Hexokinase-PII. *European Journal of Biochemistry* 199, 511-518.
- Roumet C., Garnier E., Suzor H., Salager J.L., Roy J.** (2000) Short and long-term responses of whole plant gas exchange to elevated CO₂ in four herbaceous species. *Environmental and Experimental Botany* 43, 155-169.
- Rowland-Bamford A.J., Baker S.J., Allen L.H., Bowes G.** (1996) Interactions of CO₂ enrichment and temperature on carbohydrate accumulation and partitioning in rice. *Environmental and Experimental Botany* 36, 111-124.
- Ruiz C.R.** (1981) Cultivo del Trigo y la Cebada. Temas de Orientación Agropecuaria, Bogotá.
- Sage R.F. & Sharkey T.D.** (1987) The effect of temperature on the occurrence of O₂ and CO₂ insensitive photosynthesis in field-grown plants. *Plant Physiology* 84, 658-664.
- Sage R.F.** (1994) Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynthesis Research* 39, 351-368.
- Sage R.F., Santrucek J., Grise D.J.** (1995) Temperature effects on the photosynthetic response of C₃ plants to long-term CO₂ enrichment. *Vegetatio* 121, 67-77.
- Sage R.F., Sharkey T. D., Seemann J.R.** (1989) Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C₃ species. *Plant Physiology* 89, 590-596.
- Sakakibara H., Kawabata S., Hase T., Sugiyama T.** (1992) Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxindependent glutamate synthase in maize. *Plant Cell Physiology* 33, 1193-1198.
- Salanoubat M. & Belliard G.** (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase messenger-RNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* 84, 181-185.
- Salsac L., Chaillou S., Morot-Gaudry J.F., Lesaint C., Jolivoe E.** (1987) Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 25, 805-812.
- Salvucci M.E. & Crafts-Brandner S.J.** (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 120, 179-186.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada S., Usuda H., Hasegawa Y., Tsukui T.** (1990) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the source/sink balance in single-rooted soybean

- leaves: the role of inorganic orthophosphate in activation of the enzyme. *Plant and Cell Physiology* 31, 697-704.
- Scheible W.R., González-Fontes A., Lauerer M., Müller-Rober B., Caboche M., Stitt M.** (1997a) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell* 9, 783-798.
- Scheible W.R., González-Fontes A., Morcuende R., Lauerer M., Geiger M., Glaab J., Gojon A., Schulze E.D., Caboche M., Stitt M.** (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., Krapp A., Stitt M.** (2000) Reciprocal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* 23, 1155-1167.
- 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. *The Plant Journal* 11, 671-691.
- Scheible W.R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M.K., Stitt M.** (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes and signalling infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology* 136, 2483-2499.
- Schjoerring J.K., Usted S., Mäck G., Mattsson M.** (2002) The regulation of ammonium translocation in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 883-890.
- Schlegel A.J., Dhuyvetter K.C., Havlin J.L.** (1996) Economic and environmental impacts of long-term nitrogen and phosphorus fertilization. *Journal of Production Agriculture* 9, 114-118.
- Schneider G., Lindqvist Y., Branden C.I.** (1992) Rubisco -structure and mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21, 119-143.
- Schneider S.H.** (2001) What is "Dangerous" climate change? *Nature* 411, 17-19.
- Schneider, S.H. & Mesirov L.E.** (1976). *The Genesis Strategy: Climate and Global Survival*. New York: Plenum Press.
- Scholl R.L., Harper J.E., Hageman R.H.** (1974) Improvements of the nitrate color development in assays of nitrate reductase by phenazine methosulfate and zinc acetate. *Plant Physiology* 53, 825-828.
- Sharma A. & Sen Gupta U.K.** (1990) Carbon dioxide enrichment effects on photosynthesis and related enzymes in *Vigna radiata* L. Wilczek. *Indian Journal of Plant Physiology* 33, 340-346.
- Shaw M.R., Zavaleta E.S., Chiariello N.R., Cleland E.E., Mooney H.A., Field C.B.** (2002) Grassland responses to global environmental changes suppressed by elevated CO₂. *Science* 298, 1987-1990.
- Sheen J.** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* 2, 1027-1038.
- Sheen J.Y.** (1994) Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Research* 39, 427- 438.
- Sicher R.C. & Bunce J.A.** (1997) Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynthesis Research* 52, 27-38.
- Sicher R.C. & Bunce J.A.** (2001) Adjustments of net photosynthesis in *Solanum tuberosum* in response to reciprocal changes in ambient and elevated growth CO₂ partial pressures. *Physiologia Plantarum* 112, 55-61.
- Sicher R.C. & Kremer D.F.** (1994) Responses of *Nicotiana tabacum* to carbon dioxide enrichment at low-photon flux density. *Physiologia Plantarum* 92, 383-388.

- Sicher R.C.** (1998) Yellowing and photosynthetic decline of barley primary leaves in response to atmospheric CO₂ enrichment. *Physiologia Plantarum* 103, 193-200.
- Sicher R.C.** (2001) Responses of nitrogen metabolism in N-sufficient barley primary leaves to plant growth in elevated atmospheric carbon dioxide. *Photosynthesis Research* 68, 193-201.
- Sicher R.C.** (2008) Effects of CO₂ enrichment on soluble amino acids and organic acids in barley primary leaves as a function of age, photoperiod and chlorosis. *Plant Science* 174, 576-582.
- Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J., Ruffy T.W.** (1990) Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using ¹³NO₃⁻. *Plant Physiology* 93, 1426-1432.
- Siegl G., Mackintosh C., Stitt M.** (1990) Sucrose phosphatase synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves: evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. *FEBS Letters* 270, 198-202.
- Sikka V.K., Choi S.B., Kavakli I.H., Sakulsingharoj C., Gupta S., Ito H., Okita T.W.** (2001). Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Science* 161, 461-468.
- Sims D.A., Seemann J.R., Luo Y.** (1998) Elevated CO₂ concentration has independent effects on expansion rates and thickness of soybean leaves across light and nitrogen gradients. *Journal of Experimental Botany* 49, 583-591.
- Sionit N. & Kramer P.J.** (1986) Woody plants reaction to CO₂ enrichment. In: *Physiology, yield and economics. II. Carbon dioxide enrichment of greenhouse crops* (Enoch H.Z., Kimball B.A., Eds.). Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc, pp. 69-85.
- Smith F.W., Rae A.L., Hawkesford M.J.** (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 236-245.
- Snell F.D. & Snell C.T.** (1949) In: *Colorimetric Methods of Analysis*, Band. 2, Van Nostrand Company Inc., New York. S. 802-807.
- Solomon S., Qin D., Manning R.B. et al.** (2007) Technical summary. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Annual Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L., Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK/New York, NY, USA.
- Spreitzer R.J. & Salvucci M.E.** (2002) Rubisco: interactions, associations and the possibilities of a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology* 53, 449-475.
- Spreitzer R.J.** (2003) Role of the Rubisco small subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 5615-5621
- Spreitzer R.J., Peddi S.R., Satagopan S.** (2005) Phylogenetic engineering at an interface between large and small subunits imparts land-plant kinetic properties to algal Rubisco *Proceeding National Academy of Science USA* 102, 17225-17230.
- Sprengr N., Bortlik K., Brandt A., Boller T., Wiemken A.** (1995) Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proceeding National Academy of Science USA* 92, 11652-11656.
- Stark J.M. & Hart S.C.** (1997) High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 385, 61-64.
- Stitt M. & Krapp A.** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* 22, 583-621.
- Stitt M. & Scheible W.R.** (1998) Understanding allocation to shoot and root growth will require molecular information about which compounds act as signals for the plant nutrient status, and how meristem activity and cellular growth are regulated: Opinion. *Plant and Soil* 201, 259-263

- Stitt M. & Schulze D.** (1994) Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant, Cell and Environment* 17, 465-487.
- Stitt M.** (1984) Fumarase and citrate synthase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. IV (Bergmeyer, Ed.). 3rd Edition, pp. 353-362.
- Stitt M.** (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 153-185.
- Stitt M.** (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14, 741-762.
- Stitt M.** (1996) Metabolic regulation of photosynthesis In: *Advances in Photosynthesis: Photosynthesis and The Environment*. Vol. 5 (Baker N.R., Ed.). Academic Press, London, pp. 151-190.
- Stitt M.** (1999) Nitrate and the regulation of primary metabolism, allocation and growth. *Current Opinion in Plant Science* 2, 178-186.
- Stitt M., Bukpin P.V., ap Rees T.** (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissue *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 544, 200-214.
- Stitt M., Huber S., Kerr P.** (1987) Control of photosynthetic sucrose formation. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 10 (Photosynthesis), (Hatch M.D., Boardman N., Eds.). San Diego, CA USA, Academic Press, 327-407.
- Stitt M., Kürzel B., Heldt H.W.** (1984) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate II. Partitioning between sucrose and starch. *Plant Physiology* 75, 554-560.
- Stitt M., Lilley R.M., Gerhardt R., Heldt H.W.** (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174, 518-552.
- Stitt M., Muller C., Matt P., Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W.R., Krapp A.** (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* 53, 959-970.
- Stitt M., Wirtz W., Gerhardt R., Heldt H.W., Spencer C., Walker D.A., Foyer C.** (1985) A comparative study of metabolite levels in plant leaf material in the dark. *Planta* 166, 354-364.
- Stitt M., Wirtz W., Heldt H.W.** (1980) Metabolite levels during induction in the chloroplast and extra-chloroplast compartments of spinach protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 593, 85-102.
- Stott P.A., Tett S.F.B., Jones G.S., Allen M.R., Mitchell J.F.B., Jenkins G.L.** (2000) External control of 20th century temperature by natural and antropogenic forces. *Science* 290, 2133-2137.
- Strand A., Foyer C.H., Gustafsson P., Gardeström P., Hurry V.** (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell and Environment* 26, 523-535.
- Sugden C., Donaghy P.G., Halford N.G., Hardie D.G.** (1999) Two SNF1-related kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiology* 120, 257-274.
- Taub D.R. & Wang X.** (2008) Why are Nitrogen Concentrations in Plant Tissues Lower under Elevated CO₂? A Critical Examination of the Hypotheses. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1365-1374.
- Taylor G., Street N.R., Tricker P.J., Sjödin A., Graham L., Skogström O., Calfapietra C., Scarascia-Mugnozza G., Janson S.** (2005) Transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytologist* 167, 143-154.

- Taylor G., Tricker P.J., Zhang F.Z., Alston V.J., Miglietta F., Kuzminsky E.** (2003) Spatial and temporal effects of free-air CO₂ enrichment (POPFACE) on leaf growth, cell expansion, and cell production in a closed canopy of poplar. *Plant Physiology* 131, 177-185.
- Taylor T.C. & Andersson I.** (1996) Structural transitions during activation and ligand binding in hexadecameric Rubisco inferred from the crystal structure of the activated unliganded spinach enzyme. *Nature Structural Biology* 3, 95-101.
- Terce-Laforgue T., Mack G., Hirel B.** (2004) New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiologia Plantarum* 120, 220-228.
- Teskey R.O.** (1995) A field study of the effects of elevated CO₂ on carbon assimilation, stomatal conductance and leaf and branch growth of *Pinus taeda* trees. *Plant, Cell and Environment* 18, 565-573.
- Tetlow I.J., Davies E.J., Vardy K.A., Bowsher C.G., Burrell M.M., Emes M.J.** (2003) Subcellular localization of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *Journal of Experimental Botany* 54, 715-725.
- Thimm O., Bläsing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Krüger P., Selbig J., Müller L.A., Rhee S.Y., Stitt M.** (2004) Map-Man: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37, 914-939.
- Tiessen A., Hendriks J.H.M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farre E.M., Geigenberger P.** (2002) Starch synthesis in potato tuber is regulated by post-translational redox-modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell* 14, 2191-2213.
- Tiessen A., Prescha K., Branscheid A., Palacios N., Mckibbin R., Halford N.G., Geigenberger P.** (2003) Evidence that SNF1 related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* 35, 490-500.
- Tilsner J., Kassner N., Struck C., Lohaus G.** (2005) Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* 221, 328-338.
- Tissue D.T., Thomas R.B., Strain B.R.** (1993) Long-term effects of elevated CO₂ and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant, Cell and Environment* 16, 859-865.
- Tjoelker M.G., Reich P.B., Oleksyn J.** (1999) Changes in leaf nitrogen and carbohydrates underlie temperature and CO₂ acclimation of dark respiration in five boreal tree species. *Plant, Cell and Environment* 22, 767-778.
- Tobin A.K. & Yamaya T.** (2001) Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *Journal of Experimental Botany* 53, 591-604.
- Tognetti J.A., Salerno G.L., Crespi M.D., Pontis H.G.** (1990) Sucrose and fructan metabolism in different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* 78, 554-559.
- Tognetti R., Minnocci A., Peñuelas J., Raschi A., Jones M.B.** (2000) Comparative field water relations of three Mediterranean shrub species co-occurring at natural CO₂ vent. *Journal of Experimental Botany* 51, 1135-1146.
- Toroer D. & Huber S.C.** (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic stress activation of sucrose phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiology* 114, 947-955.
- Toroer D., Athwal G.S., Huber S.C.** (1998) Site specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* 435, 110-114.
- Toroer D., McMichael R.W.Jr., Krause K.P., Kurreck J., Sonnewald U., Stitt M., Huber S.C.** (1999) Site-directed mutagenesis of serine 158 demonstrates its role in spinach leaf SPS modulation. *The Plant Journal* 17, 407-413.

- Toroser D., Plaut Z., Huber S.C.** (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology* 123, 403-411.
- Touraine B., Grignon N., Grignon C.** (1988) Charge balance in NO₃⁻-fed soybean. Estimation of K⁺ and carboxylate recirculation. *Plant Physiology* 88, 605-612.
- Touraine B., Muller B., Grignon C.** (1992) Effect of phloem-translocated malate on NO₃⁻ uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiology* 93, 1118-1123.
- Tsay Y.F., Schroeder J., Feldmann K.A., Crawford N.M.** (1993) The herbicide sensitive gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate inducible nitrate transporter. *Cell* 72, 705-713.
- Tschoep H., Gibon Y., Carillo P., Armengaud P., Szecowka M., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Koehl K., Stitt M.** (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 32, 300-318.
- Ueno K., Onodera S., Kawakami A., Yoshida M., Shiomi N.** (2005) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase from asparagus (*Asparagus officinalis*). *New Phytologist* 165, 813-824.
- Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B.** (2001) Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. *Plant Physiology* 125, 2029-2039.
- Ullrich W.R., Larsson M., Larsson C.M., Lesch S., Novacky A.** (1984) Ammonium uptake in Lemma gibba G1, related membrane potential change and inhibition of anion uptake. *Physiologia Plantarum* 61, 369-376.
- Van den Ende W., Van Laere A.** (1996) Variation in the in vitro generated fructan pattern from sucrose as a function of the purified chicory root 1-SST and 1FFT concentrations. *Journal of Experimental Botany* 47, 1797-1803.
- 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 Phytologist* 166, 917-932.
- Van der Meer I.M., Ebskamp M.J.M., Visser R.G.F., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M.** (1994) Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *The Plant Cell* 6, 561-570.
- Van Laere A. & Van den Ende W.** (2002) Inulin metabolism in dictos: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* 25, 803-815.
- Van Oijen M., Schapendonk A.H.C.M., Jansen M.J.H., Pot C.S., Van Kleef J., Goudriaan J.** (1998) Effects of elevated CO₂ on development and morphology of spring wheat grown in cooled and non-cooled open-top chambers. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 617-626.
- Van Oosten J.J. & Besford R.T.** (1994) Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO₂-rapid down-regulation of Rubisco small-subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. *Journal of Plant Physiology* 143, 306-312.
- Van Oosten J.J. & Besford R.T.** (1995) Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant, Cell and Environment* 18, 1253-1256.
- Van Oosten J.J. & Besford R.T.** (1996) Acclimation of photosynthesis to elevated carbon dioxide through feedback regulation of gene expression: climate of opinion. *Photosynthesis Research* 48, 353-365.
- Van Oosten J.J., Wilkins D., Besford R.T.** (1994) Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by high CO₂ is mimicked by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂. *Plant, Cell and Environment* 17, 913-923.

- Van Vuuren M.M.I., Robinson D., Fitter A.H., Chasalow S.D., Williamson L., Raven J.A.** (1997) Effects of elevated atmospheric CO₂ and soil water availability on root biomass, root length and N, P and K uptake by wheat. *New Phytologist* 135, 455-465.
- Vanlerberghe G.C., Huppe H.C., Vlossak K.D.M., Turpin D.H.** (1992) Activation of respiration to support dark NH₃⁻ and NH₄⁺ assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 99, 495-500.
- Vaucheret H., Chabaud M., Kronenberger J., Caboche M.** (1990) Functional complementation of tobacco and *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants by transformation with the wild-type alleles of the tobacco structural genes. *Molecular and General Genetics* 220, 468-474.
- Vaughn K.C. & Campbell W.H.** (1988) Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiology* 88, 1354-1357.
- Vaughn M.W., Harrington G.N., Bush D.R.** (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10876-10880.
- Vergauwen R., Van Laere A., Van den Ende W.** (2003) Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiology* 133, 391-401.
- Vidmar J.J., Zhuo D., Siddiqi M.Y., Schoerring J.K., Touraine B., Glass A.D.M.** (2000) Regulation of high affinity nitrate transporter genes and high affinity nitrate influx by nitrogen pools in plant roots. *Plant Physiology* 123, 307-318.
- Vierling E. & Key J.L.** (1985) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase synthesis during heat shock. *Plant Physiology* 78, 155-162.
- Vijn I. & Smeekens S.** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120, 351-359.
- Vijn I., Van Dijken A., Luscher M., Boss A., Smeets E., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S.** (1998) Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiology* 117, 1507-1513.
- Vijn I., Van Dijken A., Sprenger N., Van Dun k., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S.** (1997) Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* N.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *The Plant Journal* 41, 387-398.
- Villadsen D. & Nielsen T.H.** (2001) N-terminal truncation affects the kinetic and structure of fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical Journal* 359, 591-597.
- Vincenz M., Moureaux T., Leydecker M-T., Vaucheret H., Caboche M.** (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal* 3, 315-324.
- Von Wettstein D., Gough S., Kannangara C.G.** (1995) Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 1039-1057.
- Von Wirén N., Lauter F.R., Ninnemann O., Gillinsen B., Walch.Liu P., Engels C., Jost W., Frommer W.B.** (2000) Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and light in leaves of tomato. *The Plant Journal* 21, 167-175.
- Vu J.C.V., Gesch R.W., Pennanen A. H., Allen L.H.Jr., Boote K.J., Bowes G.** (2001) Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology* 158, 295-307.

- Vu J.V.C., Allen L.H. Jr, Boote K.J., Bowes G.** (1997) Effects of elevated carbon dioxide and temperature on photosynthesis and Rubisco in rice and soybean. *Plant, Cell and Environment* 20, 68-76.
- Wall G.W., Adam N.R., Brooks T.J., Kimball B.A., Pinter Jr. P.G., LaMorte R.L., Adamsen F.J., Hunsaker D.J., Wechsung F., Grossman-Clarke S., Leavitt S.W., Matthias A.D., Webber A.N.** (2000) Acclimation response of spring wheat in a free-air CO₂ enrichment (FACE) atmosphere with variable soil nitrogen regimes. 2. Net assimilation and stomatal conductance of leaves. *Photosynthesis Research* 66, 79-95.
- Wall G.W., García R.L., Kimball B.A., Pinter P.G.Jr., Long S.P., LaMorte R.L.** (1994) Gas exchange rates of spring wheat leaves grown under free-air CO₂ enrichment and variable soil moisture regimes. In: *Agronomy Abstract*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 26.
- Wand S.J.E., Midgley G.F., Jones M.H., Curtis P.S.** (1999) Responses of wild C₄ and C₃ grass *Poaceae* species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytic test of current theories and perceptions. *Global Change Biology* 5, 723-741.
- Wang C. & Tillberg J.E.** (1996) Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 97, 339-345.
- Wang C., Van den Ende W., Tillberg J.E.** (2000) Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta* 211, 701-707.
- Wang M.Y., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Glass A.D.M.** (1993) Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of NH₄⁺ influx across the plasmalemma. *Plant Physiology* 103, 1259-1267.
- Wang R., Guegler K., LeBrie S.T., Crawford N.M.** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell* 12, 1491-1509.
- Wang R., Liu D., Crawford N.M.** (1998) The Arabidopsis CHL1 protein plays a major role in high affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15134-15139.
- Wang R.C., Okamoto M., Xing X.J., Crawford N.M.** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulphate metabolism. *Plant Physiology* 132, 556-567.
- Wanner L.A. & Guissem W.** (1991) Expression dynamics of the tomato *rbcS* gene family during development. *The Plant Cell* 3, 1289-1303.
- Webber A.N., Nie G.Y., Long S.P.** (1994) Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research* 39, 413-425.
- Weber H., Heim U., Borisjuk L., Wobus U.** (1995) Cell-type-specific, coordinate expression of 2 ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L. *Planta* 195, 352-361.
- Weiner H. & Kaiser W.M.** (2001) Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins. *Journal of Experimental Botany* 52, 1165-1172.
- Weiner H., McMichael R.W.Jr., Huber S.C.** (1992) Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose phosphate synthase *in vivo*. *Plant Physiology* 99, 1435-1442.
- Weiner H., Weiner H., Stitt M.** (1993) Sucrose-phosphate synthase phosphatase, a type 2A protein phosphatase, changes its sensitivity towards inhibition by inorganic phosphate in spinach leaves. *FEBS Letters* 333, 159-164.

- Werneke J.M., Chatfield J.M., Ogren W.L.** (1989) Alternative mRNA splicing generates the two ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and Arabidopsis. *The Plant Cell* 1, 815-825.
- Willenbrink J., Bonnett G.D., Willenbrink S., Wardlaw I.F.** (1998) Changes of enzyme activities associated with the mobilization of carbohydrate reserves (fructans) from the stem of wheat during the kernel filling. *New Phytologist* 139, 471-478.
- Wingler A., Fritzius T., Wiemken A., Boller T., Aeschbacher R.A.** (2000) Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 124, 105-114.
- Wingler A., Quick W.P., Bungard R.A., Bailey K.J., Lea P.J., Leegood R.C.** (1999) The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell and Environment* 22, 361-373.
- Winkler R.D., Blevins D.G., Polacco J.C., Randall D.D.** (1987) Ureido catabolism in soybeans. II. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. *Plant Physiology* 83, 585-591.
- Winter H. & Huber S.C.** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 253-289.
- Wolfe D.W.** (1994) Physiological and growth responses to atmospheric carbon dioxide concentration. In: *Handbook of Plant and Crop Physiology* (Pessarakli M., Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 223-242.
- Wong S.C.** (1979) Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. I. Interaction of nitrogen nutrition and photosynthetic capacity in C₃ and C₄ plants. *Oecologia* 44, 68-74.
- Wong S.C.** (1990) Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. II. Non-structural carbohydrate content in cotton plants and its effect on growth parameters. *Photosynthesis Research* 23, 171-180.
- Wong S.C., Kriedemann P.E., Farquhar G.D.** (1992) CO₂ x Nitrogen interaction on seedling growth of 4 species of eucalypt. *Australian Journal of Botany* 40, 457-472.
- Woodrow I.E. & Berry J.A.** (1988) Enzymic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39, 533-594.
- Woodrow I.W.** (1994) Control of steady-state photosynthesis in sunflowers growing in enhanced CO₂. *Plant, Cell and Environment* 17, 277-286.
- Wu Y. & Cosgrove D.J.** (2000) Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany* 51, 1543-1553.
- Xiao W.Y., Sheen J., Jang, J.C.** (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* 44, 451-461.
- Xion J. & Bauer C.E.** (2002) Complex evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 503-521.
- Xu D.Q., Gifford R.M., Chow W.S.** (1994) Photosynthetic acclimation in pea and soybean to high atmospheric CO₂ partial pressure. *Plant Physiology*, 106, 661-671.
- Yamasaki H. & Sakihama Y.** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxonitrite by plant nitrite reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of reactive nitrogen species. *FEBS Letters* 468, 89-92.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S.** (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features for an old enzyme. *Trends in Plant Science* 4, 128-129.
- Yamasaki T., Yamakawa T., Yamane Y., Koike H., Satoh K., Katoh S.** (2002) Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiology* 128, 1087-1097.

- Yamori W., Noguchi K., Terashima I.** (2005) Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions. *Plant, Cell and Environment* 28, 536-547.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q.** (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *Journal of Experimental Botany* 52, 2169-2179.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L.** (2004) Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220, 331-343.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F.** (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weeds Research* 14, 415-421.
- Zak D.R., Pregitzer K.S., King J.S., Holmes W.E.** (2000) Elevated atmospheric CO₂, fine roots and the response of soil microorganisms: a review and hypothesis. *New Phytologist* 147, 210-222.
- Zeemann S.C., Delatte T., Messerli G., Umhang M., Stettler M., Mettler T., Streb S., Reinhold H., Kötting O.** (2007) Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Functional Plant Biology* 34, 465-473.
- Zeemann S.C., Pilling E., Tiessen A., Kato L., Donald A.M., Smith A.M.** (2002) Starch synthesis in Arabidopsis, granule synthesis, composition and structure. *Plant Physiology* 129, 516-529
- Zhang N. & Portis A.R.Jr.** (1999) Mechanism of Light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoforma involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9438-9443.
- Zhang N., Kallis R.P., Ewy R.G., Portis A.R.Jr.** (2002) Light modulation of Rubisco in Arabidopsis requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoforma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 330-334.
- Ziska L.H., Sicher R.C., Kremer D.F.** (1995) Reversibility of photosynthetic acclimation of Swiss chard and sugarbeet grown at elevated concentrations of CO₂. *Physiologia Plantarum* 95, 355-364
- Ziska L.H., Weerakoon W., Namuco O.S., Pamplona R.** (1996) The influence of nitrogen on the elevated carbon dioxide response in field grown rice. *Australian Journal of Plant Physiology* 23, 45-52.
- Zourelidou M., De Torres-Zabala M., Smith C., Bevan M.W.** (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The Plant Journal* 30, 489-497.

