

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Implicación del Factor de Transcripción Dof21 en el Metabolismo de Nitrógeno y Carbono en Tomate

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Laura Garcia Folguerà

TUTOR/A: Sergio González Nebauer
CO-TUTOR/A: Rosa Victoria Molina Romero

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, Septiembre de 2014



Alumno: Laura García Folguera.

Tutor: Sergio González Nebauer

Cotutora: Rosa Victoria Molina Romero.

Valencia, Julio 2014

Título: Implicación del factor de transcripción Dof21 en el metabolismo de nitrógeno y carbono en tomate.

Resumen:

Durante el siglo XX, la mejora de la producción de los cultivos se basó en la optimización de las prácticas de cultivo, incluyendo fertilizantes, pesticidas, riego, y la selección de cultivares. Actualmente, la creciente demanda de producción, junto con la limitación en la disponibilidad de tierras y agua de riego de calidad, hace necesario el desarrollo de nuevas variedades con una capacidad mayor de producción de biomasa y tolerancia a estreses ambientales. Además, en el contexto de una agricultura sostenible y menos agresiva con el medio ambiente, es necesario reducir el uso de fertilizantes. En este sentido, estas variedades deben presentar una mejor eficiencia en el uso del nitrógeno, uno de los principales macronutrientes requeridos por la planta y responsable de la contaminación de acuíferos.

La generación de plantas transgénicas con mayor capacidad de producción de biomasa por sobreexpresión de genes individuales relacionados con la fijación fotosintética de carbono o la asimilación de nitrógeno ha dado resultados limitados, ya que se trata de caracteres multigénicos. En este sentido, la utilización de factores de transcripción, que regulan la expresión de múltiples genes simultáneamente, parece una estrategia prometedora. La sobreexpresión de genes de una familia de factores de transcripción específicos de plantas, los genes Dof (*DNA-binding with one finger*), han incrementado la producción en plantas de maíz o mijo.

En el presente trabajo se ha caracterizado el papel del gen Dof21 de *Arabidopsis thaliana* en el metabolismo de carbono y nitrógeno en tomate. Para ello se han cultivado plantas en condiciones de invernadero, con tres niveles de aporte de nitrógeno (100, 60 y 30% del aporte completo), y se ha determinado la producción de biomasa, la capacidad fotosintética, el contenido en carbohidratos metabolizables, el contenido total en C y N, así como la actividad enzimática de la enzima nitrato reductasa y la expresión del gen PEP carboxilasa y la quinasa SnRK1.

La sobreexpresión del gen Dof21 incrementa la tasa fotosintética, la disponibilidad de carbohidratos y la producción de tomate. Aunque estas plantas no tienen un mayor contenido en N, su ratio C/N es superior debido al mayor contenido en C. Además, en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno, las sobreexpresoras del gen Dof21 mantienen esta relación C/N así como la producción de biomasa y de fruto. Incluso la producción de fruto en estas condiciones limitantes es superior al de las plantas no transformadas en condiciones de aporte completo de nitrógeno. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran la utilidad de los factores de tipo Dof en ingeniería metabólica, en la mejora de la producción de cultivos a través de sus múltiples efectos sobre el metabolismo de las plantas.

Palabras clave: factor de transcripción, Dof, metabolismo, nitrógeno, carbono, fotosíntesis, producción.

Student: Laura Garcia Folguera

Professor: Sergio González Nebauer
Valencia, July 2014

Co-professor: Rosa Victoria Molina Romero

Title: Implication of the transcription factor Dof21 in the nitrogen and carbon metabolism in tomato.

Abstract:

During the 20th century, the improvement in the crop production was based on the optimization of the growing techniques, including fertilisers, pesticides, irrigation and cultivars selection. Currently, the increasing demand in production along with the limitation of land and irrigation water availability makes it necessary the development of new varieties with a greater capacity of biomass production and environmental stress tolerance. Furthermore, in the context of a sustainable and less aggressive agriculture, it is essential to reduce the fertilisers used. Accordingly, these new varieties should be more efficiency regarding the use of nitrogen, which is one of the principal macronutrients required by the plant and responsible of the aquifer contamination.

The generation of transgenic plants with an increased biomass production capacity through the overexpression of genes related to the photosynthetic fixation of carbon or the nitrogen assimilation has provided limited results, due to the fact that these are multigenic characters. In this regard, the utilization of transcription factors, which regulate the expression of multiple genes simultaneously, could be a promising strategy. The overexpression of a specific plant family of transcription factors, the Dof (*DNA-binding with one finger*), has increased the production in maize, millet plants.

In the present study, it has been characterized the role of the *Arabidopsis thaliana* gen Dof21 in the carbon and nitrogen metabolism in tomato. For this purpose, tomato plants have been cultivated in greenhouse conditions with three levels of nitrogen input (100, 60 and 30% of the full input). Finally, it has been determined the biomass production, the photosynthetic capacity, the metabolizable carbohydrates content, the carbon and nitrogen content, the activity of the nitrate reductase enzyme and the expression of PEP carboxylase and the kinase SnRK1.

The Dof21 overexpression increases the photosynthetic rate, the availability of carbohydrates and the production of tomato. Although these plants have not shown an increase in their nitrogen content, their C/N ratio is higher due to an increase of the C content. Moreover, in conditions of limited nitrogen input, the transgenic plants remain the relation C/N and the biomass and fruit production. Even the fruit production is higher in these nitrogen limiting conditions in contrast to the not transformed plants grown in conditions of complete nitrogen input. The results obtained in this study shown that the use of Dof transcription factors is a promising strategy in metabolic engineering. Particularly, in the improvement of crop production due to their multiple effects on the plant metabolism.

Key words: Transcription factors, Dof, metabolism, carbon, nitrogen, photosynthesis, production.

AGRADECIMIENTOS

Después del duro trabajo realizado durante los últimos meses, no puedo hacer más que agradecer a todas las personas que han contribuido, de forma directa o indirecta en mi trabajo final de grado.

En primer lugar, quiero agradecer a Sergio por haberme dado la oportunidad de trabajar con él y haberme introducido más de lleno en el interesante mundo de la fisiología vegetal, por haber hecho despertar en mí el interés y las ganas de aprender, un poco más, cada día. Además, agradecer también a Begoña, Manolo y Savi que junto con Sergio, han hecho que me sienta una más en el departamento.

Han de tindre també una menció especial els meus pares, pels valors inculcats des de menuda i perquè sempre han confiat en mi, inclús en aquelles ocasions en les quals ni jo mateix em creia capaç d'eixir endavant.

Y finalmente, quiero agradecer también a todos los amigos y compañeros que he conocido durante los últimos años, en especial a aquellos que han estado día a día conmigo ya que son los responsables de que se acabe la mejor etapa que he vivido hasta el momento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. MEJORA DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA	1
1.2. EL NITRÓGENO EN EL MEDIO AMBIENTE	2
1.2.1. El nitrógeno en la planta. Asimilación de las diferentes formas de nitrógeno	2
1.2.1.1. Asimilación del nitrato	2
1.2.1.2. Asimilación del amonio.....	4
1.2.1.3. Asimilación de nitrógeno orgánico	5
1.2.1.3.1. Urea.....	5
1.2.1.3.2. Aminoácidos.....	5
1.2.2. Interacción del metabolismo del carbono y nitrógeno	5
1.3. LA MEJORA DE CULTIVOS RELACIONADA CON LA EFICIENCIA EN EL USO DEL NITRÓGENO	6
1.3.1. Los factores de transcripción en plantas	7
1.3.1.1. Los factores de transcripción tipo Dof	8
1.4. EL TOMATE COMO CULTIVO DE INTERÉS AGRONÓMICO	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. MATERIAL VEGETAL	13
3.2. CONDICIONES DE CULTIVO	13
3.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS	14
3.3.1. Biomasa	14
3.3.2. Fluorescencia del PSII	14
3.3.3. Contenido en clorofilas (SPAD)	15
3.3.4. Parámetros fotosintéticos. Intercambio de gases	15
3.3.5. Determinación de azúcares solubles y alimón	15
3.3.6. Determinación de la actividad enzimática de la nitrato reductasa	16
3.3.7. Determinación de proteínas solubles totales	16
3.3.8. Contenido total en carbono/nitrógeno (C/N)	17
3.3.9. Estudio de la expresión de genes de interés	17
3.3.9.1. Selección de genes de interés	17
3.3.9.1.1. Diseño de cebadores	17
3.3.9.1.2. Comprobación de los cebadores mediante PCR	17
3.3.9.2. Extracción de RNA de tomate	18
3.3.9.2.1. Cuantificación del RNA	18

3.3.9.2.2.	Comprobación de la calidad del RNA	18
3.3.9.3.	Síntesis de cDNA	19
3.3.9.3.1.	Cuantificación del cDNA	19
3.3.9.4.	RT-qPCR	19
3.3.9.4.1.	Optimización de la concentración de cebadores	19
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1.	EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA DE PLANTAS QUE SOBREENPRESAN EL GEN <i>Dof21</i> DE <i>Arabidopsis thaliana</i> A LA DEFICIENCIA EN EL APORTE DE NITRÓGENO	21
4.1.1.	Fluorescencia de las clorofilas del PSII	21
4.1.2.	Contenido en clorofilas (SPAD)	22
4.1.3.	Parámetros fotosintéticos. Intercambio de gases	23
4.2.	EFFECTO DEL APORTE DE NITRÓGENO SOBRE PLANTAS QUE SOBREENPRESAN EL GEN <i>ATDof21</i> Y PARÁMETROS RELACIONADOS...24	
4.2.1.	Producción de biomasa	25
4.2.2.	Producción y tamaño del fruto	26
4.2.3.	Contenido en azúcares solubles y almidón	28
4.2.4.	Contenido en proteínas solubles totales	29
4.2.5.	Actividad enzimática de la nitrato reductasa	30
4.2.6.	Contenido total en carbono/nitrógeno	31
4.2.7.	Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo del carbono y nitrógeno	32
4.3.	DISCUSIÓN GENERAL.	34
5.	CONCLUSIONES	35
6.	BIBLIOGRAFÍA	36
7.	ANEXOS.....	41

ÍNDICE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN.

Figura 1.1. Esquema de los pasos seguidos para llevar a cabo la reducción del nitrato.	3
Figura 1.2. Visión general de la asimilación del nitrógeno	5
Figura 1.3. Representación del dominio Dof presente en la familia de factores de transcripción Dof	9
Figura 1.4. Aspecto general de las plantas de tomate en el invernadero	11

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Figura 4.1: Evolución respecto al tiempo de la fluorescencia en cultivos WT y PROK3 en condiciones de aporte diferencial de nitrógeno (100, 60 y 30% del aporte de N)	22
Figura 4.2: Evolución respecto al tiempo de la eficiencia cuántica del PSII (PhiPS2) de plantas WT y PROK3 para los tres tratamientos estudiados (100, 60 y 30% del aporte de N)	23
Figura 4.3: Efecto del aporte diferencial de N sobre el aspecto general de las plantas WT y PROK3	26
Figura 4.4: Efecto de la limitación en el aporte de N sobre la producción de tomates y el tamaño del fruto en cultivos WT y PROK3	27
Figura 4.5: Aspecto representativo de los frutos obtenidos por efecto de la sobreexpresión de gen Dof21 y la limitación del aporte de N en plantas WT y PROK3.	28
Figura 4.6: Efecto de la limitación del aporte de N en el contenido foliar e azúcares solubles totales y almidón en plantas WT y PROK3	29
Figura 4.7: Efecto de la limitación en el contenido de proteínas solubles totales en hojas de plantas WT y PROK3	30
Figura 4.8: Efecto de la limitación en el aporte de N sobre la actividad enzimática de la enzima NR para las plantas WT y PROK3	31
Figura 4.9: Efecto de la limitación en el aporte de N sobre el contenido en C, N y la ratio C/N en plantas WT y PROK3	32
Figura 4.10: Análisis de la expresión relativa mediante qPCR de los genes PEPC1 y SnRK1 entre ambos genotipos, WT y PROK3	33

ÍNDICE TABLAS.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1: Principales familias de factores de transcripción en plantas (a 8daptado por Shiu *et al.*, 2005) 8

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Tabla 2.1: Composición de la solución nutritiva y cantidad (mL por L de solución) de los diferentes stocks de sales empleado para preparar las soluciones con el 100% y 0 % del contenido en nitrógeno 13

Tabla 2.2: Oligos diseñados para la amplificación de los genes PEPC1 y SnRK1 17

4. RESULTAODS Y DISCUSIÓN.

Tabla 4.1: Efecto de la limitación del aporte de N sobre la fotosíntesis neta (A_n) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), apertura estomática (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentración subestomática de CO_2 (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), tasa de transpiración (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y eficiencia en el uso de agua (WUE) ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$) en plantas que sobreexpresan en gen Dof21. Plantas de tomate no transformadas (WT) se usaron como controles 24

Tabla 4.2: Efecto de la limitación en el aporte de nitrógeno sobre la producción de biomasa en plantas que sobreexpresan el gen Dof21. Se presenta ael peso seco del tallo (g), de raíz (g), de hojas (g), de vástago (hojas + tallo, g) el número de hojas y la superficie foliar (cm^2). Plantas no transformadas (WT) se emplearon como controles.25

ABREVIATURAS

- N₂: Nitrógeno molecular
- NH₄⁺: Amonio
- NO₃⁻: Nitrato
- N: Nitrógeno elemental
- P: Fósforo elemental
- HATS: Transportadores de nitrato de alta afinidad
- LATS: Transportadores de nitrato de baja afinidad
- H⁺: Protón
- cHATS: Transportadores de nitrato de alta afinidad constitutivos
- iHATS: Transportadores de nitrato de alta afinidad inducibles
- Gln: Glutamina
- NR: Nitrato reductasa
- NO₂⁻: Nitrito
- NiR: Nitrito reductasa
- 2-OG: 2-oxoglutarato.
- GS: Glutamina sintastasa
- GOGAT: Glutamato sintasa
- GS/GOGAT: Ruta de la glutamina sintetasa/ glutamato sintasa.
- Glu: Glutamato
- GDH: Glutamato deshidrogenasa
- CO₂: Dióxido de carbono
- LHT1: Transportador de la lisina-hitidina
- APP5: Transportador de la aminopermeasa
- ATP: Adenosin tris-fosfato
- PEPC: Fosfoenol piruvato carboxilasa
- PEP: Fosfoenolpiruvato
- RuBisCO: Ribulosa- 1,5- bisfosfato- carboxilasa oxigenasa
- OAA: Oxalacetato
- NUE: Eficiencia en el uso del nitrógeno
- FT: Factor de transcripción
- PIC: Complejo de preiniciación
- TBP: Tata Binding Protein
- CRE: Elementos reguladores en cis
- Dof: DNA binding with one finger
- CDFs: Cycling Dof Factors
- SICDFs: Solanum lycopersicon CDFs
- *ZmDof1*: Gen Dof1 de maíz
- *AtDof1*: Gen Dof 1 de *Arabidopsis thaliana*
- *AtDof21*: Gen Dof21 de *Arabidopsis thaliana*
- NH₄PO₄: Fosfato monoamónico
- KNO₃: Nitrato potásico

- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: Nitrato cálcico
- MgSO_4 : Sulfato de magnesio
- H_3BO_3 : Ácido bórico
- MnCl_2 : Cloruro de magnesio
- ZnSO_4 : Sulfato de zinc
- CuSO_4 : Sulfato de cobre
- H_2MoO_4 : Ácido molíbdico
- KH_2PO_4 : Fosfato monopotásico
- K_2SO_4 : Sulfato potásico
- CaCl_2 : Cloruro cálcico
- A_n : Tasa neta de fijación de CO_2
- E : Tasa de transpiración
- g_s : Apertura estomática
- C_i : Concentración subestomática de CO_2
- WUE: Eficiencia en el uso de agua
- PSII: Fotosistema II
- F_v/F_m : Rendimiento cuántico máximo del PSII
- Φ_{PSII} : Rendimiento cuántico efectivo del PSII
- F_0 : Fluorescencia basal
- F_m : Fluorescencia máxima
- SPAD: Medidor de la cantidad de clorofilas foliares
- NNEDA: N-1-naftil-etilendramida
- KNO_2 : Nitrito potásico
- KPO_4 :
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- DTT: Ditioneitol
- H_3PO_4 : Ácido fosfórico
- C: Carbono elemental
- SnRK1: Sucrose 1-non fermentating related protein kinase
- RT-qPCR: PCR a tiempo real
- UV: Luz ultravioleta
- ANOVA: Análisis de la varianza
- PSI: Fotosistema I
- TCA: Ciclo de los ácidos tricarbónicos

1-INTRODUCCIÓN

1.1. MEJORA DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

La mejora en el rendimiento de las cosechas durante el siglo XX, de la mano de la Revolución Verde, se alcanzó a través de la mejora de las prácticas agrícolas, la irrigación, el uso de fertilizantes y pesticidas y el control de las enfermedades, creando las condiciones que optimizan la producción de fotoasimilados. Asimismo, el incremento en el índice de cosecha de los cultivos mediante mejora genética ha implicado la alteración de la partición de fotoasimilados de forma que éstos se dirijan, en mayor medida, al órgano cosechado. Sin embargo, el empleo de la partición de fotoasimilados que conduce a una mayor producción, parece haber alcanzado el techo en muchos cultivos y se ha conseguido sin que haya habido un incremento en la biomasa total (Paul y Foyer 2001). En este momento, no parece esperable un incremento sustancial de la producción mediante estas vías que permita mantener una población mundial que se espera que alrededor de 2050 requiera un incremento en la producción de alimentos del 70% (Varshney *et al.* 2011), teniendo en cuenta, que también existe una demanda adicional en el incremento de la producción agrícola que obedece a la tendencia actual de utilizar biomasa vegetal como una fuente de energía alternativa. Para poder llevar esto a cabo, existen dos aproximaciones que permiten obtener un aumento potencial de los rendimientos de cultivos, por una parte se puede lograr mediante el aumento de la capacidad fisiológica total de las plantas para producir cultivos cosechables, y por otra parte, mejorar las consecuencias negativas de los estreses ambientales para así obtener mayores rendimientos de producción (Sinclair *et al.*, 2004).

Por otra parte, es necesario señalar que en el campo de la producción agrícola existe actualmente una fuerte competencia por tierras de cultivo adecuadas, agua y energía. Según las estadísticas elaboradas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) expresadas en el Banco Mundial, únicamente el 9.3% de la superficie terrestre es apta para la producción agropecuaria. A esto hay que sumarle el manejo no adecuado de los suelos, que está conduciendo a la desertificación, erosión del suelo o salinización de suelos y acuíferos (Godfray *et al.*, 2010). El cambio climático global, además incrementa estos problemas relacionados con la degradación de las tierras de cultivo, especialmente en regiones de cultivo tropicales semi-áridas (Sivakumar y Ndiangui 2006). Es por ello, que frenar el impacto negativo de ciertas prácticas de producción agrícola es cada vez una necesidad más clara.

Si a todo lo anterior se le suma que muchos de los cultivos no crecen en condiciones óptimas sino que lo hacen estresados por factores como temperaturas extremas, la sequía y la salinidad del suelo, la producción de éstos se ve afectada negativamente. Otro factor que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas es la deficiencia en nitrógeno (Wang *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013), elemento que actúa como regulador de importantes procesos en la planta como la dormancia de la semilla, floración, expansión foliar y desarrollo de las raíces (López *et al.*, 2013). La deficiencia en el suelo de este macroelemento, se ha suplido mediante el uso de fertilizantes nitrogenados, que si bien solucionan el problema de la carencia de nitrógeno, ocasionan otros como es la contaminación medioambiental, siendo más severa en el ecosistema acuático, lo que ha dado lugar a efectos ambientales muy negativos (Andrews *et al.*, 2013).

En este contexto, la demanda en el incremento de la producción en las condiciones actuales requerirá de un aumento en la eficiencia fotosintética y en la producción de biomasa, a lo que además, sería interesante sumarle que estos cultivos pudiesen crecer con una menor cantidad de fertilizantes nitrogenados, lo que implicaría una disminución de la contaminación tanto acuática como atmosférica por exceso de este macroelemento, ya que se estima que se necesitarán al menos 300 toneladas de fertilizantes nitrogenados para asegurar la demanda alimentaria en 2020, debido a que únicamente el 30% de estos fertilizantes es utilizado por las plantas, perdiéndose el resto por fuga, volatilización y la competencia, por el nitrógeno, entre plantas y microorganismos del suelo (López *et al.*, 2013).

1.2. EL NITROGENO EN EL MEDIO AMBIENTE

El nitrógeno es un elemento que se puede encontrar en la biosfera en diferentes formas. Por ejemplo, en la atmosfera el elemento mayoritario (78%) es el nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, esta forma de nitrógeno no es asimilable por la mayoría de organismos vivos, ya que el único modo en que éste se puede emplear es mediante la ruptura del triple enlace y con la consecuente obtención de moléculas de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) (Taiz y Zeiger, 1998).

1.2.1. El nitrógeno en la planta. Asimilación de las diferentes formas de nitrógeno.

Los nutrientes minerales tienen un papel muy importante en el desarrollo de la plantas, ya que elementos en su forma elemental como el nitrógeno y el fósforo (N y P respectivamente) son necesarios para la formación de moléculas biológicas como aminoácidos, nucleótidos o proteínas (López *et al.*, 2013). Es por ello que las plantas son capaces de captar tanto nitrógeno inorgánico, como el nitrato (NO_3^- , compuesto más abundante en las tierras cultivadas), y amonio (NH_4^+ , compuesto más abundante en tierras infértiles) (Crawford y Glass, 1998; Owen y Jones, 2001) Además, también pueden captar nitrógeno orgánico, como la urea y aminoácidos (Wang *et al.*, 2014; Andrews *et al.*, 2013). Estas moléculas se introducen en las plantas a través de las membranas plasmáticas de las células epidérmicas y corticales de la raíz mediante sistemas de transportadores que pueden ser de alta afinidad (HATS) o baja afinidad (LATS) (Forde, 1999).

1.2.1.1. Asimilación del nitrato (NO_3^-).

En el caso de la asimilación del NO_3^- , el anión entra en las células vegetales mediante un mecanismo de transporte activo, regulado y multifásico, por el cual por cada ión de NO_3^- se cotransporta dos protones, H^+ (Crawford, 1995), interviniendo en el proceso tanto transportadores HATS como LATS. Los sistemas de transportadores de alta afinidad operan cuando la concentración de NO_3^- del medio es baja ($< 100\mu M$), y dentro de este grupo hay transportadores constitutivos (cHATS) que están presentes siempre y otros fuertemente inducibles por la presencia de nitrato (iHATS), que a su vez están negativamente regulados por

amonio y glutamina (Gln), que son los productos derivados de la asimilación del NO_3^- (Crawford y Glass, 1998; Forde, 1999). Estos transportadores de alta afinidad están codificados por la familia de genes NRT2, que en tomate está compuesta por LeNRT2.1, LeNRT2.2 y LeNRT2.3 (Hildebrandt *et al.*, 2002).

Los LATS operan a concentraciones $> 1\text{mM}$, es decir, cuando la cantidad de nitrato en el suelo es elevada (Crawford y Glass, 1998) y están codificados por la familia génica NRT1, que en tomate está formada por dos genes, LeNRT1.1 y LeNRT1.2 (Hildebrandt *et al.*, 2002). Cabe destacar, que el transportador NRT1.1 es un transportador dual, lo que quiere decir que actúa tanto como LAT como HAT. Además, se trata de un sensor encargado de inducir la expresión de genes relacionados con el nitrato e interviene también en la regulación de otros procesos fisiológicos de la planta, como por ejemplo el control de la apertura estomática o la proliferación radicular por nitrato (Wang *et al.*, 2014).

Una vez dentro de las células de la raíz, el nitrato puede ser asimilado, almacenado en las vacuolas radicales o bien transportado por el xilema hasta las hojas, donde también puede almacenarse o asimilarse en las hojas (Andrews *et al.*, 2013). Para poder llegar al xilema existen transportadores NRT1 que se encargan del transporte a largas distancias y permiten que el nitrato pase al xilema y posteriormente a las células foliares (Wang *et al.*, 2014).

En el proceso de asimilación intervienen una serie de enzimas que reducen el nitrato para generar amonio (Figura 1.1). En el primer paso, interviene la nitrato reductasa (NR) que es una enzima citosólica, compuesta por dos subunidades, formadas a su vez por tres cofactores. La enzima se encarga de catalizar la reducción del nitrato a nitrito (NO_2^-). Es una proteína inducible que, además está regulada por mecanismos como la degradación enzimática, síntesis proteica, inactivación reversible, la concentración de sustrato y regulación efectora. Esto se debe a que el nitrito es un compuesto tóxico que si se acumula en el citosol, puede ser perjudicial para la planta (Wang *et al.*, 2014). A continuación, el nitrito entra en el plasto, donde se va a producir la segunda reducción, catalizada por la nitrito reductasa (NiR) y dando como producto amonio. Finalmente, el amonio será transferido al esqueleto carbonado 2-oxoglutarato (2-OG) mediante la ruta de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) para dar lugar a la glutamina, que es el aminoácido a partir del cual van a derivar todos aquellos compuestos de la planta que tengan nitrógeno en su estructura molecular (Andrews *et al.*, 2013).

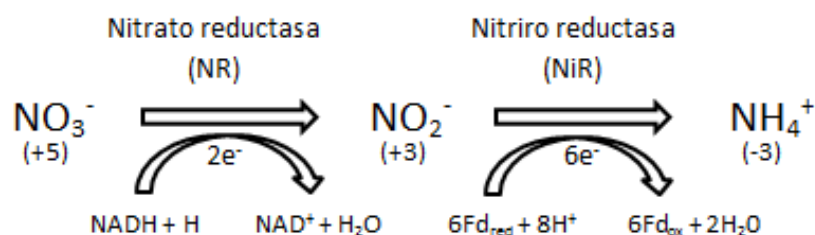


Figura 1.1: Esquema de los pasos seguidos para llevar a cabo la reducción del nitrato.

1.2.1.2. Asimilación del amonio (NH_4^+).

Se trata de un compuesto que en general, es menos abundante en el suelo que el NO_3^- , y es muy tóxico para las plantas, hecho que se manifiesta mediante la aparición del “Síndrome del amonio”. Suele aparecer en cultivos crecidos en suelos con elevadas concentraciones de NH_4^+ , y se caracteriza por clorosis en hojas, descenso de la tasa fotosintética, menor rendimiento de producción, menor contenido catiónico y cambios en los niveles de determinados metabolitos, como por ejemplo aminoácidos o ácidos orgánicos (Horchani *et al.*, 2010). Aunque también se ha visto que determinadas especies como por ejemplo el arroz, la cebolla, el arándano y el puerro, prefieren la nutrición a base de NH_4^+ (Britto y Kronzucker, 2002).

La entrada de NH_4^+ en las células radiculares también puede darse mediante transportadores de alta y baja afinidad. La familia de transportadores AMT, que tiene 11 dominios transmembrana en los que la parte C-terminal es citosólica mientras que la N-terminal es extracitosólica, es la encargada de esta entrada (Wang *et al.*, 2014).

Al igual que el nitrato, cuando el amonio se incorpora por la raíz, puede ser asimilado en el momento, almacenado en la vacuola o bien transportado a las hojas donde pueda asimilarse o almacenarse. Generalmente, las proteínas transportadoras encargadas de la movilidad del amonio son de baja afinidad. La mayoría del NH_4^+ captado en las raíces, o bien el que se obtiene de la reducción del nitrato, es asimilado en las células radiculares (Wang *et al.*, 2014), produciéndose por medio de la ruta GS/GOGAT (Horchani *et al.*, 2010).

En un primer momento, la glutamina sintetasa (GS, formada por dos isoformas, una citosólica GS1 y la otra plastídica, GS2) se encarga de catalizar la conversión del glutamato y el NH_4^+ a glutamina. Las plantas que presentan una mayor actividad enzimática de la GS son más tolerantes a la nutrición por NH_4^+ (Magalhaes y Huber, 1989). Por otro lado, la glutamato sintasa (GOGAT) se encarga de catalizar la reacción del 2-OG (procedente del ciclo de Krebs) y la glutamina (procedente de la reacción catalizada por la GS) para dar lugar a dos moléculas de glutamato (Glu) (Andrews *et al.*, 2013). En la Figura 1.2 se encuentra resumido todo el proceso de asimilación del nitrato.

Durante mucho tiempo, se pensaba que además de la ruta GS/GOGAT había otra ruta alternativa involucrada en el metabolismo del amonio, esta es la ruta catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH). Actualmente se sabe que esto no es así, y que la reacción catalizada por la GDH lo que hace es, por una parte, liberar NH_4^+ (catalizando la desaminación oxidativa del glutamato) y por otra proporcionar esqueletos carbonados para la respiración y la fosforilación oxidativa. Por lo que la GDH junto con la enzima GOGAT contribuyen en el control de la homeostasis del glutamato en las hojas, un aminoácido muy importante en el metabolismo del carbono y nitrógeno (Hawkesford *et al.*, 2012)

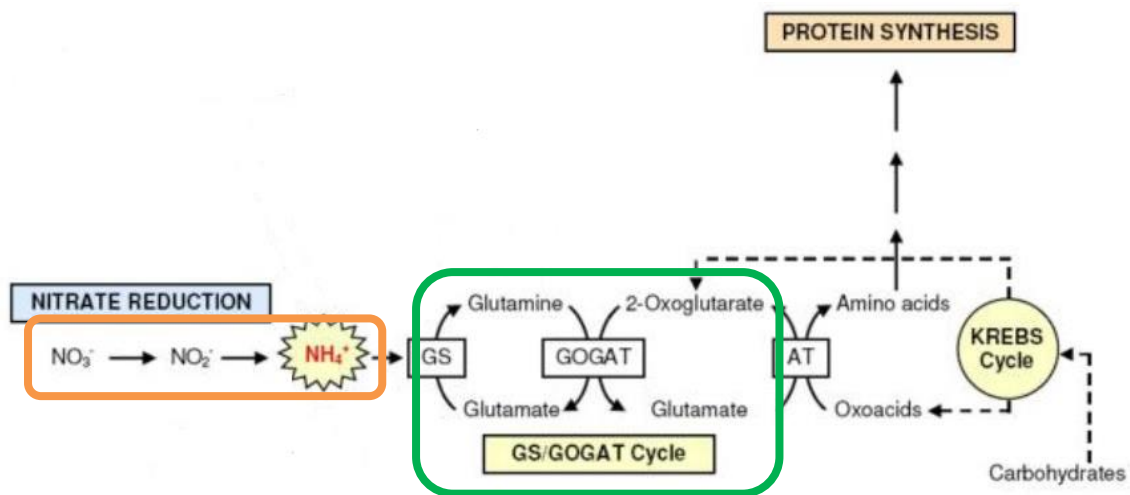


Figura 1.2: Visión general de la asimilación del nitrógeno. Encuadrado en naranja se resume el proceso de reducción del nitrato a amonio mientras que en el recuadro verde se muestra la ruta GS/GOGAT.

1.2.1.3. Nitrógeno orgánico

1.2.1.3.1. Urea

La urea es el compuesto que forma la mayor parte de los fertilizantes comerciales de uso agrícola y la presencia de determinados microorganismos en el suelo hace que, pueda ser hidrolizada (dando lugar a amonio y dióxido de carbono, CO_2), por lo que puede entrar en la planta por captación directa, o en forma de sus hidrolizados (Wang *et al.*, 2014). En cuanto a las proteínas transportadoras de urea, se encuentra tanto la DUR3, que es un transportador de alta afinidad que actúa mediante un sistema de transporte simporte (urea/ H^+) y contiene 14 dominios transmembrana, como MIPs que introducen la urea de una forma pasiva (Wang *et al.*, 2014).

1.2.1.3.2. Aminoácidos.

En el suelo también se encuentran aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas y péptidos mayores, fluctuando la concentración de aminoácidos libres en el suelo entre 1 y $100\mu\text{M}$. Existen diferentes transportadores de estos monómeros, que tienen diferente especificidad y afinidad dependiendo de cada aminoácido, como por ejemplo, el transportador de lisina-histidina (LHT1) o la aminopermeasa 5 (APP5). Estos dos transportadores se complementan, ya que la LHT1 transporta aminoácidos neutros o ácidos mientras que la APP5 se encarga de introducir aminoácidos básicos. En relación al transporte a las partes aéreas de la planta, los aminoácidos y péptidos se introducen de una forma diferente en el conducto floemático a través de las rutas simplástica y apoplástica (Wang *et al.*, 2014).

1.2.2. Interacción del metabolismo del carbono y nitrógeno.

La asimilación de nitrato y amonio en vástago y raíz para producir aminoácidos requiere adenosin trifosfato (ATP), poder reductor y esqueletos carbonados suministrados por los

procesos de fotosíntesis, glucólisis y respiración. Asimismo, el metabolismo del carbono está estrechamente unido al metabolismo del nitrógeno y cualquier efecto en la abundancia de carbohidratos tiene influencia en el metabolismo del nitrógeno y viceversa (Noctor y Foyer 2000; Lewis *et al.*, 2000). Por ello, es imprescindible la coordinación entre estos procesos para evitar una competición no controlada por la energía y las moléculas orgánicas entre las rutas de asimilación de nitrógeno, producción de carbohidratos y asimilación de CO₂.

Cabe destacar que la asimilación de nitrato es un proceso energéticamente costoso para la planta y esta energía, así como los esqueletos carbonados, 2-OG, para la acepción del amonio, se generan durante la fotosíntesis. Además, también proporciona el sustrato de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), el fosfoenolpiruvato (PEP). En condiciones de deficiencia en nitrógeno, se produce un aumento en el contenido de carbohidratos, que a su vez implica una mayor capacidad de reducción y transporte de nitrato y como cabe esperar, la asimilación de nitrógeno es mayor con plantas expuestas a la luz que en la oscuridad (Wang *et al.*, 2014).

Además existen otros procesos en la planta que, aunque no influyen de una forma tan directa sobre el metabolismo del nitrógeno como lo hace la fotosíntesis, generan compuestos necesarios o que deben ser reasimilados debido a su toxicidad para la célula. Se trata de los procesos de fotorrespiración y respiración celular. La fotorrespiración, se producen en el mesófilo de las hojas de la planta, donde interviene la enzima ribulosa- 1,5- bisfosfato-carboxilasa oxigenasa (RuBisCO). Durante el proceso se genera NH₄⁺ que rápidamente tiene que ser reasimilado mediante la vía GS/GOGAT para evitar sus efectos tóxicos (Wang *et al.*, 2014). Por otra parte, el proceso de respiración celular no solamente abastece a la planta de 2-OG durante el día, sino también le proporciona ATP necesario para la síntesis de sacarosa, generándose además, piruvato y oxalacetato (OAA) (Wang *et al.*, 2014).

Con todo esto se pone de manifiesto la correlación existente entre ambos procesos y modificar ciertos puntos en uno de estos metabolismos tendrá consecuencias directas sobre el orto.

1.3. LA MEJORA DE CULTIVOS RELACIONADA CON LA EFICIENCIA EN EL USO DEL NITRÓGENO.

Desde que se conocen los efectos contaminantes del exceso de nitrógeno en el suelo, han sido muchos los programas de mejora clásica que se han llevado a cabo para obtener cultivos crecidos en menores cantidades de nitrógeno, pero este tipo de mejora implica la necesidad de realizar y analizar cientos de cruzamientos entre variedades para obtener los híbridos de interés. Además, los mecanismos de tolerancia a condiciones desfavorables son caracteres multigénicos, lo que dificulta en gran medida obtener variedades de interés agronómico tolerantes mediante mejora clásica. Con el desarrollo de las plantas transgénicas y más actualmente de las técnicas ómicas, se ha logrado entender la base genética del proceso de nutrición de las plantas, lo que permite identificar elementos reguladores claves en los procesos de captación, transporte y asimilación del nitrógeno por parte de la planta (López *et al.*, 2013). Es por ello que la biotecnología es una opción viable que permite el desarrollo de

genotipos tolerantes sin tener las características agronómicamente indeseables de la especie donante (Varshney *et al.*, 2011).

En un primer momento y conocidas las rutas del metabolismo de nitrógeno y del carbono, las aproximaciones que se llevaron a cabo para aumentar la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) se basaban en la sobreexpresión de determinados genes claves en ambos metabolismos, lo que en muchos casos no tuvo el efecto esperado ya que la alteración de una única enzima implicada en una determinada ruta metabólica puede resultar ser enmascarada por los mecanismos concurrentes que se activan para mantener la homeostasis (Kurai *et al.*, 2011). Referido a esto, algunas de las aproximaciones que se han llevado a cabo para aumentar la tasa del NUE han sido la sobreexpresión de transportadores de nitrato, de las enzimas nitrato y nitrito reductasa y también de las principales proteínas de la ruta GS/GOGAT (López *et al.*, 2013). Además, teniendo en cuenta la fuerte demanda alimentaria necesaria para abastecer a la población mundial, aparte de aumentar el NUE, también se busca obtener cultivos con un mayor rendimiento de producción, y en este caso, tampoco se han obtenido resultados satisfactorios en mediante la sobreexpresión de enzimas participantes en la asimilación de nitrógeno (Sinclair *et al.*, 2004).

Por todo ello, actualmente se están empezando a emplear los factores de transcripción para así obtener fenotipos y genotipos que sean de interés agronómico, ya que la modificación mediante ingeniería genética de mecanismos bajo compleja regulación pueden ser lograda de forma más eficiente con la ayuda de factores de transcripción debido a su capacidad de modular simultáneamente procesos que incluyen numerosas reacciones enzimáticas usando un simple factor de transcripción (Corrales *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2011; Kurai *et al.*, 2011; Yanagisawa *et al.*, 2004). Dos ejemplos que ya han sido utilizados relacionados con el metabolismo del nitrógeno son el ANR1 que induce la iniciación y elongación de raíces en *Arabidopsis* y ha resultado en un aumento de la productividad que puede ser debido a una mayor capacidad de la toma de nitrógeno del suelo (López *et al.*, 2013). El otro factor de transcripción implicado es de la familia Dof y, es el que se ha empleado en el presente trabajo, por lo que se hablará más extensamente de él en posteriores apartados.

1.3.1. Los factores de transcripción en plantas

Todos los organismos eucariotas han desarrollado distintos patrones de regulación de la expresión génica que varían a lo largo de su ciclo vital y en respuesta a las diferentes señales del entorno en el que se encuentran. Aunque otros procesos pueden estar implicados, el principal mecanismo que permite el control de los genes que se han de expresar en un determinado nivel, momento y lugar es el control transcripcional, mediante la utilización de factores de transcripción (FTs) (Riechmann *et al.*, 2000).

Para que se lleve a cabo dicho mecanismo por el cual se regulará la expresión génica se ha de formar primero el complejo de iniciación de la ARN polimerasa II y los FTs generales en el promotor del gen que se va a transcribir, formándose primero el complejo de pre-iniciación

(PIC: Pre-Initiation Complex), en el que se encuentra la RNA polimerasa II unida al complejo TFIID, en el que se encuentra la proteína TBP (Tata Binding Protein) encargada de reconocer y unirse a secuencia consenso de la caja TATA (5'-TATAAA-3'). Además de este complejo proteico, se pueden unir otros elementos reguladores en cis (CRE: Cis Regulatory Elements) presentes en los promotores de los genes que se van a transcribir. Estos elementos reguladores pueden ser: activadores, represores, coactivadores, correpresores y moduladores del empaquetamiento de la cromatina, dependiendo de su modo de actuación en el proceso transcripcional. Así, dependiendo de los elementos que interaccionen con el complejo de pre-iniciación se regulará de una forma u otra, la transcripción de los genes diana. Por lo tanto, un único FT puede desempeñar funciones diferentes, regulando la expresión de distintos genes. La regulación de los factores transcripcionales se produce fundamentalmente, a nivel transcripcional, aunque también se han descrito numerosas modificaciones post-traduccionales, degradación por proteasoma, transporte al núcleo, y control por micro RNAs. (Larue *et al.*, 2009).

Existen diferentes tipos de FTs dependiendo de con que interaccionen. Aquellos que se unen directamente a la secuencia nucleotídica suelen hacerlo mediante diversos dominios funcionales altamente conservados que se unen a los CREs. En la Tabla 1.1 se expone un resumen de los factores de transcripción específicos de plantas agrupados por familias.

Tabla 1.1: Principales familias de factores de transcripción en plantas (Adaptado de Shiu *et al.*, 2005)

Familia	Subfamilia	Dominio de unión al DNA	CRE(s) Secuencia consenso	Nombre
AP2	ERF CBF/DREB	Estructura de α -Hélice	5'-(T)(W)RCCGCC-3' 5'-(T)RYCGAC(A)(T)-3'	ERE/Caja GCC CRT/ DRE
WRKY		Dedo de zinc C2-H2 con la secuencia conservada WRKY	5'-(T)(T)TGAC(Y)-3'	Caja W
SBP		10 circuitos conservados de C y H que unen a zinc	5'-(S)(K)GTAC(C)(W)-3'	CuRE
B3		Dos α -Hélices centrales rodeadas por 7 Láminas β	5'-CATGCAY-3'	Motivo RY
DOF		Dedo de zinc C2-C2.	5'-(W)AAAG(S)-3'	Caja P
YABBY		Dedo de zinc C2-C2 y estructura Hélice-Giro-Hélice	-	
EIN3		-	5'-AGGGGCATGTAT-3'	
DUF573		-	5'-(G)(C)YAAACAMY-3'	Caja B
GRAS		5 motivos (2 de leucinas, VHIID, SAW y PFYRE)	-	
FLO_LFY		-	5'-CCAATGT-3'	
NAM		Lámina β antiparalela enrollada alrededor de una Hélice- α	-	
TCP		Estructura Hélice-Giro-Hélice no canónica	-	

Las plantas, además de los factores de transcripción específicos también comparten otras familias de estas proteínas con otros eucariotas, aunque el porcentaje de genes que codifican para factores de transcripción es mayor en plantas que en otros organismos como *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans* (Shiu *et al.*, 2005).

1.3.1.1. Factores de transcripción tipo Dof.

Los genes Dof codifican una familia de factores de transcripción específicos de plantas que presentan un motivo altamente conservado de unión al DNA, llamado dominio Dof.

Este dominio Dof está situado en la zona N-terminal de la proteína, la cual está muy conservada, lo que no ocurre en la zona C-terminal que es más variable. El dominio Dof está formado por 52 aminoácidos que es el que se une al DNA con estructura dedo de zinc (C2-C2), de ahí el nombre que recibe la familia de estos factores de transcripción, *DNA-binding with one finger*. Como se observa en la Figura 1.3, el motivo tiene 4 cisteínas que son muy importantes para la estabilidad del giro (loop) y el correcto funcionamiento de la proteína, ya que cualquier mutación en dichos residuos provoca cambios muy importantes en la configuración del dominio, impidiendo la unión al DNA. El dominio Dof reconoce y se une en cis a la secuencia 5'-(A/T)AAAG-3', o en su defecto a la secuencia reversible (Cai *et al.*, 2013), también se puede unir a repeticiones de dicho motivo, influyendo además las secuencias flanqueantes a la región consenso a la hora de producirse la unión por el factor de transcripción a la secuencia nucleotídica (Yanagisawa *et al.*, 1999). También se ha visto que el dominio Dof es bifuncional, ya que no solamente se une a la secuencia de DNA, sino que también interviene en las interacciones entre proteínas (Yanagisawa, 2004).

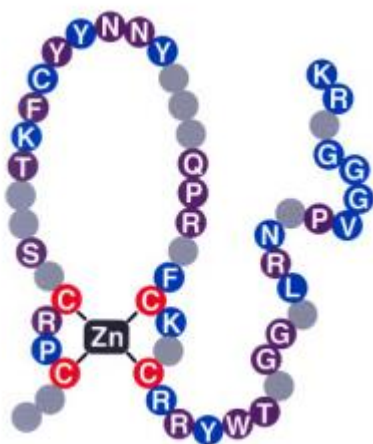


Figura 1.3: Representación del dominio Dof presente en la familia de factores de transcripción DOF.

El papel regulador de las proteínas tipo Dof en el desarrollo de la semilla está bien establecido, no obstante, se ha descrito que estos factores participan también en la regulación de genes involucrados en la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos, la germinación de semillas, el tiempo de floración, las respuestas frente a patógenos, la respuesta a las auxinas, en el control de la expresión específica en los estomas, expansión de la pared celular, ciclo celular y en la eficiencia en el uso del nitrógeno (Corrales *et al.*, 2014, Cai *et al.*, 2013, Noguero *et al.*, 2013, Yanagisawa *et al.*, 2004; Lijavetzky *et al.*, 2003). La gran variedad de funciones en las que interviene esta proteína se debe en gran parte a la variabilidad de la región C-terminal, que permite la interacción de la proteína Dof con otras proteínas reguladoras (Noguero *et al.*, 2013). Se ha visto que los niveles de expresión de ciertos Dof regulan diferentes condiciones en *Arabidopsis*, pero no se sabe nada de cómo actúan en determinados cultivos de interés agronómico como puede ser el tomate.

En *Arabidopsis*, han sido identificados unos 36 factores transcripcionales del tipo Dof, que mediante estudios filogenéticos empleando ésta y otras especies se han clasificado en cuatro subfamilias A-D (Lijavetzky *et al.*, 2003).

En una de estas subfamilias, concretamente la D, se pueden encontrar los Cycling Dof Factors (CDFs), que reciben su nombre por que oscilan bajo condiciones de luz constante. Tienen un papel muy importante en el fotoperiodo de floración de *Arabidopsis thaliana*, ya que establecen el ritmo diurno en CONSTANS (genes responsables de la floración, CO) (Corrales *et al.*, 2014).

Mediante análisis de secuencia se ha visto que en *Arabidopsis thaliana* esta subfamilia está compuesta por cinco miembros, CDF1 a CDF5, que presentan un papel importante en el control de la floración. En un estudio previo realizado por Corrales y colaboradores, (2014) se identificaron 34 secuencias en tomate homólogas a los DOF de Arabidopsis, de las cuales cinco de ellas presentan características estructurales similares a las del grupo D de *Arabidopsis thaliana* y que, potencialmente, podrían ser los genes ortólogos de los genes CDF de Arabidopsis. A estos ortólogos se les ha denominado *Solanum lycopersicon* CDFs o SICDFs.

En este mismo grupo de investigación se está analizado en detalle la función de SIDof de tomate, sobre todo en su relación con la respuesta a estrés y su impacto en la calidad del fruto. Por el momento los resultados mas relevantes han puesto de manifiesto su importante papel en el control del metabolismo. Análisis preliminares de tolerancia de plantas de tomate *Moneymaker* que expresan de forma constitutiva tanto *Dof21* como de su homólogo *SIDof21* generadas en nuestro laboratorio, indican que estas son más resistentes a distintos tipos de estreses abióticos, tales como salinidad y las temperaturas bajas, que las plantas control. Además, un resultado de mayor interés y que se presentó de forma consistente en todas las líneas, fue el incremento en fotosíntesis y biomasa de las plantas transformadas (Corrales *et al.*, 2013). Por otra parte, distintos trabajos en Arabidopsis (Yanagisawa *et al.*, 2004) y en arroz (Kurai *et al.*, 2011) que utilizan la sobreexpresión de factores de transcripción tipo Dof de maíz (*ZmDof1*) demuestran una acción conjunta de estos genes reguladores en el incremento de la fijación de CO₂ y la asimilación de nitrógeno en condiciones de deficiencia de éste último. Sin embargo, no ocurre lo mismo en *Populus*, donde la sobreexpresión del Dof1 de maíz no ha provocado un aumento en la tasa de asimilación de nitrógeno bajo condiciones deficientes para dicho elemento (Lin *et al.*, 2013). Este hecho sugiere que el factor de transcripción puede provocar respuestas diferentes en función de la especie vegetal en la que se trabaje.

1.4. EL TOMATE COMO CULTIVO DE INTERÉS AGRONÓMICO.

Dentro de la familia de las Solanáceas se encuentran algunos de los cultivos agrícolas con una mayor importancia económica, como son, por ejemplo, la patata (*Solanum tuberosum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), el pepino (*Cucumis sativus*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*). Debido a su impacto económico dichas especies han sido muy estudiadas, y en el tomate se ha realizado tanto mejora genética clásica como transformación genética mediante el empleo de técnicas de biología molecular e ingeniería genética (Nuez y Prohens, 2008).

Dentro de las Solanáceas, el tomate pertenece a la subfamilia Solanoideae y al género *Solanum* (Olmstead y Bohs, 2007). Todas las especies pertenecientes a esta familia son de dotación cromosómica diploide, siendo el tomate una especie que tiene 24 cromosomas y un genoma

de aproximadamente 950 Megabases, de las cuales hay un 75% de heterocromatina y en gran parte carece de genes (Mb) (Nuez and Prohens, 2008).

Se trata de una planta con porte arbustivo, cultivable durante todo el año y que puede desarrollarse de tres formas diferentes, rastreras, semierecta o erectas (Figura 4). Su sistema radicular es axonomorfo y el tallo principal tiene un diámetro de 2 a 4 centímetros en la base, que va disminuyendo a medida que se asciende. A lo largo del tallo, se van desarrollando los tallos secundarios y en ellos, aparecen las hojas que son compuestas e imparipinnadas y recubiertas por pelos glandulares. Los frutos aparecen a partir de las flores, que son perfectas, regulares e hipóginas. Constan de 5 sépalos, pétalos y estambres que se disponen formando un cono que envuelve al gineceo y al ovario. En cuanto a la producción, es el cultivo hortícola que más se produce tanto mundialmente (FAOSTAT, 2013), como en España, seguido de cebollas y pimientos (Anuario de Estadística Agraria, 2013).

Es uno de los vegetales más importantes en la dieta, ya que es una extraordinaria fuente de vitaminas y minerales. Además, el fruto contiene diferentes carotenoides de carácter antioxidante, en particular, licopeno, que da al tomate su color rojo y al que se ha relacionado con la prevención del cáncer de próstata y otras enfermedades degenerativas (Chen et al., 1999).



Figura 1.4: Aspecto general de las plantas de tomate en el invernadero.

2- OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo de final de grado es caracterizar el papel del factor de transcripción Dof21 en la regulación del metabolismo de carbono y nitrógeno. Para ello, se han obtenido plantas de tomate que sobreexpresan el gen Dof21 de *Arabidopsis thaliana* (*AtDof21*), que han sido sometidas a diferentes niveles de aporte de nitrógeno para determinar si poseen una mejor eficiencia en el uso de este nutriente mineral.

Para cumplir con este objetivo, se han realizado las siguientes actividades:

- Se han mantenido plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan el gen Dof21 y otras no transformadas en condiciones de invernadero a tres niveles de aporte de nitrógeno (100, 60 y 30% del aporte completo)
- Se han realizado medidas, regularmente, de contenido en clorofilas y capacidad fotosintética para determinar los efectos de la limitación y disponibilidad del nitrógeno sobre ambos genotipos.
- Se ha evaluado el efecto de la sobreexpresión del gen Dof21 y de la deficiencia en nitrógeno sobre la producción de biomasa y producción de las plantas de tomate, contenido en carbohidratos metabolizables y en proteína soluble total, contenido en N y C total, actividad enzimática de la nitrato reductasa y expresión relativa de los genes PEPC1 y SnRK1, en comparación con las plantas no transformadas.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- MATERIAL VEGETAL.

En este estudio se utilizó tomate *MoneyMaker* (*Lycopersicon esculentum* L.) que sobreexpresaba el factor de transcripción Dof21 de *Arabidopsis thaliana* bajo el promotor constitutivo 35SCaMV. A partir de ahora, a las plantas transformadas se les denominará PROK3, nombre interno que se les proporcionó en el laboratorio. Como controles se utilizaron tomates *MoneyMaker* no transgénicos (WT).

3.2- CONDICIONES DE CULTIVO.

Los experimentos se realizaron desde Enero hasta Mayo del 2014. Se depositaron las semillas de tomate de los dos genotipos en placas Petri con discos de papel de filtro humedecidos y se mantuvieron en cámaras de cultivo en condiciones de oscuridad y a 25°C hasta que emergió la radícula. A los 5 días se seleccionaron aquellas plántulas de tamaño homogéneo y se sembraron en semilleros con alveolos de 4.5 x 4.5 x 7 cm rellenos con fibra de coco (*Horticoco*). Los semilleros se mantuvieron durante un mes en las cámaras de cultivo (25/18 °C, 16/8 h luz/oscuridad), regándose con solución nutritiva tipo Hoagland nº 2 (Tabla 2.1; Hoagland y Arnon 1954).

Una vez pasado ese tiempo, las plantas se trasplantaron a macetas que contenían fibra de coco y se llevaron a invernadero bajo malla AntiThrip. Se emplearon entre 13 y 14 plantas por genotipo y tratamiento, siguiendo una distribución en bloques al azar.

Las plantas se sometieron a tres niveles de nitrógeno en la solución nutritiva: 100%, 60% y 30% del nitrógeno de la solución Hoagland. Las soluciones se prepararon mezclando solución con 100% y 0% de nitrógeno. Se realizaron dos riegos semanales, permitiendo que la solución nutritiva drenase (10 a 20% del volumen añadido). (Ver anexo I)

Tabla 2.1: Composición de la solución nutritiva y cantidad (mL por L de solución) de los diferentes stocks de sales empleado para preparar las soluciones con el 100% y 0 % del contenido en nitrógeno. (En el caso de los microelementos, al lado de cada compuesto se presentan los g necesarios para preparar 1 L de solución)

	100N (Completa)	0N
1M Fosfato monoamónico (NH ₄ PO ₄)	0.5	-
1M Nitrato potásico (KNO ₃)	3	-
1M Nitrato cálcico (Ca(NO ₃) ₂)	2	-
1M Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	1	1
Microelementos:	0.5	0.5
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	2.5	
Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	1.8	
Sulfato de zinc (ZnSO ₄)	0.2	
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	0.08	

Ácido molíbdico (H ₂ MoO ₄)	0.02		
0.5% sequestrene		0.5	0.5
1M Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)		-	0.5
0.5M Sulfato potásico (K ₂ SO ₄)		-	1
1M Cloruro cálcico (CaCl ₂)		-	2

Para obtener las soluciones de 60 y 30% de contenido en nitrógeno, se mezclaron 6 y 3 partes de la solución 100N (completa) con 4 y 6 partes de la solución 0N (sin nitrógeno) respectivamente.

Las plantas se sometieron a las condiciones de manejo y tratamientos características del cultivo de tomate comercial en invernadero.

3.3- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS.

3.3.1 Biomasa.

Al final de experimento, se determinaron los pesos frescos y secos de todas las plantas, tanto de raíces como de las partes aéreas (hojas y tallo), mediante una balanza de un decimal. Los pesos secos se obtuvieron tras secar en una estufa a 65°C durante una semana aproximadamente.

La superficie foliar total de las plantas se estimó mediante un programa de imagen ImageJ (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Se estimó la producción de cada planta recolectando los frutos, en estado rojo maduro, hasta el 4º racimo. En cada planta, se determinó el peso y el número de frutos de cada racimo.

3.3.2 Fluorescencia de las clorofilas del fotosistema II (PSII).

La fluorescencia de las clorofilas del fotosistema II se midió con un medidor portátil MINI-PAM. Se determinó el rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m), que está relacionado con los procesos de fotoinhibición o daños de la cadena de transporte de electrónica de los fotosistemas, y el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ_{PS2}), que está relacionado con el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico.

Las hojas se iluminan con un haz de luz moderada de muy baja intensidad ($0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 600 Hz para determinar la fluorescencia basal (F_0). La aplicación de un pulso saturante de luz actínica de $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ permite la estima de la fluorescencia máxima (F_m'). Estos parámetros se emplearon para calcular el rendimiento cuántico efectivo del PSII (Genty *et al.*, 1989) en hojas en condiciones de estado estacionario de luz. Para la determinación del rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) se midió la fluorescencia basal (F_0) y máxima (F_m) en las mismas hojas, pero previamente mantenidas en oscuridad durante 30 min.

Los parámetros de fluorescencia se determinaron regularmente durante el experimento: 14 de Marzo, 27 de Marzo, 1 de Abril, 11 de Abril, 2 de Mayo y finalmente el 14 de Mayo. Las medidas se realizaron en la 4-5 hoja desde el ápice. En cada fecha, se realizaron medidas en todas las plantas del experimento.

3.3.3 Contenido en clorofilas (SPAD).

Se estimó el contenido en clorofilas de las hojas mediante un SPAD-502 (*Chlorophyll Meter; SPAD-502, Minolta. Inc. Japan*). Se trata de un colorímetro portátil que mide la absorción de la hoja en las longitudes de onda características de las clorofilas (400-500 nm y 600-700 nm) y determina su contenido relativo lo que nos permite hacer una estima de la cantidad de nitrógeno.

Las medidas SPAD se realizaron, en cada fecha y en todas las plantas, en paralelo a las medidas de fluorescencia durante el experimento.

3.3.4 Parámetros fotosintéticos. Intercambio de gases.

Las determinaciones de intercambio de gases se realizaron con un medidor portátil Li6400 (Li-Cor Biosciences Inc). Se midió la tasa neta de fijación de CO₂ (A_n; μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), tasa de transpiración (E; mmol H₂O m⁻² s⁻¹), apertura estomática (g_s; mol H₂O m⁻² s⁻¹) y concentración subestomática de CO₂ (C_i; μmol CO₂ · mol de aire⁻¹). Las medidas se realizaron en condiciones de estado estacionario con una radiación PAR de 1000 μmol m⁻² s⁻¹, temperatura ambiental, concentración ambiental de 400 ppm de CO₂ y una diferencia de presión de vapor de agua entre 1 y 2 kPa.

Se realizaron medidas a mitad del experimento, el 1 de Abril y al final del experimento, el 14 de Mayo, en la 4-5 hoja a partir del ápice (madura y completamente expandida). Se realizaron 10 determinaciones en plantas distintas en cada fecha, genotipo y tratamiento.

3.3.5 Determinación de azúcares solubles y almidón.

La extracción de azúcares solubles y almidón en hojas se realizó según el protocolo descrito por McCready *et al.*, (1950). Se pesaron, en tubos de centrifuga, 50 mg de las muestras de hoja trituradas a las que se añadieron 15 mL de etanol al 80%. Los tubos se mantuvieron 10 minutos en un baño con agua hirviendo, agitándose de vez en cuando. Una vez transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 4500 rpm y se recogió el sobrenadante en matraces Erlenmeyer. La extracción se realizó dos veces más, adicionando en cada caso, el extracto al mismo matraz.

Para extraer el almidón, al precipitado de la última centrifugación, se le añadieron 20 mL de ácido perclórico al 35%. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Pasado el día de reposo, se aforó la muestra con agua destilada a 50 mL y se filtró con papel Whatman nº2, dejándose el extracto en un bote de plástico de 50 mL.

Por otro lado, para la extracción de azúcares solubles, los extractos depositados en los matraces Erlenmeyer, se pasaron por el rotavapor para eliminar el alcohol (a 60°C) y con agua destilada, se recogió el extracto depositado en el balón y se aforó a 50 mL. Finalmente y como en el caso anterior, se filtraron las muestras con papel Whatman nº2 y se dejaron en tubos de plástico de 50 mL.

Una vez extraídas ambas moléculas, se realizó la determinación empleando el reactivo antrona-ácido sulfúrico (McCready *et al.*, 1950). Dos mililitros y medio de solución problema,

convenientemente diluida se depositan en tubos Pyrex con tapón de rosca. Los tubos se colocan en un baño con hielo hasta que alcanzaron los 0°C y entonces se añadió con una bureta 5 mL del reactivo antrona-sulfúrico (0.4g de antrona en 200 mL de ácido sulfúrico al 96% frío). Los tubos se agitaron enérgicamente, se abrió el tapón ¼ de rosca para permitir la salida de gases y una vez cerrados se calentaron en un baño de agua hirviendo durante siete minutos y medio. A continuación, se enfriaron en agua a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 630 nm empleando un espectofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA). Se realizó una curva patrón con glucosa para poder interpolar los datos. Los resultados se expresaron como porcentaje de azúcares sobre el peso seco según la ecuación:

$$\% \text{ azúcares} = \frac{\mu\text{g glucosa} \cdot V \cdot 100}{V' \cdot 1000 \cdot PS}$$

Dónde:

- $\mu\text{g glucosa}$: Valor obtenido tras interpolar en la curva patrón
- V: Volumen de aforado del extracto en mL
- V': Volumen del extracto analizado en mL
- PS: Peso seco de la muestra extraída en mg

En el caso del almidón, el valor obtenido se multiplicó por 0.9 para compensar la pérdida de agua en la formación de los enlaces.

Se realizaron tres determinaciones independientes de plantas diferentes por cada genotipo y tratamiento.

3.3.6 Determinación de la actividad enzimática de la nitrato reductasa.

Para la determinación de la actividad de la nitrato reductasa, se siguió el método Hagerman y Hucklesby (1971). Se obtuvieron discos de las hojas de los diferentes tratamientos y se pesaron 0.2 g de material vegetal en tubos Falcon. Una vez pesados, se adicionaron a dichos tubos 10 mL de tampón, que contenía: fosfato dibásico y monobásico (ajustado a un pH de 7.5), nitrato potásico y n-propanol. Los tubos se incubaron en oscuridad durante 1 hora a una temperatura de 30°C, tras lo cual, se paró la reacción con 5 minutos de baño a 100°C. A continuación, se dejó enfriar con hielo y cuando los tubos se enfriaron, a una alícuota de 1 mL de solución problema se le añadieron los reactivos colorimétricos: 2 mL de sulfanilamida y 2 mL N-1-naftil-etilendramida (NNEDA) y se midió la absorbancia a 540 nm. La cuantificación se realizó por comparación con una recta patrón obtenida con cantidades conocidas de nitrito potásico (KNO_2).

Se realizaron cinco determinaciones independientes de plantas diferentes por cada genotipo y tratamiento.

3.3.7 Determinación proteínas solubles totales.

Se determinó el contenido total de proteínas solubles en hoja mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la extracción, se tomaron las hojas de las plantas de los diferentes

tratamientos y genotipos que se homogenizaron con la ayuda de nitrógeno líquido. Una vez homogeneizadas, se pesaron 100 mg y se añadió 250 µl de tampón QB (KPO₄ pH 7.8 100mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM, Triton X1000 1%, Glicerol 10% y ditiotreitol (DTT) 1mM) y se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, transfiriéndose con cuidado el sobrenadante a otro eppendorf.

Para la determinación, se tomaron 3µL de la muestra y se añadieron 150µl de la solución de reacción (0.01% Comassie Blue G-250, 5% etanol, 10% ácido fosfórico (H₃PO₄) 1.5M). Se preparó en paralelo una curva patrón con cantidades conocidas de la proteína IgG – beta-gamma globulina. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Se realizaron cuatro determinaciones independientes de plantas diferentes por cada genotipo y tratamiento. De cada determinación, se realizaron dos réplicas técnicas.

3.3.8 Contenido total en carbono/nitrógeno (C/N).

Se determinó el contenido total en carbono y nitrógeno elemental en un analizador elemental. Las medidas fueron realizadas a partir de material seco y triturado de hoja por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia).

Se realizaron cuatro determinaciones independientes de plantas diferentes por cada genotipo y tratamiento.

3.3.9 Estudio de la expresión de genes de interés.

3.3.9.1 Selección de genes de interés.

Se seleccionaron los genes PEPC1 (fosforol piruvato carboxilasa) y SnRK1 (sucrose non-fermentating-1-related protein kinase 1), ambos directamente relacionados con el metabolismo del carbono, y con ello, también del metabolismo del nitrógeno.

3.3.9.1.1 Diseño de los cebadores

Las secuencias de los genes se encontraron mediante las accesiones a la Genbank presentes en los artículos que se leyeron de los artículos relacionados con los genes a estudio. Las secuencias diseñadas se presentan en la Tabla 2.2. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para las reacciones de qPCR empleando el programa GenRunner2 y teniendo en cuenta no diseñarlos en las regiones conservadas de los genes. Los cebadores u oligos diseñados se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Oligos diseñados para la amplificación de los genes PEPC1 y SnRK1

PEPC1	Fw	5'- ACTGAGGAGAAAGAAAAGCCC -3'
	Rev	5'- ACAGCAACAACATCTCAAAGGA -3'
SnRK1	Fw	5'- TCAGTATAAGAGACCGCAGCT -3'
	Rev	5'- AGGAAACACTATAACAACTGAATG -3'

3.3.9.1.2 Comprobación de los cebadores mediante PCR.

Se ha de comprobar que los oligos diseñados amplifican realmente el gen de interés, para ello se realiza una PCR para la cual se utilizó el material vegetal de hojas de tomates WT y PROK3 a partir del cual se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA. Con esto, los cebadores y los componentes de la PCR que faltan (nucleótidos, tampón, Taq Polimerasa y agua) se realizó una PCR con las siguientes condiciones:

- 1 ciclo: 2 min a 50°C.
- 1 ciclo: 10 min a 95°C.
- 40 ciclos: 15 s a 95°C + 1 min a 60°C.
- 1 ciclo: 15 min a 95°C.

Para ver si ha habido o no amplificación se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% con tampón TBE 1X (compuesto por Tris, Borato y EDTA). Se cargaron 5 µl del resultado de la amplificación junto con el tampón de carga 6X de azul de bromofenol y EDTA. El patrón molecular utilizado fue el Real Scale Marker nº 2 (Durviz). Se aplicó un voltaje de 60 mA durante 1 hora para que se produjese la separación de las bandas. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (1 µg/mL) y las bandas se visualizaron iluminando el gel con luz ultravioleta.

3.3.9.2 Extracción de RNA de tomate

El molde para la PCR a tiempo real (RT-qPCR) será cDNA sintetizado a partir de RNA. Una vez se tiene las muestras del material vegetal, se han de congelar con nitrógeno líquido y en el caso de quererlas almacenar se hará a -80°C.

La extracción se hizo utilizando el kit de Qiagen, RNeasy® Plant Mini Kit y se siguió el protocolo del kit. Una vez ha extraído el RNA se debe hacer un tratamiento con DNasa empleando el kit comercial TURBO DNA-free™ Kit (Ambion® – Life Technologies™). Donde los 55 µl de RNA que se han obtenido en la extracción se pasan a un tubo de PCR al que se añade 5.5 µL de Buffer Turbo 10X + 1.5 µL de DNasa Turbo (2 Units/µL) del kit. A continuación se incubó durante 30 min a 37°C, se añadió 1 µl de DNasa Turbo y se volvió a incubar otra vez a 37°C durante 30 min. Después se añadieron 10 µl de resina (DNase Inactivation Reagent) para inactivar la DNasa, se dejó 2 min invirtiéndose ocasionalmente durante este tiempo. El tubo se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf.

3.3.9.2.1 Cuantificación de RNA.

Ha de hacerse una cuantificación de RNA posterior a la extracción y se realizó con el NanoDrop 2000.

3.3.9.2.2 Comprobación de la calidad del RNA.

Para comprobar la calidad del RNA se realizó una electorforesi en gel de agarosa 1% con urea 1M fundida en tampón TBE 1X. Se cargó 1µg de RNA junto con un volumen de tampón de formamida y se aplicó un voltaje de 50 mA durante hora y media. Finalmente el gel se tiñó con bromuro de etidio 1µg/mL y las bandas se visualizaron iluminado el gel con luz ultravioleta (UV).

3.3.9.3 Síntesis de cDNA.

Para pasar el RNA a cDNA se empleó el kit comercial iScript™ ReverseTranscriptio Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad). Para cada reacción se mezclaron 5 µL de la muestra de RNA (1 µg de RNA total) con 4 µL de iScript ReverseTranscriptio Supermix y 11 µL de Nuclease-free water. La RT-qPCR se llevó a cabo en un termociclador BioRad iCycler™ iQ Real-Time PCR Detection System a una temperatura de 37°C durante 1 hora.

3.3.9.3.1 Cuantificación del cDNA.

Ha de hacerse una cuantificación del cDNA posterior a la extracción y se realizó con el NanoDrop 2000, para posteriormente, dejar todas las muestras a la concentración deseada antes de empezar con la RT-qPCR.

3.3.9.4 RT-qPCR.

Para realizar la PCR en tiempo real se empleó un CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos donde se mezclaron 5 µL de cDNA (a una concentración de 200 ng/µL), 5 µL de los cebadores (directo y reverso a la concentración correspondiente) y 10 µL de SYBR® Green Supermix. La RT-qPCR se realiza en las siguientes condiciones:

- 1 ciclo: 2 min a 50°C.
- 1 ciclo: 10 min a 95°C.
- 40 ciclos: 15 s a 95°C + 1 min a 60°C.
- 1 ciclo: 15 min a 95°C.

Posteriormente, para realizar la curva de Melting, la temperatura va desde 65°C hasta 95°C con un incremento de 0.5°C por 5 min.

Es recomendable utilizar tres replicas biológicas independientes para cada muestra y tres réplicas técnicas para cada replica biológica. Los niveles relativos de expresión se calculan por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak i Schmittgen, 2001).

3.3.9.4.1 Optimización de la concentración de cebadores.

Para la optimización de la concentración de cebadores de cada gen en la qPCR se probaron diferentes concentraciones finales de los cebadores reverso y transverso respectivamente: 200/200 y 300/300 (en nM).

3.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico que se utilizó fue el análisis de la varianza (ANOVA), utilizándose tanto ANOVAS multifactoriales como simples para determinar la presencia de diferencias significativas entre los dos genotipos estudiados, los tres niveles de aporte de nitrógeno y la fecha en el caso en los que se siguió la evolución de los cultivos. La separación entre medidas se realizó mediante el test LSD ($P < 0.05$) y el programa informático utilizado para ello fue el Statgraphics Centurión XVI.II (Statistical Graphics Corp).

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los factores de transcripción son proteínas que regulan la expresión de genes a nivel transcripcional (Riechmann *et al.*, 2000). Un grupo de estos factores, específico de plantas, lo forman las proteínas Dof. Estos factores se caracterizan por tener un dominio de unión a ADN con estructura de dedo de zinc (C2-C2), que se une a la secuencia conservada 3'-T/AAAAG-5' en los promotores de los genes diana (Yanagisawa y Smidt 1999). Las proteínas Dof se ha descrito que controlan diferentes procesos biológicos, desde la formación y germinación de semillas, respuestas a la luz, señalización hormonal (Yanagisawa 2004) y floración (Corrales *et al.*, 2014). La sobreexpresión de Dof1 en maíz y mijo ha mostrado incremento en la tasa fotosintética y producción (Yanagisawa *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2011). También se ha descrito una mejora en la eficiencia en el uso del nitrógeno en *Arabidopsis* y maíz en plantas que sobreexpresan el gen Dof1 de maíz (Yanagisawa *et al.*, 2004; Kurai *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha publicado la caracterización en tomate de una familia de genes Dof, homólogos a los CDFs de *Arabidopsis* (Corrales *et al.*, 2014). Análisis de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresando uno de estos genes, el *AtDof21*, han mostrado niveles incrementados de carbohidratos y ciertos aminoácidos, indicando una mejor eficiencia en el uso del nitrógeno, de acuerdo a lo descrito anteriormente en otros genes Dof (Yanagisawa *et al.*, 2004; Kurai *et al.*, 2011). En el presente trabajo se ha estudiado la eficiencia en el uso del nitrógeno en plantas de tomate que sobreexpresan el gen *AtDof21* para evaluar su posible empleo biotecnológico en la mejora de la producción de esta especie. Para ello se han sometido plantas sobreexpresoras de tomate a condiciones de deficiencia de nitrógeno para estudiar el efecto sobre el metabolismo de carbono y nitrógeno, así como la producción en invernadero.

4.1- EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA DE PLANTAS QUE SOBREEXPRESAN EL GEN *AtDof21* DE *Arabidopsis thaliana* A LA DEFICIENCIA EN EL APORTE DE NITRÓGENO.

Se cultivaron en invernadero plantas de tomates transgénicas para el gen *AtDof21* (cuyo nombre interno del laboratorio es PROK3) y plantas de la variedad comercial *Moneymaker* (WT), sometidas a tres niveles de aporte de nitrógeno (100, 60 y 30% del aporte completo). Se realizó un seguimiento del efecto de estos aportes diferenciales mediante la evaluación del contenido en clorofilas (SPAD) y medidas de la capacidad fotosintética (fluorescencia de las clorofilas del PSII e intercambio de gases).

4.1.1. Fluorescencia del PSII

En la Figura 4.1 se muestra, la evolución frente al tiempo, de la eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPSII). Se observó una variación importante de este parámetro a lo largo del experimento, que es debida a los cambios en las condiciones ambientales, especialmente la intensidad de radiación solar. No se observaron diferencias significativas entre los dos genotipos estudiados en condiciones control. Las diferencias en el aporte de nitrógeno sólo provocaron cambios en PhiPSII ($P < 0.05$) en las plantas no transformadas (Figura 4.1A). Al final del experimento (14 de Mayo), la eficiencia cuántica efectiva disminuyó con el menor aporte de nitrógeno. Este efecto no se observó en las plantas PROK3.

El efecto de la deficiencia en nitrógeno sobre el estado del PSII en diferentes cultivos vegetales se ha descrito en numerosos estudios (Zong *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2000). En todos ellos, se observa una disminución de este parámetro con la deficiencia en el aporte de nitrógeno. En nuestro estudio, sin embargo, esta reducción no se observa en las plantas transformadas, lo que indica que mantienen la capacidad para canalizar los fotones que llegan a los tilacoides del cloroplasto y que generan electrones que serán cedidos al fotosistema I (PSI). Alternativamente, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, en las plantas PROK3, ciertas moléculas que pueden actuar como protectores del PSII (Krasensky y Jonak, 2011). Uno de los compuestos implicados es la glicina betaína (GB), un amonio cuaternario cuya acumulación provoca un aumento de la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico.

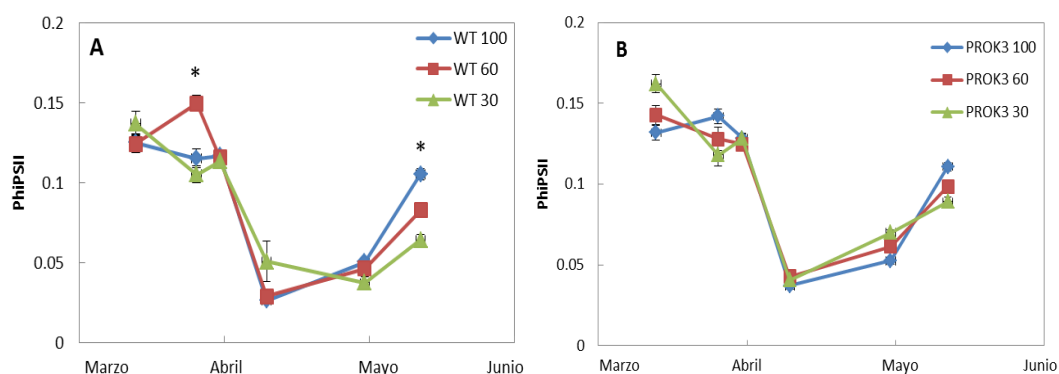


Figura 4.1: Evolución respecto al tiempo de la eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPS2) de plantas WT(A) y PROK3 (B) para los tres tratamientos estudiados (100, 60 y 30% en N). Cada valor es media de 13/14 determinaciones \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para cada genotipo.

4.1.2. Contenido en clorofilas (SPAD).

Se estimó el contenido en nitrógeno foliar empleando el equipo SPAD. Se trata de un colorímetro portátil (Pagola *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007) que permite determinar, de forma rápida y no destructiva, el contenido en clorofilas (Rodríguez *et al.*, 1998). Además, numerosos estudios han establecido una elevada correlación entre los valores SPAD y el contenido en nitrógeno foliar (Liu *et al.* 2012). Se midió la evolución respecto al tiempo de este parámetro y los resultados se muestran en la Figura 4.2. Se observó un aumento progresivo del contenido en clorofilas desde el inicio del experimento hasta inicios de Mayo, y que se puede relacionar con la madurez de las hojas y la adaptación a las condiciones ambientales. A partir de Mayo se observa un punto de inflexión y una bajada en los valores SPAD. Los puntos de inflexión coinciden con el comienzo del desarrollo de los frutos en las plantas, lo que sugiere que el nitrógeno empieza a movilizarse hacia el fruto cuando éste empieza su desarrollo.

A diferencia de lo descrito en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *Dof1* (Yanagisawa *et al.* 2004), no se ha observado, en condiciones de aporte suficiente de nitrógeno, diferencias en el contenido en clorofilas totales entre las plantas de tomate que

sobreexpresan el gen *Dof21* y las no transformadas (Figura 4.2). Sin embargo, existen diferencias en la respuesta a la deficiencia de N.

En las plantas WT, el aporte del 30% de nitrógeno provocó una disminución importante en el contenido en clorofilas desde mediados de Marzo (Figura 4.2A). Aunque aumentó ligeramente con el tiempo, no superó las 30 unidades SPAD en Mayo. En las plantas con el 60% de aporte de N, las diferencias se observan a partir de principios de Mayo. (Figura 4.2A). En las plantas PROK3, hasta primeros de Mayo no se observaron diferencias en los valores SPAD debido a la deficiencia de nitrógeno (Figura 4.2B). Esta caída, que es más acusada que en las plantas WT se podría relacionar con la elevada producción de frutos observada en este genotipo (ver sección 4.2.2).

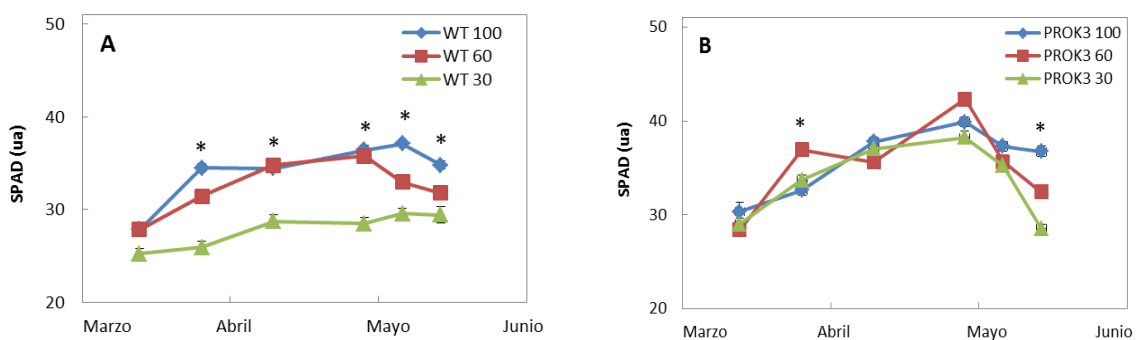


Figura 4.2: Evolución respecto al tiempo del contenido en clorofilas en las hojas de los cultivos WT (A) y PROK3 (B) en condiciones de aporte diferencial de N (100, 60 y 30% aporte de N). Cada valor es media de 13/14 determinaciones \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para cada genotipo.

4.1.3. Parámetros fotosintéticos. Intercambio de gases.

Se realizaron medidas de fotosíntesis por intercambio de gases en dos fechas: el 1 de Abril, a mediados del experimento, y el 14 de Mayo, cuando se observan diferencias entre tratamientos en el contenido de clorofilas/nitrógeno foliar. En la Tabla 4.1 se muestran las medidas de fijación neta de CO_2 (A_N), apertura estomática (g_s), transpiración (E), concentración subestomática de CO_2 (C_i) y eficiencia en el uso de agua, WUE (A_N/E).

Las plantas PROK3 mostraron una mayor fotosíntesis neta (A_N) que las no transformadas ($P < 0.05$). Resultados obtenidos en el laboratorio en otras líneas (no publicados) y en otros trabajos (Gupta *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2009) sugieren la participación de los genes *Dof* en la regulación de la fotosíntesis. Estos datos concuerdan con el mayor contenido en azúcares solubles, principalmente sacarosa, y crecimiento descrito en plantas que sobreexpresan ciertos genes *Dof* (Yanagisawa *et al.*, 2004; Gupta *et al.* 2011). A 1 de Abril, no se observó efecto en A_N por diferencias en el aporte de nitrógeno (Tabla 4.1) en ninguno de los dos genotipos estudiados. Sin embargo, sí que disminuyó este parámetro el 14 de Mayo, observándose una disminución progresiva a medida que disminuye el aporte de nitrógeno. Cabe destacar, que, porcentualmente, la disminución es menor en el genotipo PROK3 que el WT, y los valores son

superiores en cualquier nivel de aporte de nitrógeno. Estos datos parecen sugerir que las plantas que sobreexpresan el gen *Dof21* mantienen una mayor tasa de fijación de CO₂ incluso en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno.

Tampoco se observaron cambios el 1 de Abril en los demás parámetros fotosintéticos determinados (Tabla 4.1). Sin embargo, al final del experimento, la deficiencia en el aporte de nitrógeno provocó cierto cierre estomático en las plantas WT y una disminución en la tasa de transpiración. No se observaron cambios en estos parámetros en las plantas PROK3. En estas plantas, la eficiencia en el uso del agua fue ligeramente superior, aunque sin significación estadística.

Tabla 4.1: Efecto de la limitación del aporte de nitrógeno sobre la fotosíntesis neta (A_n) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), apertura estomática (g_s) ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentración subestomática de CO₂ (C_i) ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol de aire}^{-1}$), la tasa de transpiración (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y eficiencia en el uso de agua (WUE) (mmol/mmol) en plantas que sobreexpresan el gen *Dof21*. Plantas de tomate no transformadas (WT) se usaron como controles.

Fecha	Genotipo	Tratamiento	Parámetros Fotosintéticos				
			A_n	g_s	C_i	E	WUE
1.04.14	WT	100	9.48 a	0.38 a	344 a	6.19 a	1.53 a
		60	9.00 a	0.49 a	348 a	7.06 a	1.27 a
		30	8.98 a	0.32 a	339 a	5.62 a	1.60 a
	PROK3	100	10.19 a	0.48 a	341 a	7.12 a	1.43 a
		60	10.30 a*	0.38 a	341 a	6.21 a	1.66 a
		30	10.19 a*	0.32 a	332 a	5.53 a	1.84 a
14.05.14	WT	100	7.98 a	0.25 a	333 a	4.51 a	1.77 a
		60	6.24 b	0.19 b	330 a	3.79 ab	1.65 a
		30	4.80 c	0.17 b	332 a	3.24 b	1.61 a
	PROK3	100	9.43 a*	0.27 a	324 a	5.09 a*	1.89 a
		60	8.18 b*	0.22 a	319 a	4.39 a	1.93 a
		30	6.96 c*	0.24 a	333 a	4.52 a*	1.63 a

Las letras denotan las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para cada genotipo y cada día de medida. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre un mismo tratamiento para los dos genotipos en un determinado día. Cada valor es media de 10 determinaciones independientes.

4.1- EFECTO DE LA LIMITACIÓN DEL APORTE DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL METABOLISMO DE CARBONO Y NITRÓGENO EN PLANTAS QUE SOBREENPRESAN EL GEN *AtDof21*.

El experimento se finalizó cuando los tratamientos diferenciales de aporte de nitrógeno mostraron efectos sobre el contenido foliar de nitrógeno y sobre el proceso fotosintético. En este momento, se determinaron diversos parámetros relacionados con el metabolismo de carbono y nitrógeno, así como de crecimiento de las plantas. Se ensayó en las hojas la actividad enzimática de la nitrato reductasa, se determinó el contenido en C y N, proteínas solubles totales y carbohidratos, y la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético.

4.2.1. Producción de biomasa.

Para cada planta, se determinó el peso fresco y seco de la raíz, tallo y hojas de las plantas, así como el número de hojas y la superficie foliar. En la Tabla 4.2 se muestran los datos correspondientes a los pesos secos. Las plantas sobreexpresoras han mostrado un mayor crecimiento vegetativo en condiciones de aporte nutritivo completo (58.2 vs 54.2 g de peso seco total). Aunque muestran un menor desarrollo radicular, presentan un mayor desarrollo del vástago debido fundamentalmente a unos tallos más desarrollados (Tabla 4.2 y Figura 4.3). Los datos de superficie foliar y número de hojas sugieren una mayor masa foliar, sin embargo no alcanzan la significación estadística. Este mayor crecimiento ha sido observado en otras líneas que sobreexpresan genes Dof en tomate en nuestro laboratorio (datos no publicados) y en otras especies como tabaco (Wang *et al.*, 2013).

Tabla 4.2: Efecto de la limitación en el aporte de nitrógeno sobre la producción de biomasa en plantas que sobreexpresan el gen Dof21. Se presenta el peso seco del tallo (g), de raíz (g), de hojas (g), de vástago (hojas + tallo, en g), el número de hojas y la superficie foliar (cm²). Plantas no transformadas (WT) se emplearon como controles.

Genotipo	Tratamiento	BIOMASA					
		Ps tallo	Ps hojas	Ps vástago	Ps raíz	Nº hojas	Superficie Foliar
WT	100	15.7 a	31.2 a	46.5 a	7.7 a	20 a	9773 a
	60	14.6 a	28.8 a	43.4 a	7.1 a	21 a	9631 a
	30	9.2 b	18.3 b	27.6 b	4.8 b	19 a	5603 b
PROK3	100	20.8 a*	32.3 a	53.1 a*	5.1 a*	21 a	10069 a
	60	17.8 a*	28.2 b	45.9 b	4.8 a*	22 a	10622 a
	30	18.0 a*	22.8 c*	40.8 b*	4.0 a	15 a	5539 b

Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre distintos genotipos para cada día de medida, siendo $a > b > c$. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativa entre un mismo tratamiento para los dos genotipos.

En el momento del muestreo al final del experimento, hemos observado que la limitación en el aporte de nitrógeno provocó una disminución significativa de la producción de la biomasa para el tratamiento del 30% de aporte en ambos genotipos (Tabla 4.2 y Figura 4.3). Cabe destacar que la disminución es porcentualmente más marcada en las plantas WT, incluso en las raíces. Estos resultados concuerdan con las propuestas de que la expresión de algunos genes Dof permite un mayor crecimiento en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Yanagisawa *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013). En el caso del 60% se produce una ligera disminución, aunque no estadísticamente significativa.

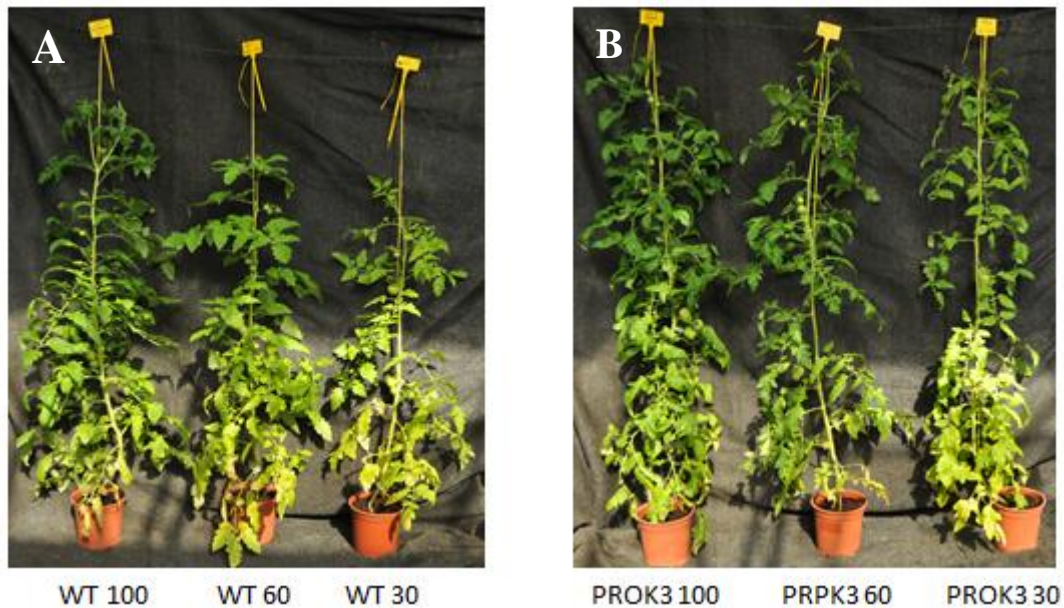


Figura 4.3: Efecto del aporte diferencial de N sobre el aspecto general de plantas WT (A) y PROK3 (B).

4.2.2 Producción y tamaño de fruto.

La mayor producción de biomasa descrita en el crecimiento vegetativo de las plantas que sobreexpresan el gen *Dof21* también se refleja en el crecimiento reproductivo (Figura 4.4A y B). El genotipo transgénico muestra una producción en un 250% superior al WT. Estos resultados confirman la mayor producción de biomasa propuesta en estas líneas, pero además indican que se produce una partición de fotoasimilados preferencial hacia los frutos, reforzando por lo tanto su interés en mejora. Un papel del gen *Dof1* en la producción de grano en mijo ha sido propuesta por Gupta *et al.*, 2011. Por otro lado, se ha descrito una expresión regulada diferencialmente durante el desarrollo en este tipo de factores de transcripción (Corrales *et al.*, 2014). En el presente trabajo la expresión del gen *Dof21* está controlada por el promotor constitutivo 35SCaMV, por lo que queda por dilucidar su papel en la regulación de enzimas clave en las relaciones fuente-sumidero de la planta. La mayor producción observada en condiciones control, fue debida mayoritariamente al aumento en el tamaño del fruto (Figura 4.4C y D, y Figura 4.5), y también al aumento del número de frutos por planta (Figura 4.4E y F).

En condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno, las plantas que sobreexpresan el gen *Dof21* mantienen la mayor producción de fruto (Figura 4A y B). Sin embargo, no parece observarse un efecto claro de la deficiencia en el aporte de nitrógeno sobre la producción. El tratamiento con un 30% de aporte de N muestra medias de producción ligeramente inferiores al control pero las diferencias no son significativas. Cabe destacar, que, incluso en las condiciones de 30% de aporte de nitrógeno, las plantas transgénicas producen más cantidad de fruto que las WT en condiciones de nutrición óptima (150 vs 100%, respectivamente).

El mayor tamaño del fruto de las plantas transgénicas también se mantiene en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno (Figura 4.4C y D, y Figura 4.5). De hecho, el tamaño del fruto en las plantas que sobreexpresan el gen *Dof21* en estas condiciones es superior al de las condiciones control (150% respecto a las condiciones control). Estos resultados concuerdan, con lo que ya describe Li *et al.*, (2010), donde los tomates crecidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno tienen un mayor tamaño respecto a los que crecen con el contenido nitrogenado completo. Este hecho podría estar relacionado con una cierta disminución en el número de frutos cuajados. Asimismo, explicaría los datos relacionados con la falta de diferencias claras en producción pues disminuye en número de frutos cuajados de forma significativa para las plantas PROK3 con la deficiencia en el aporte de N (Figura 4.4E y F) pero aumenta su tamaño. Nuestros resultados confirman el interés de estos genes como diana en la mejora de la producción, en condiciones que minimicen los costes y la contaminación ambiental debido al uso excesivo de fertilizantes nitrogenados.

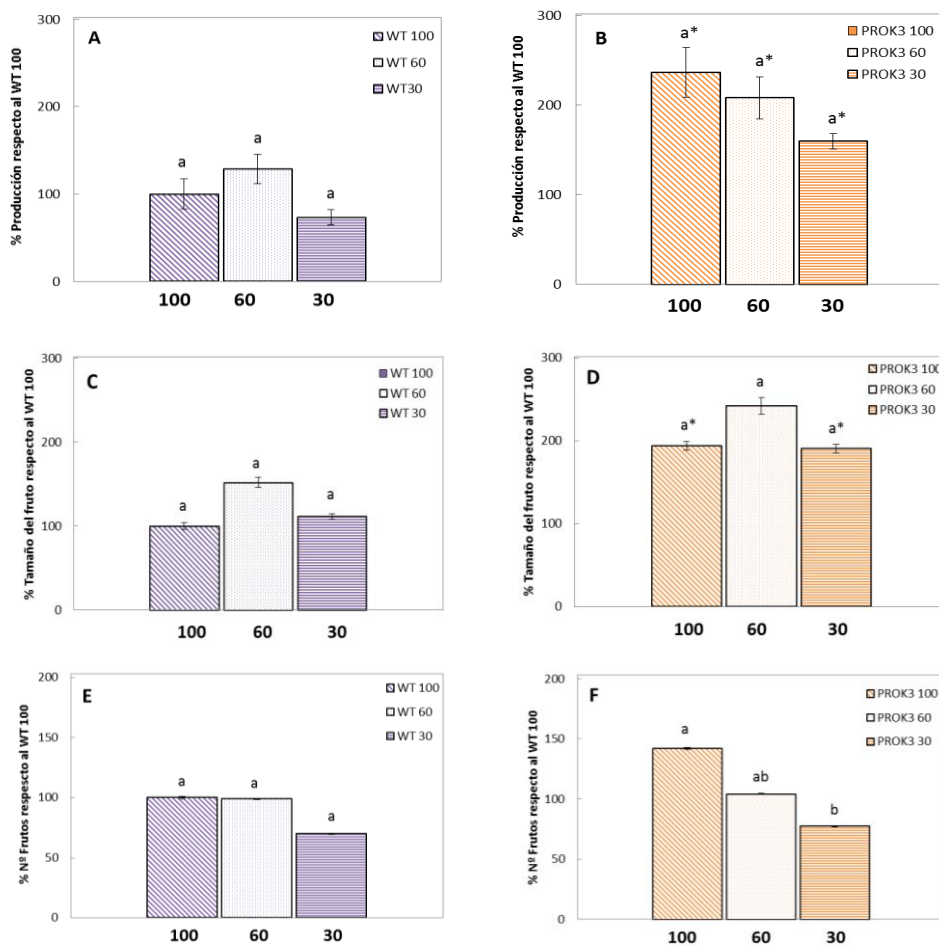


Figura 4.4: Efecto de la limitación en el aporte de N sobre la producción (A,B) de tomates (g/planta) y el tamaño (C,D) del fruto (g/fruto) y el número de frutos por planta (E,F) en cultivos WT (A,C,E) y PROK3 (B,D,F). Todos los resultados se han presentado en porcentajes respecto a los valores de las plantas WT 100. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P > 0.05$). Los asteriscos indican diferencias ($p < 0.05$) entre genotipos para un mismo tratamiento. Cada valor es media de los valores obtenidos en 13/14 plantas.

Aunque no se ha evaluado la calidad del fruto en el presente trabajo, estudios realizados en el laboratorio en líneas similares, han indicado que en condiciones de fertilización completa estos frutos presentan una mayor calidad organoléptica, derivada, entre otros, de un mayor contenido en sacarosa y malato, y un menor contenido en ácido cítrico (datos no mostrados). Otros autores han indicado el papel del malato en la calidad del fruto en condiciones de aporte de nitrógeno alterado (Xu *et al.*, 2012).



Figura 4.5: Aspecto representativo de los frutos obtenidos por efecto de la sobreexpresión del gen Dof21 y la limitación en el aporte de N en plantas PROK3 y WT.

4.2.3 Contenido en azúcares solubles y almidón.

Se ha determinado el contenido foliar en azúcares solubles totales (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa), como carbohidratos de transporte o metabolizables directamente, y almidón, como carbohidrato de reserva. El contenido en azúcares solubles (Figura 4.6A y B) no mostró diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los genotipos ensayados, pero el contenido en solubles es ligeramente superior en las plantas que sobreexpresan el gen Dof21, si bien las diferencias sólo son significativas en condiciones de 30% de aporte de N. Otros autores han descrito un mayor contenido en sacarosa en plantas que sobreexpresan genes Dof (Yanagisawa *et al.* 2004; Corrales *et al.* 2014). Es de destacar la importante subida del contenido de almidón en hojas en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno, más acusada en las plantas transgénicas (Figura 4.6C y D). Este incremento podría estar relacionado con la demanda de esqueletos carbonados para su asimilación debida a la escasez de N. La mayor subida en almidón en las plantas transgénicas se podría deber a la mayor tasa de fijación de CO₂ descrita en estas plantas (Ver sección 4.1.3). En otros estudios en tabaco (Wang *et al.*, 2013) en los que se ha sobreexpresado *AtDof1* conjuntamente con la glutamina sintetasa en condiciones de deficiencia en nitrógeno, no se ha visto diferencias significativas en el contenido en almidón en líneas transgénicas, lo que podría indicar, que, en este caso, la expresión de la GS haga que en vez de acumularse los azúcares en forma de almidón, se esté

propiciando la formación de glutamina y con ello haya un aumento del contenido en aminoácidos y proteínas.

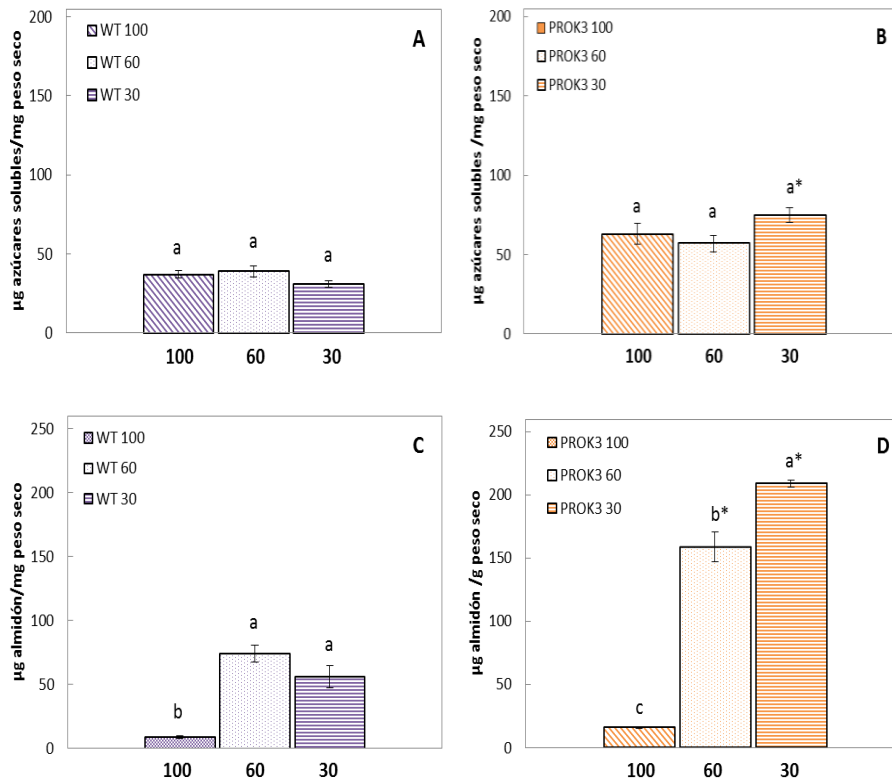


Figura 4.6: Efecto de la limitación en el aporte de N en el contenido foliar en azúcares solubles totales (A,B) y almidón (C,D) en plantas WT (A,C) y transgénicas (B,D). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los asteriscos indican diferencia ($p < 0.05$) entre genotipos bajo el mismo tratamientos. Cada valor es media de cuatro determinaciones independientes.

4.2.4 Contenido en proteínas solubles totales.

Se ha descrito una mayor síntesis y acumulación de aminoácidos en plantas que sobreexpresan los genes Dof (Corrales *et al.*, 2014; Yanagisawa *et al.*, 2004;). En el presente trabajo, hemos cuantificado el contenido total en proteína soluble en hojas mediante el método de Bradford (1976). Se ha confirmado un mayor contenido en proteínas en las plantas transgénicas respecto a las control (Figura 4.7). Este mayor contenido también se mantiene en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno. Cabe destacar que no se ha observado en ninguno de los genotipos alteraciones en el contenido proteico, por lo que en las condiciones ensayadas, ambos genotipos son capaces de mantener el equilibrio síntesis/degradación de proteínas en las hojas jóvenes maduras, a costa probablemente de otros compuestos nitrogenados (p.e. clorofilas, ver sección 4.1.2) o removilizándolo de otros órganos, como p.e. hojas viejas.

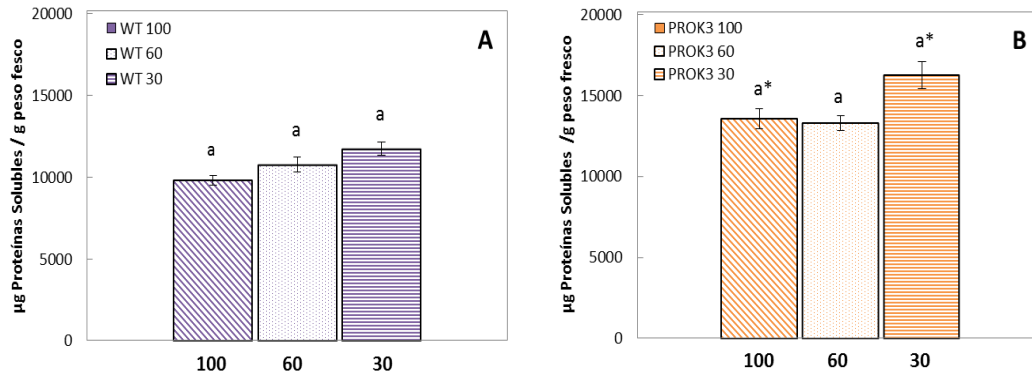


Figura 4.7: Efecto de la limitación de N en el contenido de proteínas solubles totales en hojas de plantas WT (A) y PROK3 (B). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre genotipos bajo el mismo tratamiento. Los datos son medias (\pm error estándar) de cuatro determinaciones independientes.

4.2.5 Actividad enzimática de la nitrato reductasa.

El primer paso de asimilación del nitrato, principal fuente inorgánica de nitrógeno en los suelos, está catalizada por la nitrato reductasa (Wang *et al.*, 2014). NR cataliza la transformación de nitrato a nitrito, y puede tener lugar tanto en las raíces como en el vástago. Generalmente, el nitrato es transportado por el xilema al vástago y reducido en las hojas. Aunque los valores de las plantas PROK3 son ligeramente superiores, no se han observado diferencias significativas entre genotipos (Figura 4.8). Se ha descrito una relación entre la disponibilidad de carbohidratos y la capacidad de las hojas para fijar nitrato. De hecho, la NR está fuertemente regulada por los niveles de carbohidratos, la disponibilidad de ATP y poder reductor, y por la luz (Hagerman y Hucklesby, 1971)

Los dos genotipos mantienen la actividad NR en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno. El mantenimiento de los niveles de azúcares solubles disponibles en las hojas, y por lo tanto de los esqueletos de carbono para la asimilación del nitrógeno, así como de los niveles de proteína soluble total, podrían explicar estos resultados.

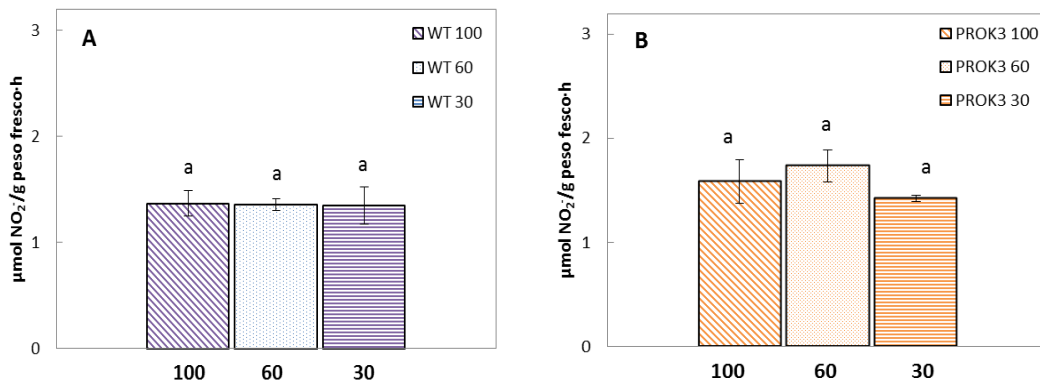


Figura 4.8: Efecto de la limitación en el aporte de N sobre la actividad enzimática de la enzima nitrato reductasa para plantas WT (A) y PROK3 (B). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tres tratamientos de los diferentes genotipos. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre genotipos para el mismo tratamiento. Los valores son medias (\pm error estándar) de cinco determinaciones independientes.

4.2.6 Contenido total en Carbono/Nitrógeno.

Como se ha indicado anteriormente, el metabolismo de C y N están fuertemente ligados (Zheng, 2009). Cuando se produce una deficiencia de nitrógeno, suele producirse una inhibición de la fotosíntesis, y por otro lado, cuando se aumenta la fijación de CO_2 , se suele promover la absorción y asimilación de nitrógeno. Por lo tanto, el mantenimiento de un equilibrio entre C y N es crítico desde el punto de vista metabólico. En este sentido, en este trabajo se ha determinado el contenido en C y N mediante un analizador elemental, y los resultados se muestran en la Figura 4.9. Las plantas PROK3 han mostrado un mayor contenido en C en las hojas en condiciones de aporte suficiente de nutrientes. Este resultado concuerda con los descritos anteriormente, que indicaban que estas plantas tenían una mayor tasa fotosintética y contenido en carbohidratos. Por otro lado, no se observaron diferencias en el contenido en N entre genotipos, y sí una mayor ratio C/N en las PROK3 debido a una mayor cantidad de C.

En condiciones de deficiencia en el aporte de nitrógeno, el contenido en C no varió dentro de cada genotipo, y fue ligeramente superior en las plantas PROK3 (Figura 4.9A y B). Sin embargo, se observó una respuesta diferencial entre genotipos en el contenido en nitrógeno (Figura 4.9C y D). En las plantas WT los niveles de N disminuyeron al disminuir el aporte de nitrógeno en la fertilización (Figura 4.9C y D). En las plantas PROK3 aunque también se observa una ligera disminución, esta no es significativa. Como consecuencia, la ratio C/N (Figura 4.9E y F) aumenta en las plantas WT a medida que el aporte disminuye, mientras que las plantas PROK3, aunque tiene una tendencia a aumentar, este aumento no es significativa ($P < 0.05$). Este aumento, indica que se está produciendo una mayor fijación del CO_2 y con ello obteniéndose una mayor cantidad de esqueletos carbonados con una menor cantidad de nitrógeno foliar, lo que quiere decir que tanto las plantas transformadas como sus controles están utilizando de una forma más eficiente el nitrógeno presente en la hoja.

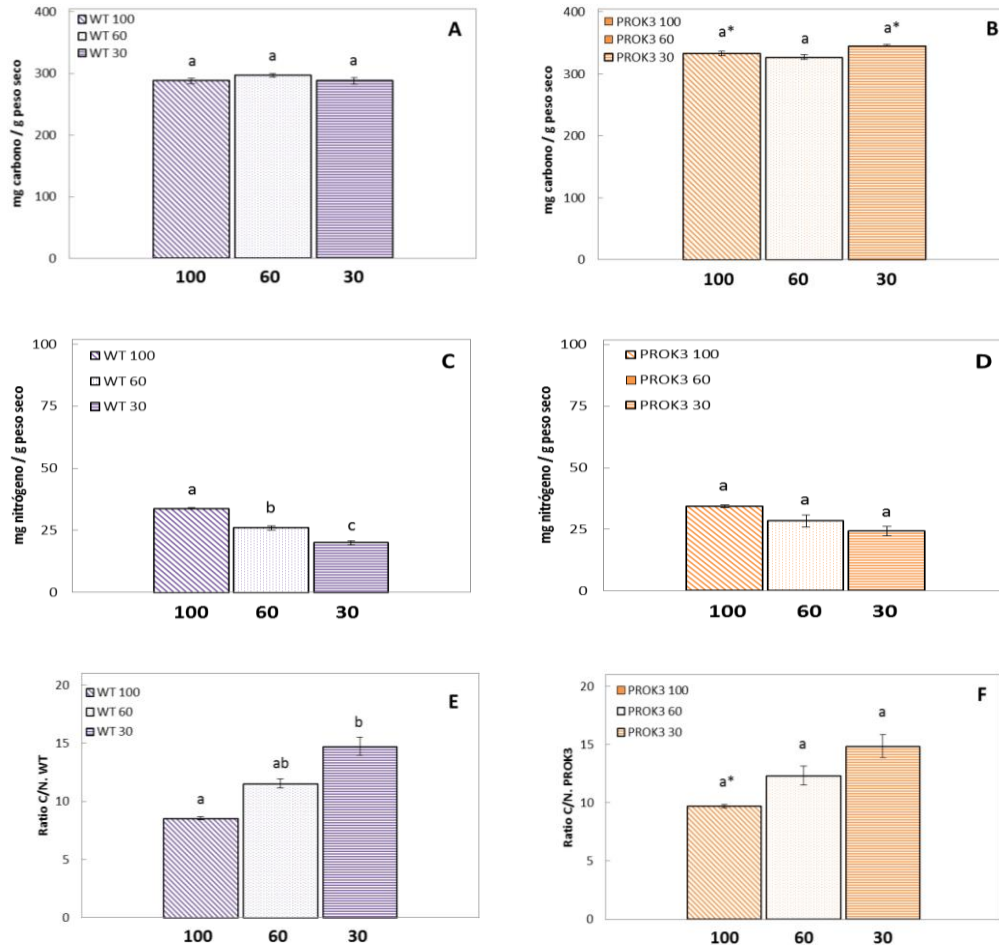


Figura 4.9: Efecto de la limitación en el aporte de N sobre el contenido en C, N y la ratio C/N en plantas WT (A, C y E) y PROK3 (B, D y F). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de un mismo genotipo. Los asteriscos indican la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre mismos tratamientos entre diferentes genotipos. Los valores son medias (\pm el error estándar) de cuatro determinaciones independientes.

4.2.7 Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo del carbono y nitrógeno.

Después de verificar que los oligos generados amplificaban los genes a evaluación mediante la PCR de comprobación, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión relativa de los genes PEPC1 y SnRK1, dos genes implicados en el metabolismo del carbono. La enzima PEPC1 se encarga de catalizar la carboxilación del fosfoenolpiruvato para formar oxalacetato y fosfato inorgánico. En el caso de las plantas C3 se encarga de mantener los niveles óptimos de precursores del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), que se emplearán en la biosíntesis de aminoácidos (Marsh *et al.*, 2003). No se han observado diferencias en la expresión del gen PEPC1 (Figura 4.10A), indicando que ambos genotipos disponen de PEPC1 suficiente para la síntesis de esqueletos carbonados empleados para la biosíntesis de aminoácidos en las hojas.

La SnRK1 es una kinasa clave en el metabolismo central del carbono y del nitrógeno, que actúa como señalizador de los niveles de azúcar en la célula y que se activa en respuesta a bajos niveles de glucosa. En estudios previos realizados por Nunes *et al.*, (2013) se ha visto que está inhibida por los metabolitos derivados del metabolismo del carbono, como la trehalosa 6-fosfato, glucosa 1-fosfato, glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, ribulosa 5-fosfato y ribosa 5-fosfato. Además de que se inhiba por estos metabolitos, existen diferencias en el grado de inhibición de cada metabolito dependiendo en el tejido en el que nos encontremos, en el caso de hojas maduras, los metabolitos que presentan una mayor inhibición son la ribosa 5-fosfato y la ribulosa 5-fosfato. En este trabajo, la SnRK1 está expresada por igual en ambos genotipos (Figura 4.10B). Sin embargo, el mayor contenido en azúcares solubles sugeriría una menor actividad SnRK1 en las plantas PROK3. Estos resultados indican, no obstante, que las diferencias en el metabolismo entre los genotipos estudiados no están relacionadas con variaciones en la expresión de la quinasa SnRK1.

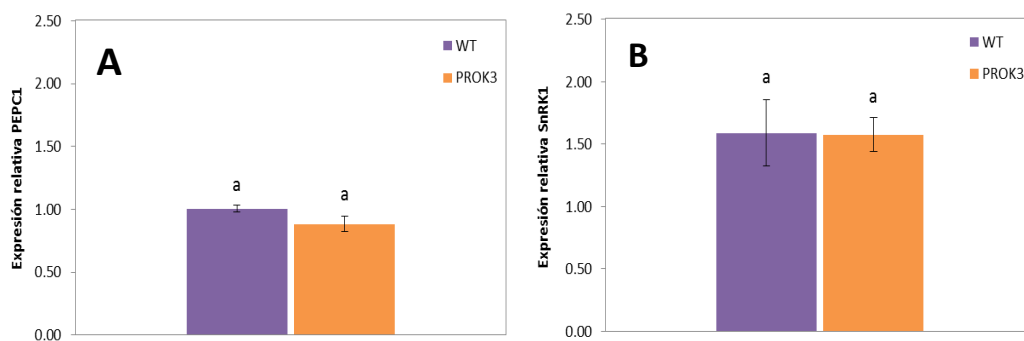


Figura 4.10: Análisis de la expresión relativa mediante qPCR de los genes PEPC1 (A) y SnRK1 (B) entre ambos genotipos, WT y PROK3. Los valores de expresión relativa se muestran con \pm el error estándar.

4.3- DISCUSIÓN GENERAL.

Como macronutrientes, el carbono y el nitrógeno tienen papeles fundamentales en el crecimiento de las plantas. Además, estos nutrientes funcionan como señalizadores que afectan a numerosos procesos celulares a través de la regulación de la expresión de genes. Se ha sugerido que sobre la mitad del genoma de *Arabidopsis thaliana* está regulado por C, N o la interacción C/N (Gutiérrez *et al.*, 2007; Zheng 2009). Se requiere una ratio C/N óptima para el correcto funcionamiento del crecimiento y desarrollo de la planta, a través de procesos como el desarrollo de la semilla o de la raíz, tiempo de floración, senescencia, fotosíntesis y regulación de la asimilación de C y N (Kant *et al.*, 2012).

Se puede observar una clara relación de la tasa fotosintética con la biomasa de las plantas cultivadas, así, las plantas que más biomasa tienen son las que a su vez, tienen mayor tasa fotosintética. Un buen funcionamiento de la reacción de fotosíntesis también se debe a un buen estado del PSII y la capacidad de fijación del CO₂ que es una reacción en la que interviene

la enzima Rubisco. En relación a esto, se ve que el contenido en clorofilas tomado en la última fecha concuerda con los resultados proporcionados del contenido en nitrógeno, ya que como se ve en ambas figuras, el contenido en este elemento es un poco más abundante en las plantas PROK3 y va disminuyendo con la bajada del aporte de nitrógeno. Además, cabe destacar que la bajada en el nitrógeno foliar que se observó en el SPAD, coincide con los primeros estadios del desarrollo de los frutos de las plantas, por lo que esto indica que los tomates requieren una gran cantidad de nitrógeno para poder madurar, nitrógeno que toman de las hojas. El mayor tamaño y la mayor producción de los frutos de las plantas transgénicas nos está indicando que efectivamente, las plantas sobreexpresoras del gen *AtDof21* utilizan el nitrógeno y el carbono de una forma más eficiente, ya que a menores niveles de dicho elemento, consiguen mayores cantidades de frutos. Además de todo lo mencionado anteriormente, el mayor contenido en azúcares solubles en las hojas de plantas transgénicas puede indicar que los frutos derivados de estos cultivos sean de una mayor calidad nutricional y que contengan, además de los azúcares solubles mencionados, mayor cantidad de ácidos orgánicos, que son los responsables de la calidad del tomate.

En cuanto a la expresión de los genes ensayados, hay que tener en cuenta que los estreses a los que las plantas están sometidas tienen un gran impacto en la expresión génica (Krasensky y Jonak, 2012) y la deficiencia en nitrógeno no lo es menos. Según los resultados obtenidos, aunque no se hayan visto diferencias significativas importantes en los genes ensayados sí que se puede decir que el factor de transcripción Dof21 es importante en la modulación de ambos metabolismos (carbono y nitrógeno), por lo que debe estar actuando en otros genes, ya que las diferencias entre las plantas WT y PROK3 permiten decir que efectivamente, el factor de transcripción provoca un crecimiento de las plantas en condiciones deficientes en nitrógeno.

El uso de factores de transcripción supone una herramienta muy potente en la mejora de la producción a través de sus múltiples efectos sobre el metabolismo de las plantas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran la utilidad de los factores de tipo Dof en ingeniería metabólica, permitiendo la mejora de la producción de tomate incluso en condiciones de limitación en el aporte de nitrógeno.

5-CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se extraen de este trabajo se exponen a continuación:

- La sobreexpresión del gen Dof21 de *Arabidopsis thaliana* en plantas de tomate *MoneyMaker* provoca un aumento en la tasa fotosintética de las plantas, que se refleja en un mayor contenido foliar de carbohidratos metabolizables y una mayor producción de biomasa y de fruto.
- Las plantas transgénicas muestran niveles ligeramente aumentados de proteína soluble total, aunque el contenido total de N no difiere de las plantas no transformadas. Sin embargo, la ratio C/N es superior en estas plantas debido al mayor contenido en C.
- La sobreexpresión del gen Dof21 no altera, de forma significativa, la actividad nitrato reductasa, ni la expresión de genes relacionados con la regulación del metabolismo de C y N, como la PEPC o la SnRK1.
- Las plantas transgénicas han mostrado una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno, ya que mantienen la relación C/N en condiciones de limitación de aporte de nitrógeno. En estas condiciones, aunque disminuye la fotosíntesis, mantienen el contenido en carbohidratos y en proteína soluble total.
- La sobreexpresión del gen Dof21 ha permitido mantener la producción de biomasa y de fruto en condiciones de deficiencia de nitrógeno. La producción de fruto en estas condiciones limitantes es superior al de las plantas no transformadas en condiciones de aporte completo de nitrógeno.
- La sobreexpresión del gene Dof21 es una buena estrategia para obtener cultivos crecidos con menor cantidad de fertilizantes nitrogenados, con lo que se contribuye a realizar una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

6- BIBLIOGRAFÍA

- ANDREWS, M.; RAVEN, JA.; LEA, PJ., 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen forms affects plants. *Annals of applied biology*, 163: 174-199.
- ANUARIO DE ESTADÍSTICA AGRARIA, 2013. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- BRADFORD, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, 7(72): 248-254.
- BRITTO, D.; KRONZUCKER, H., 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: A critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159: 567-584.
- CAI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, T.; HU, T.; YE, J.; ZHANG, J.; WANG, T.; LI, H.; YE, Z., 2013. Genome-wide Analysis of Plant-specific Dof Transcription Factor Family in Tomato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(6): 552-566.
- CORRALES, AR.; NEBAUER, SG.; CARRILLO, L.; FERNÁNDEZ-NOHALES, P.; MARQUÉS, J.; RENAUMORATA, B.; GRANELL, A.; POLLMANN, S.; CARBAJOSA, JV.; MOLINA, RV.; MEDINA, J., 2014. Characterization of tomato Cycling Dof Factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/ert451.
- CRAWFORD, NM., 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *American Society of Plant Physiologists*, 7: 859-868.
- CRAWFORD, NM.; GLASS, A., 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in plant science*, 10 (3): 389-395.
- DÍEZ, MJ.; NUEZ, F., 2008. Tomato en: Handbook of Plant Breeding. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae. PROHENS, J.; NUEZ, F., (Eds). *Springer*. New York: 249-323.
- FAO, 2013. Food Agriculture Organization of the United Nations. FAO production yearbook.
- FAOSTAT, 2013. Statistical Database. <http://apps.fao.org>
- FORDE, BG., 1999. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica acta*, 1465: 219-235
- GENTY, B.; BRIANTAIS, JM.; BAKER, NR., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990(1): 87-92.
- GUPTA, N.; GUPTA, AN.; SINGH, NK.; KUMAR, A., 2011. Differential Expression of PBF Dof Transcription Factor in Different Tissues of Three Finger Millet Genotypes Different in Seed Protein Content and Color. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(1): 69-76.

- GUTIÉRREZ, RA.; LEJAY, LV.; DEAN, A.; CHIAROMONTE, F.; SHASHA, DE.; CORUZZI, GM., 2007. Qualitative network models and genome-wide expression data define carbón/nitrogen-responsive molecular machines in Arabidopsis. *Genome biology*, 8(1): R7.
- GODFRAY, HCJ.; BEDDINGTON, JR.; CRUTE, IR.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, JF.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, SM.; TOULMIN, C., 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327: 812-818.
- GUO, SW.; ZHOU, Y.; GAO, YX.; LI, Y.; SHEN, QR., 2007. New Insights into the Nitrogen Form Effect on Photosynthesis and Photorespiration. *Pedosphere*, 17(5): 610-610.
- HAGEMAN, RH.; HUCKLESBY, DP., 1971. [45] Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzimology*, 23 (Part A): 491.
- HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; SKRUMSAGER-MOLLER, I.; WHITE, P., 2012. Functions of Macronutrients en Marschner's mineral nutrition of higher plants. Marschner, P., (Ed). *Academic Press (Elsevier)*. USA: 135-189.
- HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H., 2002. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Physiologia Plantarum*, 115: 125-136.
- HOAGLAND, DR.; ARNOL, DI., 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultura Experimental Station*, 347.
- HORCHANI, F.; HAJRI, R.; ASCHI-SMIITI, S., 2010. Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth and nitrogen assimilation in tomato plants. *Journal Plant Nutrition*. Soil Science, 173: 610-617.
- KANT, S.; SENEWEERA, S.; RODIN, J.; MATERNE, M.m BURCH, D.; ROTHSTEIN, SJ.; SPANGENBERG, G., 2012. Improving yield potential in crops under elevated CO₂: interacting the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies. *Frontiers in Plant Science*, 3: 1-9.
- KURAI, T.; WAKAYAMA, M.; ABIKO, T.; YANAGISAWA, S.; AOKI, N.; OHSUGI, R., 2011. Introduction of the ZmDof1 gene into rice enhances carbón and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 826-837.
- LARUE, CT.; WEN, J.; WALKER, JC., 2009. A microRNA-transcription factor module regulates lateral organ size and patterning in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58: 450-463.
- LEWIS, CE.; NOCTOR, G.; CAUSTON, D.; FOYER, CH., 2000. Regulation of assimilate partitioning in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27(6): 507-519.
- LI, QY.; XU, XJ.; GU, HL.; GAO, HY.; ZHU, YY.; DONG, CX.; SHEN, QR., 2010. Effects of applying different nitrogen form on cherry tomato nitrogen metabolism during fruit development. *The Journal of Applied Ecology*, 21(9): 2335-41.
- LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; CARBAJOSA, JV., 2003. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology*, 3:17.

- LIN, W.; HAGEN, E.; FULCHER, A.; THOMAS, M.; CHENG, ZM., 2013. Overexpressing the ZmDof1 gene in *Populus* does not improve growth and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 113: 51-61.
- LIU, ZA.; YANG, JP.; YANG, ZC., 2012. Using a chlorophyll meter to estimate tea leaf chlorophyll and nitrogen contents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12 Vol.2: 339-348.
- LÓPEZ, DL.; LEYVA, MA.; ALATORRE, F.; HERRERA, L., 2013. Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *The International Journal of Developmental Biology*, 57: 595-610.
- LU, C.; ZHANG, J., 2000. Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. *Plant Science*, 151: 135-143.
- LU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Q.; LI, L.; KUANG, T., 2001. Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1423-1430.
- MAGALHAES, JR.; HUBER, DM., 1989. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. *Fertilizer Research*, 21: 1-6.
- MARSH, JT.; SULLIVAN, S.; HARTWELL, J.; NIMMO, HG., 2003. Structure and Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase Genes in Solanaceae. A Novel Gene Exhibits Alternative Splicing. *Plant Physiology*, 133: 2021-2028.
- MCCREADY, RM.; GUGGOLZ, .; SILVIERA, V.; OWENS, HS., 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*, 22: 1156.
- NOCTOR, G.; FOYER, CH., 2000. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *Journal of Experimental Botany*, 51: 347-356.
- NOGUERO, M.; ATIF, RM.; OCHATT, S.; THOMPSON, RD., 2013. The role of DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science*, 209: 32-45.
- NUNES, C.; PRIMAVESI, LF.; PATEL, MK.; MARTÍNEZ-BARAJAS, E.; POWERS, SJ.; SAGAR, R.; FEVEREIRO, PS.; DAVIS, BG.; MATTHEW, JP., 2013. Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 89-98.
- OLMSTEAD, R.; BOHS, L., 2007. A summary of Molecular Systematic Research in Solanaceae: 1982-2006. *Acta Horticulturae*, 745: 255-268.
- PAGOLA, M.; ORTIZ, R.; IRIGOYEN, I.; BUSTINCE, H.; BARRENECHEA, E.; APARICIO-TEJO, P.; LAMSFUS, C.; LASA, B., 2009. New method to assess barley nitrogen nutrition status based on image color analysis comparison with SPAD-502. *Computers and Electronics in Agriculture*, 65: 213-218.
- PAUL, MJ.; FOYER, CH., 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1383-1400.

- RIECHMANN, JL.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, CZ.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, J.; SAMAHA, RR.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, JZ.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, BK.; YU, GL., 2000. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science*, 209: 2015-2109.
- RODRÍGUEZ-MENDOZA, MA.; ALCÁNTAR-GONZÁLEZ, G.; AGUILAR-SANTELISES, A.; ETCHEVERS-BARRA, JD.; SANTIZÓ-RINCÓN, JA., 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra*, 16(2): 135-141.
- SHAW, LM.; MCLNTYRE, CL.; GRESSHOFF, PM.; XUE, GP., 2009. Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. *Functional and Integrative Genomics*, 9: 485-498.
- SHIU, SH.; SHIH, MC.; LI, WH., 2005. Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals. *Plant Physiology*, 139: 18-26.
- SINCLAIR, TR.; PURCELL, LC.; SELLER, CH., 2004. Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends in Plants*, 9 n° 2: 70-75.
- SIVAKUMAR, MVK.; STEFANSKI, R., 2006. Climate and land degradation- an overview. En: Climate and land degradation. Sivakumar, MVK.; Ndiangui, N. Pp. 105-135.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E., 2006. Asimilación de Nutrientes Minerales en Fisiología Vegetal. *Sinauer Associates* 10 (1): 485-528
- VARSHNEY, RK.; BANSAL, KC.; AGGARWAL, PK.; CRAUFURD, PQ., 2011. Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype? *Trends in Plant Science*, 16: 363-371.
- WANG, Y.; FU, B.; PAN, L.; CHEN, L.; FU, X.; LI, K., 2013. Overexpression of Arabidopsis Dof1, GS1 and GS2 Enhanced Nitrogen Assimilation in Transgenic Tobacco Grown under Low-Nitrogen Conditions. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31: 886-900.
- WANG, M.; SHEN, Q.; XU, G.; GUO, S., 2014. New insight the strategy for nitrogen metabolism in plant cells en *International Review of Cell and Molecular Biology*. JEON, KW., (Ed.). *Academic Press* (Elsevier), 310: 1-37.
- WU, JD.; WANG, D.; ROSEN, CJ.; BAUER, ME., 2007. Comparison of petiole nitrate concentrations, SPAD chlorophyll readings, and Quickbird satellite imaging in detecting nitrogen status of potato canopies. *Field Crop*, 101: 93-103.
- YANAGISAWA, S., 2004. Dof Domain Proteins: Plant-Specific Transcription Factors Associated with Diverse Phenomena Unique to Plants. *Plant Cell Physiology*, 45(4): 386-391.
- YANAGISAWA, S.; SCHMIDT, RJ., 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal*, 17(2): 209-214.
- YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T., 2004. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and

growth under low-nitrogen conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20): 7833-7838.

ZHENG, ZL., 2009. Carbon and nutrient balance signaling in plants. *Plant Signalling and Behavior*, 4-7: 584-591.

ZONG, Y.; SHANGGUAN, Z., 2014. Nitrogen Deficiency Limited the Improvement of Photosynthesis in Maize by Elevated CO₂ Under Drought. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(1): 73-81.

ANEXO I



CALENDARIO DEL INVERNADERO

En este anexo, se puede seguir día a día el transcurso de las plantas implicadas en el presente trabajo final de grado, desde la germinación de las semillas hasta el muestreo final que daba por concluido el experimento con las plantas de tomate.

Enero de 2014				
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
		1	2	3
6	7	8	9	10
13 Poner a germinar PROK3	14 Poner a germinar WT	15	16 Preparación soluciones de Stock. Preparación tratamientos	17
20 Traspaso de las semillas germinadas a los alveolos. Regar alveolos	21	22	23 Regar alveolos	24
27 Regar alveolos	28	29	30 Regar alveolos	31

Febrero de 2014				
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
3 Regar alveolos	4	5	6	7 Regar alveolos
10	11 Regar alveolos	12	13	14 Regar alveolos
17	18 Traspaso de las plantas a las macetas. Llevar a invernadero	19	20 Regado de plantas	21
24	25	26	27	28 Regado de plantas

Anexo I: Calendario del invernadero

Marzo de 2014				
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
3	4	5	6	7 Regado de plantas
10	11 Tratamiento contra Mosca Blanca y Tutta	12	13 Entutorado de plantas	14 Regado de plantas. Fluorescencia y SPAD
17 Regado de plantas (muy poco tratamiento)	18	19	20	21 Regado de plantas. Tratamiento Mosca Blanca
24	25 Regado de plantas	26	27 Fluorescencia y SPAD. Tratar Tutta. Preparación tratamientos	28 Regado de plantas

Abril de 2014				
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
	1 Fotosíntesis. Lavado con agua	2 Regado de plantas	3	4 Regado de plantas
7 Lavado con agua	8 Preparar MgSO ₄	9 Regado de plantas	10	11 Regado de plantas. Fluorescencia y SPAD
14	15 Regado de plantas	16	17	18
21	22	23 Regado de plantas	24	25
28 Lavado con agua	29	30 Preparación de tratamientos. Regado de plantas. SPAD		

Anexo I: Calendario del invernadero

Mayo de 2014				
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
			1	2 Regado de plantas. Fluorescencia
5 Lavado con agua	6 Regado de plantas	7	8 SPAD	9 Regado de plantas
12 Lavado con agua.	13 Regado de plantas	14 Fluorescencia y Fotosíntesis	15 Preparación de tratamientos	16 Regado de plantas. SPAD
19 Regado de plantas	20	21 MUESTREO FINAL.	22	23
26	27	28	29	30

ANEXO II



ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS

- ANOVA MULTIFACTORIAL FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS DEL PSII

Análisis de Varianza para Fluorescencia luz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	0,663255	5	0,132651	100,79	0,0000
B:Cód. genotipo	0,0157338	1	0,0157338	11,96	0,0006
C:Tratamiento	0,00103656	2	0,000518282	0,39	0,6747
INTERACCIONES					
AB	0,00337833	5	0,000675667	0,51	0,7662
AC	0,0266775	10	0,00266775	2,03	0,0295
BC	0,00211994	2	0,00105997	0,81	0,4476
RESIDUOS	0,523788	398	0,00131605		
TOTAL (CORREGIDO)	1,23687	423			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- ANOVA MULTIFACTORIAL CONTENIDO EN CLOROFILAS (SPAD)

Análisis de Varianza para SPAD - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	3565,06	5	713,012	43,78	0,0000
B:Cód. genotipo	1370,24	1	1370,24	84,14	0,0000
C:Tratamiento	1503,52	2	751,76	46,16	0,0000
INTERACCIONES					
AB	396,552	5	79,3105	4,87	0,0002
AC	385,059	10	38,5059	2,36	0,0099
BC	359,527	2	179,763	11,04	0,0000
RESIDUOS	7295,73	448	16,2851		
TOTAL (CORREGIDO)	14834,3	473			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS

o ANOVA MULTIFACTORIAL CONCENTRACIÓN SUBESTOMÁTICA (g_c)

Análisis de Varianza para Concentración subestomática - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	4003,16	1	4003,16	17,13	0,0001
B:Cód. genotipo	1131,66	1	1131,66	4,84	0,0301
C:Tratamiento	27,7131	2	13,8566	0,06	0,9425
INTERACCIONES					
AB	3,92522	1	3,92522	0,02	0,8971
AC	1288,66	2	644,332	2,76	0,0683
BC	122,753	2	61,3763	0,26	0,7696
RESIDUOS	23372,0	100	233,72		
TOTAL (CORREGIDO)	29882,6	109			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL CONDUCTIVIDAD (C_i)

Análisis de Varianza para Cond - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	0,837034	1	0,837034	49,51	0,0000
B:Cód. genotipo	0,00905179	1	0,00905179	0,54	0,4660
C:Tratamiento	0,127412	2	0,0637058	3,77	0,0264
INTERACCIONES					
AB	0,0124305	1	0,0124305	0,74	0,3932
AC	0,0552403	2	0,0276202	1,63	0,2004
BC	0,0581701	2	0,0290851	1,72	0,1842
RESIDUOS	1,69059	100	0,0169059		
TOTAL (CORREGIDO)	2,79628	109			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL FOTOSÍNTESIS NETA (A_N)

Análisis de Varianza para Fotosíntesis - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	159,893	1	159,893	143,80	0,0000
B:Cód. genotipo	58,4431	1	58,4431	52,56	0,0000
C:Tratamiento	43,3515	2	21,6758	19,49	0,0000
INTERACCIONES					
AB	4,13379	1	4,13379	3,72	0,0567
AC	30,3435	2	15,1718	13,64	0,0000
BC	1,96925	2	0,984623	0,89	0,4157
RESIDUOS	111,194	100	1,11194		
TOTAL (CORREGIDO)	395,87	109			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL TRANSPIRACIÓN (T)

Análisis de Varianza para Trmol - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	111,255	1	111,255	60,48	0,0000
B:Cód. genotipo	4,43471	1	4,43471	2,41	0,1237
C:Tratamiento	19,1293	2	9,56465	5,20	0,0071
INTERACCIONES					
AB	4,54528	1	4,54528	2,47	0,1191
AC	3,81359	2	1,90679	1,04	0,3584
BC	4,66013	2	2,33006	1,27	0,2862
RESIDUOS	183,944	100	1,83944		
TOTAL (CORREGIDO)	330,876	109			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACCTORIAL PÉRDIDA DE AGUA (WUE)

Análisis de Varianza para wue (An/E) - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. fecha	0,350169	1	0,350169	2,08	0,1526
B:Cód. genotipo	0,928319	1	0,928319	5,51	0,0209
C:Tratamiento	0,0613081	2	0,0306541	0,18	0,8340
INTERACCIONES					
AB	0,0530936	1	0,0530936	0,32	0,5759
AC	0,813993	2	0,406996	2,41	0,0946
BC	0,0962431	2	0,0481216	0,29	0,7522
RESIDUOS	16,8537	100	0,168537		
TOTAL (CORREGIDO)	19,1835	109			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- **BIOMASA**

○ ANOVA MULTIFACTORIAL PESO SECO TALLO

Análisis de Varianza para Ps Tallo - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cód. genotipo	518,165	1	518,165	35,79	0,0000
B:Tratamiento	349,327	2	174,663	12,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	45,8305	2	22,9153	1,58	0,2124
RESIDUOS	1056,98	73	14,4791		
TOTAL (CORREGIDO)	1959,17	78			

○ ANOVA MULTIFACTORIAL PESO SECO HOJAS

Análisis de Varianza para Ps Hojas - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	2149,59	2	1074,8	45,63	0,0000
B:Cód. genotipo	14,7222	1	14,7222	0,63	0,4317
INTERACCIONES					
AB	24,817	2	12,4085	0,53	0,5927
RESIDUOS	1719,33	73	23,5524		
TOTAL (CORREGIDO)	3903,84	78			

○ ANOVA MULTIFACTORIAL PESO SECO VÁSTAGO

Análisis de Varianza para Ps Vástago - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	4220,69	2	2110,34	37,27	0,0000
B: Cód. genotipo	707,57	1	707,57	12,50	0,0007
INTERACCIONES					
AB	138,081	2	69,0404	1,22	0,3014
RESIDUOS	4133,66	73	56,6254		
TOTAL (CORREGIDO)	9155,71	78			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL PESO SECO RAÍZ

Análisis de Varianza para Ps Raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	4,34235	2	2,17118	0,21	0,8088
B: Cód. genotipo	14,04	1	14,04	1,38	0,2446
INTERACCIONES					
AB	102,064	2	51,032	5,00	0,0092
RESIDUOS	744,836	73	10,2032		
TOTAL (CORREGIDO)	866,883	78			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL NÚMERO DE HOJAS

Análisis de Varianza para N° hojas - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	233,252	2	116,626	3,62	0,0318
B: Cód. genotipo	2,38978	1	2,38978	0,07	0,7862
INTERACCIONES					
AB	34,8585	2	17,4292	0,54	0,5848
RESIDUOS	2353,89	73	32,2451		
TOTAL (CORREGIDO)	2623,95	78			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL SUPERFICIE FOLIAR

Análisis de Varianza para Superficie foliar total - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	2,6884E8	2	1,3442E8	18,70	0,0000
B: Cód. genotipo	2,85808E6	1	2,85808E6	0,40	0,5305
INTERACCIONES					
AB	3,26299E6	2	1,63149E6	0,23	0,7976
RESIDUOS	4,81611E8	67	7,18823E6		
TOTAL (CORREGIDO)	7,75179E8	72			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- BIOMASA DEL FRUTO

○ ANOVA MULTIFACTORIAL PRODUCCIÓN

Análisis de Varianza para Producción (g/planta) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	101302,	2	50650,8	3,24	0,0449
B: Genotipo	445000,	1	445000,	28,50	0,0000
INTERACCIONES					
AB	29577,5	2	14788,8	0,95	0,3927
RESIDUOS	1,10865E6	71	15614,7		
TOTAL (CORREGIDO)	1,68815E6	76			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL TAMAÑO DEL FRUTO

Análisis de Varianza para Tamaño del Fruto - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Genotipo	2707,46	1	2707,46	21,94	0,0000
B: Tratamiento	425,444	2	212,722	1,72	0,1858
INTERACCIONES					
AB	56,512	2	28,256	0,23	0,7960
RESIDUOS	8762,65	71	123,418		
TOTAL (CORREGIDO)	11950,7	76			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

○ ANOVA MULTIFACTORIAL NÚMERO DE FRUTOS

Análisis de Varianza para N° frutos por planta - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	250,676	2	125,338	5,21	0,0076
B: Genotipo	57,0094	1	57,0094	2,37	0,1279
INTERACCIONES					
AB	47,0434	2	23,5217	0,98	0,3807
RESIDUOS	1754,55	73	24,0349		
TOTAL (CORREGIDO)	2103,52	78			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- ANOVA MULTIFACTORIAL AZÚCARES SOLUBLES

Análisis de Varianza para ug as/mg peso seco - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Genotipo	3953,09	1	3953,09	17,04	0,0014
B: Tratamiento	109,743	2	54,8713	0,24	0,7930
INTERACCIONES					
AB	516,156	2	258,078	1,11	0,3604
RESIDUOS	2783,89	12	231,99		
TOTAL (CORREGIDO)	7362,87	17			

- ANOVA MULTIFACTORIAL ALMIDÓN

Análisis de Varianza para ug alm/mg peso seco - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	36899,8	2	18449,9	160,30	0,0000
B: Genotipo	20731,8	1	20731,8	180,12	0,0000
INTERACCIONES					
AB	11032,0	2	5516,02	47,92	0,0001
RESIDUOS	805,683	7	115,098		
TOTAL (CORREGIDO)	68759,6	12			

- ANOVA MULTIFACTORIAL PROTEÍNAS SOLUBLES TOTALES

Análisis de Varianza para ug proteína/g peso fresco - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Genotipo	1,46984E8	1	1,46984E8	18,14	0,0001
B:Tratamiento	4,49666E7	2	2,24833E7	2,77	0,0744
INTERACCIONES					
AB	7,58336E6	2	3,79168E6	0,47	0,6297
RESIDUOS	3,24178E8	40	8,10445E6		
TOTAL (CORREGIDO)	5,09037E8	45			

- ANOVA MULTIFACTORIAL ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA NITRATO REDUCTASA

Análisis de Varianza para umolNO₂/gh - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Código genotipo	0,317268	1	0,317268	1,54	0,2297
B:Tratamiento	0,110886	2	0,0554431	0,27	0,7674
INTERACCIONES					
AB	0,101202	2	0,0506009	0,24	0,7851
RESIDUOS	4,13341	20	0,20667		
TOTAL (CORREGIDO)	4,70363	25			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- ANOVA MULTIFACTORIAL CONTENIDO EN CARBONO

Análisis de Varianza para Carbono - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Genotipo	435067,	1	435067,	0,92	0,3500
B:Tratamiento	866645,	2	433322,	0,92	0,4175
INTERACCIONES					
AB	862821,	2	431411,	0,92	0,4190
RESIDUOS	8,0069E6	17	470994,		
TOTAL (CORREGIDO)	1,02213E7	22			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- ANOVA MULTIFACTORIAL CONTENIDO EN NITRÓGENO

Análisis de Varianza para Nitrogeno - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	5,36026	2	2,68013	10,17	0,0012
B:Genotipo	0,322127	1	0,322127	1,22	0,2842
INTERACCIONES					
AB	0,127556	2	0,0637782	0,24	0,7877
RESIDUOS	4,47894	17	0,263467		
TOTAL (CORREGIDO)	10,5729	22			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- ANOVA MULTIFACTORIAL RATIO C/N

Análisis de Varianza para C/N - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	118,765	2	59,3824	10,90	0,0009
B:Genotipo	2,73904	1	2,73904	0,50	0,4879
INTERACCIONES					
AB	1,04609	2	0,523047	0,10	0,9089
RESIDUOS	92,5948	17	5,44675		
TOTAL (CORREGIDO)	216,305	22			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

- EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE CARBONO Y NITRÓGENO.

○ PEPC1

Tabla ANOVA para PEPC1 por Genotipo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,024025	1	0,024025	1,33	0,3687
Intra grupos	0,03625	2	0,018125		
Total (Corr.)	0,060275	3			

○ SnRK1

Tabla ANOVA para SnRK1 por Genotipo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,133225	1	0,133225	0,63	0,5108
Intra grupos	0,42345	2	0,211725		
Total (Corr.)	0,556675	3			

