



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Caracterització fotosintètica de plantes transgèniques en diferents versions de Rubisco

Guillem Gutiérrez Gili

Grau de Biologia

Any acadèmic 2012-13

DNI de l'alumne: 41539744L

Treball tutelat per Jeroni Galmés Galmés

Departament de Fisiologia Vegetal

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

*Aquaporina, Carboxilació, Fotosíntesi, Limonium,
Rubisco, Nicotiana tabacum, Transgènic, Xaperones,*

1. INTRODUCCIÓ

La modificació de l'arquitectura de les plantes ha conduït a un augment de la productivitat des de la primera revolució verda, moment en que la població humana es trobava en situació de creixement exponencial. En els darrers anys, la població mundial ha crescut de forma continuada fins a arribar als 7 mil milions d'habitants i aquesta tendència es preveu que es mantingui durant els pròxims 50 anys (FAO, 2011).

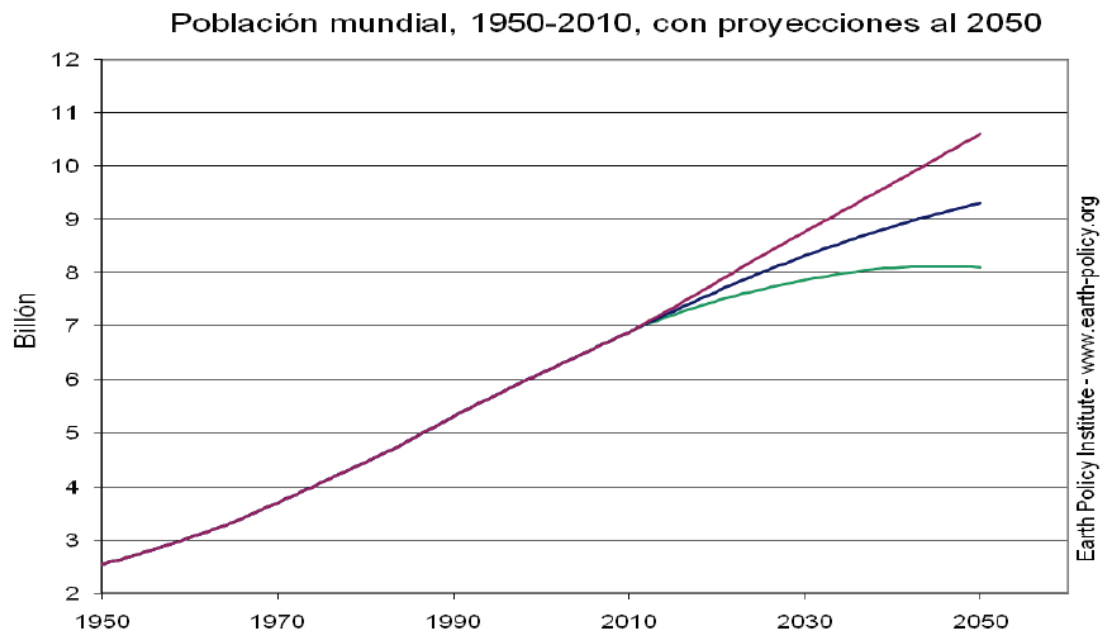


Figura 1. Evolució de la població humana entre el període 1950 i 2000. S'observen les projeccions futures entre el 2012 i 2050. Font: *Earth Policy Institute, 2012*

Al ritme de creixement actual de la població, es produeix un augment de la demanda d'aliments per a poder combatre la fam, la qual cosa implica la necessitat d'incrementar la producció mundial d'aliments. Les projeccions sobre la demanda de cereals indiquen que el 2030 la demanda d'aquests incrementarà en 1000 milions de tonelades, tal com mostra la gràfica següent:

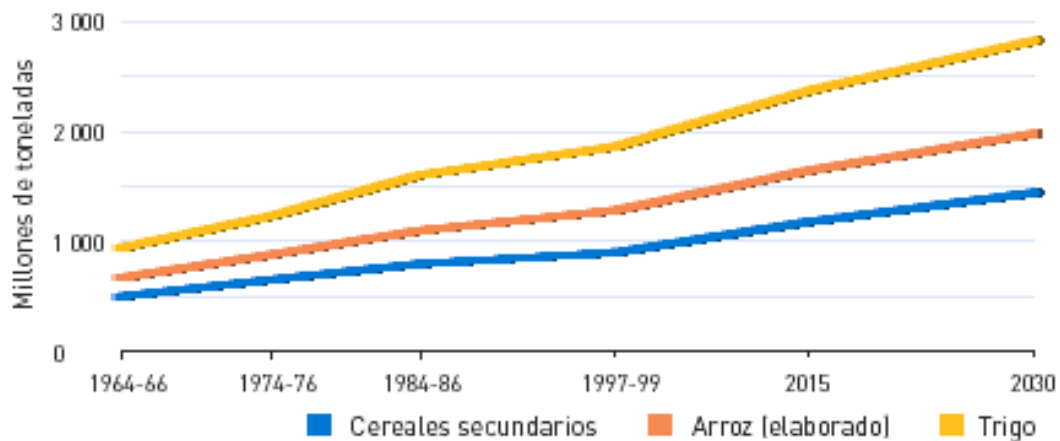


Figura 2. Evolució de la demanda de cereals (1965-2030). Font: *FAO,2011*

No obstant, la producció anual comença a mostrar signes de canvi de tendència cap a la saturació, de manera que el 2030 la producció anual s'espera que es redueixi en un 1,2 % i per tant els índex de productivitat no seràn suficients per poder satisfer la demanda..

Per aquest motiu i sabent que l'expansió de les terres de cultiu només representaran el 20% de l'increment de la producció i el 80 % restant s'espera que provingui de les millores del rendiment de les plantes (*FAO, 2011*), es necessari que la fisiologia vegetal avanci en el camp de millora de la productivitat dels cultius.

En aquest punt la fotosíntesi, que representa la base en la producció, esdevé un paràmetre que no ha sigut quasi modificat des dels inicis de la millora dels cultius (*Long i Ort, 2010*), i per tant, esdevé un punt a explorar per a augmentar la productivitat i l'eficiència en l'ús d'aigua.

Rubisco (ribulosa 1,5 bifosfat oxigenasa/carboxilasa)

El procés fotosintètic es troba catalitzat per l'enzim ribulosa 1,5 bifosfat oxigenasa/carboxilasa (Rubisco), la proteïna majoritària del planeta i que representa l'entrada de carboni inorgànic a la biosfera. Aquesta es compon de 8 subunitats grans regulades pel genoma cloroplàstic, depenent de la llum i 8 subunitats petites (SSU) regulades pel genoma nuclear. En quant a la seva activitat, la Rubisco presenta una funció doble, carboxilació i oxigenació. Degut a aquest motiu, i amb un factor específic ($S_{c/o}$) baix, la Rubisco esdevé un enzim poc eficient en relació amb el màxim funcional teòric, presentant una afinitat per l'O₂ 27 vegades superior a l'afinitat pel CO₂ (K_c aprox. 11 μ M, en contrast amb els 300 μ M de la K_o). Aquest factor, juntament amb la oferta de CO₂ per part la planta representen els principals punts limitants de la carboxilació i per tant afecta a la taxa d'assimilació dels els cultius, i en definitiva repercuteix sobre la producció. Actualment, sabem que la Rubisco és un enzim ineficient, per tant, coneixent les limitacions de l'enzim i optimitzant el seu funcionament es podrà millorar la productivitat.

Possibilitats de millora

Les possibilitats de millora de la capacitat fotosintètica passen, entre d'altres, per una millora de les propietats catalítiques de la Rubisco, la proteïna majoritària i que representa l'entrada de C a la biosfera. Aquesta millora passa per augmentar la $S_{c/o}$, augmentar l'eficiència en la carboxilació (k_c^{cat}/k_c), incrementar el flux a través del cicle de Calvin en condicions en les que la assimilació de la CO₂ està limitada per la regeneració de la RuBP, introduir el mecanisme C₄ en plantes C₃, reduir la resistència del mesòfil foliar per augmentar la [CO₂] en el cloroplast, augmentar la presència de canals de CO₂ (AQPs) i re assimilar el CO₂ alliberat en el cloroplast. No obstant, el present article es centra en la modificació de dos punts clau en la ruta de fixació del CO₂ a partir de diferents expressions d'AQP1 i Rubisco.

2. OBJECTIUS

2.1. Objectiu general

- Millora fotosintètica de plantes mitjançant la modificació genètica en l'expressió de 2 gens clau en el procés fotosintètic: Rubisco i Aquaporines.

2.2. Objectius específics




- Determinar com afecta l'expressió d'aquaporines i Rubisco sobre clorofil·les, TSP i biomassa
- Determinar els factors que limiten l'increment de biomassa.

3. MATERIAL I MÈTODES

Material Vegetal

La planta tabaquera (*Nicotiana tabacum*) és la primera planta transgènica (Zambryski et al., 1983) i ha esdevingut un organisme model dins la fisiologia vegetal pel coneixement del seu genoma, per la facilitat de transformació genètica, i creixement in vitro, per les seves característiques fisiològiques com el seu ràpid creixement, cicle de vida ràpid, i morfològiques, per tenir unes fulles grans que faciliten el mostreig. L'obtenció de les línies de cultiu a estudiar es va dur a terme creuant sexualment les línies mare Ma-17 i SSU2 (Small Subunit) prèviament modificades amb tecnologia antisense per a expressar menys aquaporines (AQPs) i Rubisco respectivament. Del resultat del creuament sexual es van obtenir 11 línies de les quals es van seleccionar les línies més heterogènies quant a l'expressió dels gens de Rubisco i AQPs. De les 11 inicials, es va reduir el nombre de línies a estudiar a 5 (línies 1,4,7,9,11) de la F₁ més les dues parentals (Ma-17 i SSU2), eliminant les línies amb una expressió molt similar dels dos gens especificats. Es van classificar les línies descendents (F₁) en funció de les 2 variables a expressar (gen de Rubisco i aquaporines) i es van subclassificar en funció del nivell d'expressió (Alt, Intermedi, Baix). Les línies amb una alta expressió de rubisco (línies 4, 7 i 11), intermèdia (línia 1, Ma-17) i baixa (9 i SSU2) i les línies amb una alta expressió de AQPs (línia 9), intermèdia (línies 1, 4 i SSU2) i baixa (línies 7, 11, Ma-17)

Nivell d'expressió genètica:

- Alt 
- Intermedi 
- Baix 

No. Línia	SSU	AQP1
1	Intermedi	Intermedi
4	Alt	Intermedi
7	Alt	Baix
9	Baix	Alt
11	Alt	Baix
MA17	Intermedi	Baix
SSU2	Baix	Intermedi

Figura 2. Nivells d'expressió dels gens SSU (Small Sub Unit) i AQP1 (aquaporines) segons cada línia de cultiu.

3.1. Condicions de cultiu

Les plantes de tabac (*Nicotiana tabacum*) van ser germinades en planters d'alveol baix condicions controlades de temperatura (25°C), humitat relativa aproximada del 50% i un fotoperíode de 14 hores de llum i 10 hores d'obscuritat amb una intensitat de llum de (PPFD) de 500-600 μmols fotons·m⁻²·s⁻¹. Un cop germinades es van escollir les plantes més homogènies per a cada línia. Llavors es van trasplantar les plàntules en cossiols de 3,5 L amb un substrat comercial i perlita en una proporció de 70:30 (perlita:substrat). El creixement de les plantes es va realitzar a la cambra de creixement amb les condicions citades anteriorment. Les plantes van ser regades amb una solució nutritiva hogland al 50 % amb una freqüència d'1 cop a la setmana durant l'etapa de plàntula, 2 cops a la setmana quan les plantes eren de tamany mitjà i 3 cops a la setmana durant l'etapa adulta.

3.2. Mostreig

Biomassa

Per a determinar la biomassa de les plantes es van fraccionar les plantes en fulles, tiges i arrels el dia de la floració. Les fulles es separaven tallant el pecíol, i les arrels tallant al punt que separa la part emergida i la part enterrada. Després de separar les fraccions de fulles i tiges es van pesar per a obtenir el pes fresc, exceptuant les arrels que per obtenir el pes fresc es van netejar amb aigua per eliminar restes de substrat i perlita. Posteriorment, per a obtenir el pes sec, es van posar les mostres a l'estufa ventilada a 60°C fins a pes constant.

Per a determinar la LMA (Biomassa per àrea foliar) en (g/m^2) es va calcular d'acord a:

$$\text{LMA} = \frac{\text{Biomassa}}{\text{Àrea}} = \text{—————}$$

Extracció i quantificació de TSP foliar i pigments fotosintètics

Per l'anàlisi bioquímic 2 discs de $0,5 \text{ cm}^2$ la part central de la fulla de cada planta obtenint un total de 35 mostres provinents de les 7 línies i 5 rèpliques de cada línia de cultiu. Les mostres van ser agafades i posades ràpidament en nitrogen líquid per ésser congelades i facilitar la ruptura de les cèl·lules amb el morter i l'extracció de la proteïna soluble. El morter permet rompre les membranes i alliberar el contingut del citosol i dels orgànuls, alliberant les proteïnes majoritàries com la Rubisco i clorofil·les. Posteriorment es suspèn la mostra amb un tampó d'extracció (50mM EPPS-NaOH pH 8.0 + 1 mM EDTA, 50 μl $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ i 50 μl DTT)

Per a la quantificació de TSP es va utilitzar el mètode Bradford (*Bradford MM, 1976*). Es van aïllar 2 μl de les mostres de les línies de cultiu prèviament congelades i re suspeses en un eppendorf. Posteriorment s'hi van afegir 500 μl d'aigua i 500 μl de reactiu de Bradford a cada eppendorf. A continuació es va esperar 10 minuts per a que la reacció en la qual el colorant Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA) en contacte amb aminoàcids bàsics (especialmente arginina) i aromàtics provocàs un canvi d'absorbància màxima i de coloració, detectable a 595 nm. Finalment les mostres van ser passades a cubetes i la seva absorbància va ser mesurada amb un espectofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm. Aquest procés es va realitzar per duplicat per tenir una major fiabilitat estadística. Per a obtenir la concentració (mg/mL) a partir de l'absorbància es va realitzar una recta patró per dia de mostreig:

$$y = m \cdot x + n$$

A partir de la recta patró es va obtenir el valor "m" i es va aplicar l'equació per a obtenir la concentració:

$$[\text{TSP}] = \frac{\text{Absorbància} - n}{m} = \text{—————}$$

Per a la quantificació de clorofil·les es van aïllar 200 μl de les mostres prèviament congelades i es van suspendre amb 800 μl d'acetona freda. A continuació es van deixar durant 1 h a 4°C en condicions d'obscuritat. Passat el període de repòs es van centrifugar (Fresco 21, Thermo Fisher Scientific) a 12000 rpm a 4°C i es va abocar el sobrenedant a les cubetes per ser llegides a l'espectofotòmetre (Life Science UV/Vis Spectrophotometer DU730, Beckman Coulter) a 647 nm (clorofil·la a), 664 nm (clorofil·la b) i 750 nm (clorofil·la total) calibrant amb un blanc compost de 200 μl d'aigua destil·lada + 800 μl d'acetona. La concentració de clorofil·la dels extractes de fulles va ser calculada d'acord amb el mètode Els resultats de l'absorbància van ser transformats a concentració (mg/mL) d'acord amb el mètode *Porra*,

Thompson and Kriedemann, 1989 incloent les modificacions realitzades a Page, Griffiths and Buchanan-Wollaston, 2001:

$$\text{Clorofil·la a} = 12,25 \cdot \text{ABS}_{664} - 2,55 \cdot \text{ABS}_{647}$$

$$\text{Clorofil·la b} = 20,31 \cdot \text{ABS}_{647} - 4,91 \cdot \text{ABS}_{664}$$

$$\text{Clorofil·la total} = \text{clorofil·la a} + \text{clorofil·la b}$$

Quantificació de l'expressió gènica

Es van recollir dos discs de fulla ($3,2 \text{ cm}^2$) de tres repliques de cada línia (21 mostres) per a la quantificació de l'expressió gènica. Es van guardar les mostres congelades en N_2 líquid i posteriorment a -80°C fins a ser analitzades.

Es va quantificar l'expressió d'ARN missatger (ARNm) corresponent a la subunitat petita de la Rubisco (SSU) i a la d'aquaporina (AQP1) per a determinar el grau d'expressió d'ambdues proteïnes. La quantificació del grau d'expressió de SSU i AQP1 es va fer mitjançant un procés de semi-quantificació de l'ARNm existent per a cada proteïna, basat amb el mètode d'Albert *et al* (2006).

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic dels resultats es va realitzar mitjançant el software Statistica versió 6.0 (Statistica v6.0, 2001, Statsoft) mitjançant l'anàlisi de les variàncies d'una sola variable. Els paràmetres considerats per a l'anàlisi inclouen la clorofil·la a, clorofil·la b, clorofil·la total, proteïna total soluble, activació de la Rubisco, concentració de la Rubisco, biomassa ($p < 0,1$) i la relació entre la concentració de Rubisco i el percentatge de TSP. En tots els casos es va utilitzar l'ANOVA per determinar l'existència de diferències significatives entre els resultats, mesurats amb el test de Duncan ($p < 0,05$).

4. RESULTATS

Biomassa

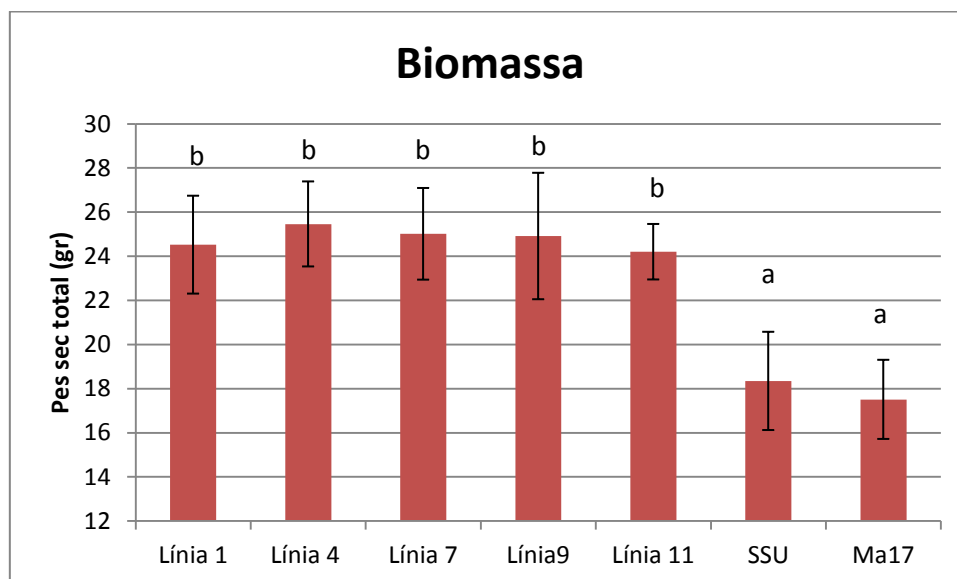


Figura 3. Biomassa total (gr) en cada una de les línies de cultiu. Els valors representen les mitjanes \pm l'error estàndard de les cinc rèpliques de cada línia de cultiu

Clorofil·la

En resposta a la concentració de clorofil·la foliar total, s'observa una menor concentració de clorofil·les totals en la línia SSU i una major concentració en la línia Ma17. S'observen diferències significatives ($p < 0,05$) entre els grups L1, L9, SSU respecte Ma17 i entre L4, L7, L11 respecte SSU. Les línies 1, 4, 7, 9 i 11 mostren valors de concentració de clorofil·la intermedis entre els parentals (SSU i Ma17).

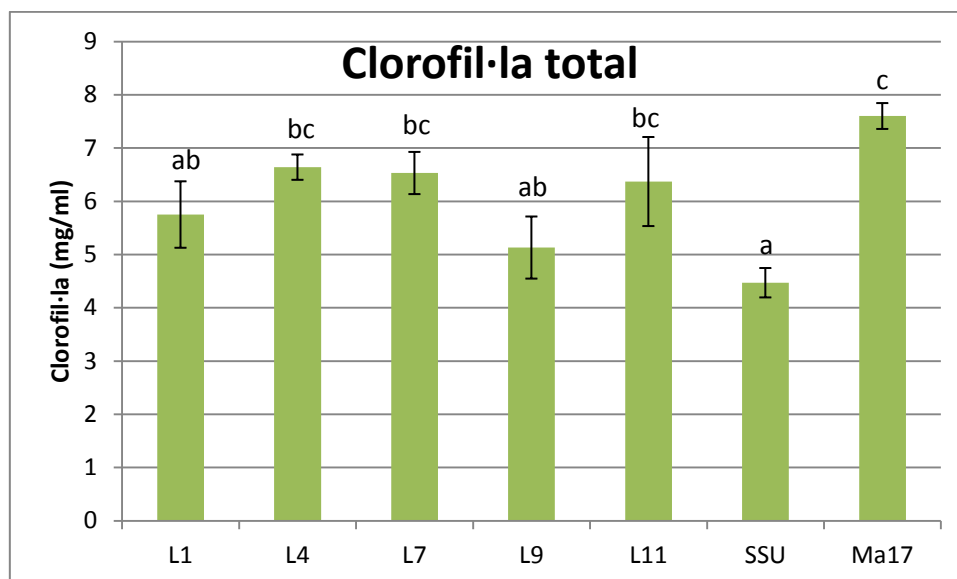


Figura 4. Concentració de clorofil·la total (mg/mL) en cada una de les línies de cultiu. Els valors representen les mitjanes \pm l'error estàndard de les cinc rèpliques de cada línia de cultiu.

Si ens centrem amb les línies i la relació existent amb el tipus de clorofil·la, s'observa igualtat entre les línies quant a clorofil·la a i clorofil·la total, no obstant si analitzem detingudament la clorofil·la b, només observem diferències significatives entre SSU amb L4 i entre SSU amb Ma17.

Els resultats estadístics demostren diferències significatives entre les línies parentals SSU en relació amb L4, L7, L11 i Ma-17, així com entre les línies Ma-17 i L1, L9 i SSU quant a la clorofil·la total. Si observem la descendència dels creuament (F_1) no s'observen diferències significatives.

	L1	L4	L7	L9	L11	SSU	Ma-17
Chl a (mg/ml)	4,45 \pm 0,47 ^{ab}	5,08 \pm 0,19 ^{bc}	5,02 \pm 0,29 ^{bc}	3,96 \pm 0,43 ^{ab}	4,94 \pm 0,63 ^{bc}	3,40 \pm 0,21 ^a	6,00 \pm 0,18 ^c
Chl b (mg/ml)	1,29 \pm 0,17 ^{ab}	1,56 \pm 0,05 ^b	1,50 \pm 0,11 ^{ab}	1,17 \pm 0,15 ^{ab}	1,43 \pm 0,21 ^{ab}	1,08 \pm 0,07 ^a	1,60 \pm 0,07 ^b
Chl total (mg/ml)	5,75 \pm 0,62 ^{ab}	6,64 \pm 0,24 ^{bc}	6,53 \pm 0,40 ^{bc}	5,13 \pm 0,58 ^{ab}	6,37 \pm 0,84 ^{bc}	4,47 \pm 0,28 ^a	7,6 \pm 0,24 ^c

Taula 1. Concentració de clorofil·la a (Chl a), clorofil·la b (Chl b) i clorofil·la total (Chl

total) a cada una de les línies de cultiu (L1, L4, L7, L9, L11, SSU, Ma-17) . Els valors representen les mitjanes \pm l'error estàndard de les cinc rèpliques de cada línia de cultiu.

Proteïna total soluble (TSP)

Respecte la quantitat total de proteïna soluble foliar (TSP), l'ANOVA va mostrar diferències significatives ($p < 0,05$) entre L4, L9 i Ma17 i valors intermedis entre L4 i L9 en la resta de línies. Els valors de concentració més elevats de TSP es troben en Ma17, mentre que L9 presenta menor concentració, juntament amb L1, L7, L11 i SSU.

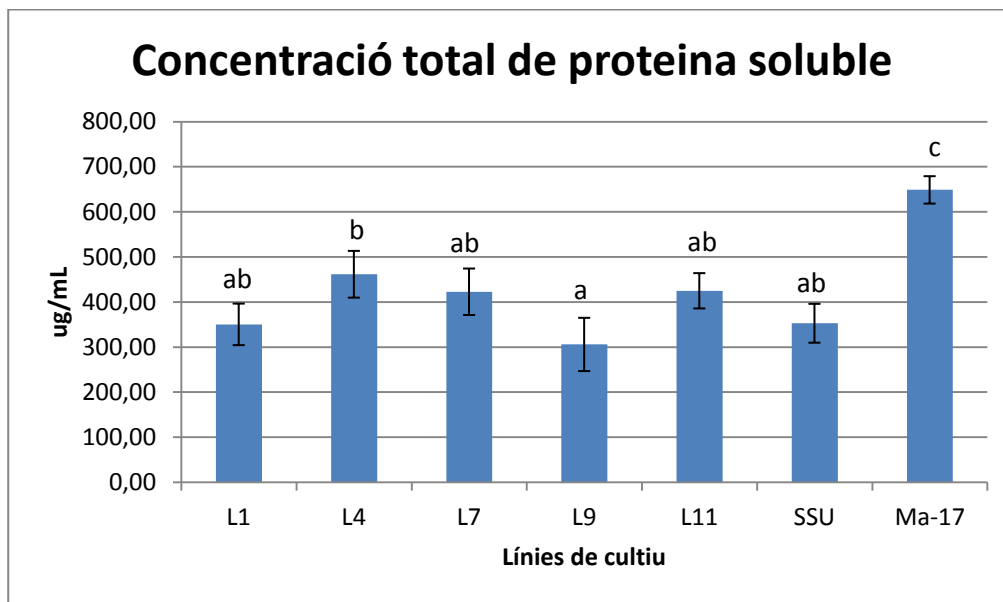


Figura 5. Concentració de proteïna total soluble foliar (mg/mL) en relació amb les línies de cultiu. . Valors expressats amb la mitjana (barres) i amb l'error estàndard.

Concentració de Rubisco

La concentració de Rubisco ens mostra la quantitat de proteïna acoblada formant part de l'enzim, estigui o no actiu, i per tant funcional. Els resultats de la Figura 6 mostren tres grups entre els quals existeixen diferències significatives ($p < 0,05$). En el grup amb valors més baixos hi trobem les línies L9 i SSU. Els valors més elevats de concentració de Rubisco els presenta la línia Ma17, amb valors molt superiors a la resta de línies. Les línies L1, L4, L7 i L11 es troba amb valor intermedis entre els dos grups anteriors.

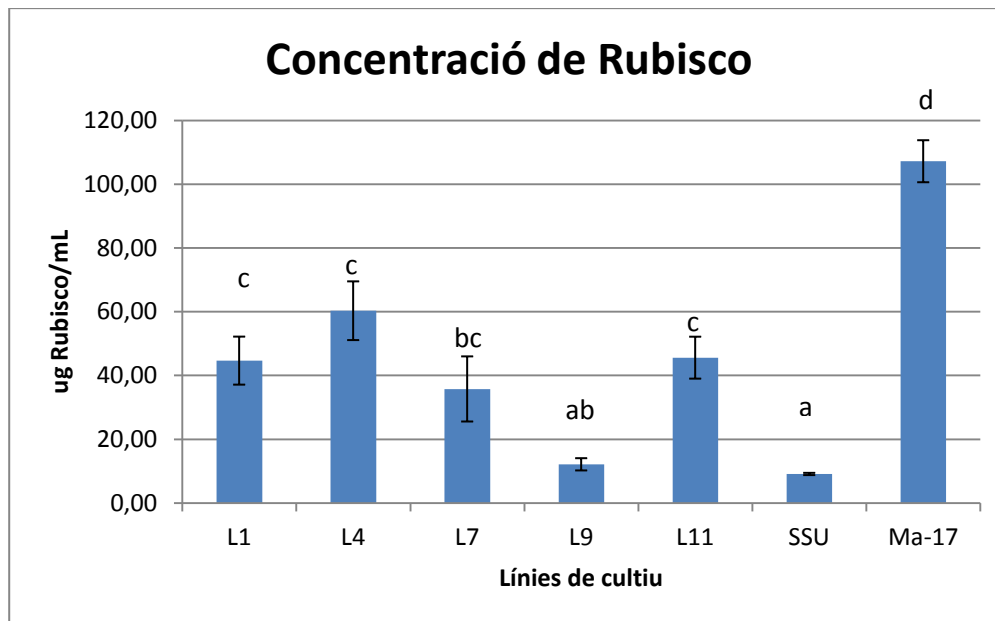


Figura 6. Concentració de Rubisco ($\mu\text{g/mL}$) a cada una de les línies de cultiu. Valors expressats amb la mitjana (barres) i amb l'error estàndard.

Activació de Rubisco

El percentatge d'activació de la Rubisco representa la fracció de la proteïna respecte el total que es capaç de fixar directament el CO_2 de l'estroma dels cloroplasts. A la Figura 3 s'observa aquest percentatge en relació a les línies estudiades, on s'il·lustren uns resultats molt similars als de la Figura 1 (TSP).

Pel que fa als resultats del percentatge d'activació de la Rubisco, l'ANOVA mostra diferències significatives ($p < 0,05$) entre L4, L7, L11 i Ma17 amb la línia parental SSU. Les línies L1 i L7 mostren valors intermedis entre els grups anteriors.

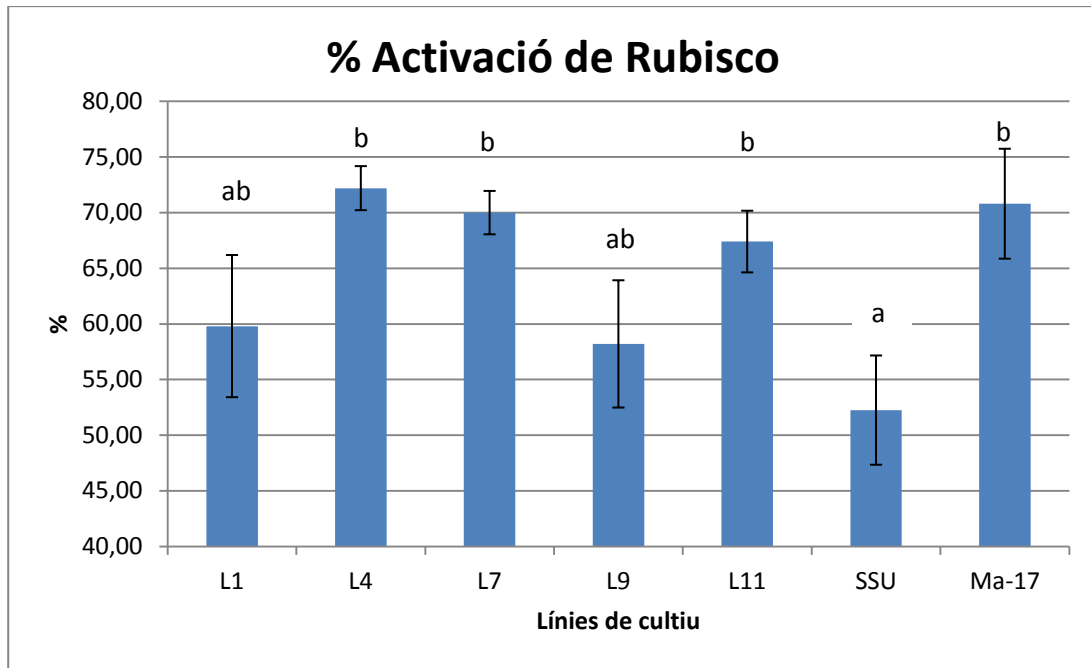


Figura 7. Percentatge d'activació de la Rubisco a cada una de les línies de cultiu. Valors expressats amb la mitjana (barres) i amb l'error estàndard.

5. DISCUSIÓ

Actualment, l'augment de la productivitat (producció/àrea) passa necessàriament per un augment de la capacitat fotosintètica de les plantes i aquesta conté dues vies claus: per una banda, el CO₂ representa el principal substrat de la Rubisco amb el qual es duu a terme el procés de carboxilació, mitjançant el qual es fixa el carboni inorgànic i passa a formar part de cadenes orgàniques.

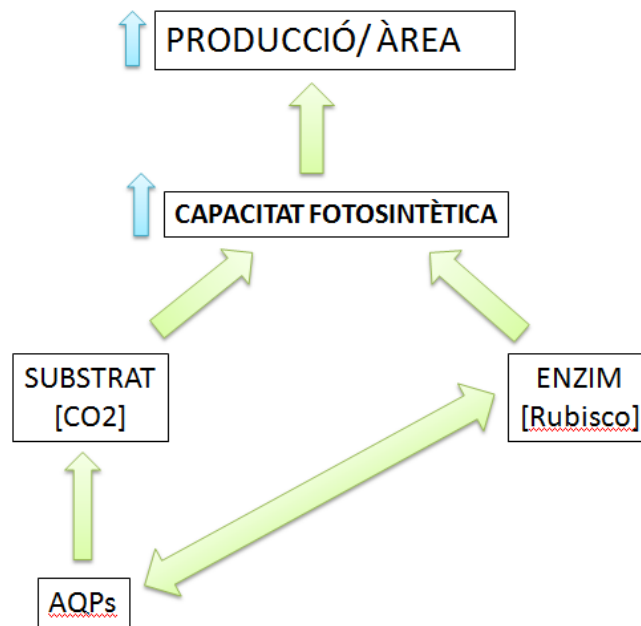


Figura 8 .En aquesta figura es mostra esquemàticament 2 vies principals de regulació de la capacitat fotosintètica de les plantes.

Un menor aport de CO₂ a l'estroma, produeix una ratio menor de CO₂ respecte O₂, per tant augmenta l'activitat oxigenasa de la Rubisco, produint la fotorespiració i limitant així la fotosíntesi. Un aport extra de CO₂ al centre actiu de la Rubisco reduiria considerablement l'activitat oxigenasa de la Rubisco i augmentaria la seva eficiència. Les aquaporines són les responsables de facilitar la difusió del CO₂ i facilitar el substrat a la rubisco, per tant, aquest aport extra de CO₂ necessari per una major carboxilació de la Rubisco es pot dur a terme mitjançant la modificació dels canals AQP1, millorant així la gm (conductància del mesòfil) (Flexas *et al.*, 2006).

L'activitat de la Rubisco es troba regulada per la llum. L'enzim es troba a l'estroma cel·lular on es produeix un augment del pH que activa la RuDP carboxilasa, produït per un transport electrònic fotosintètic (ratio ATP/ADP) activat per la llum. Aquest transport determina l'entrada de protons a l'interior dels tilacoïdes, a la vegada que va acompanyat d'una sortida de Mg²⁺. Per a que la Rubisco s'activi, s'ha de produir una carbamilació d'un residu de l'aminoàcid lisina al centre actiu de de l'enzim. Aquesta carbamilació està catalitzada per la Rubisco activasa, que depèn de les concentracions de CO₂ i ATP. L'activasa s'uneix a la rubisco i provoca canvis a una lisina específica, la qual cosa origina un carbamat de càrrega negativa on s'hi uneix un catió Mg²⁺ per finalitzar l'activació (Lincoln Taiz *et al.*, 2002).

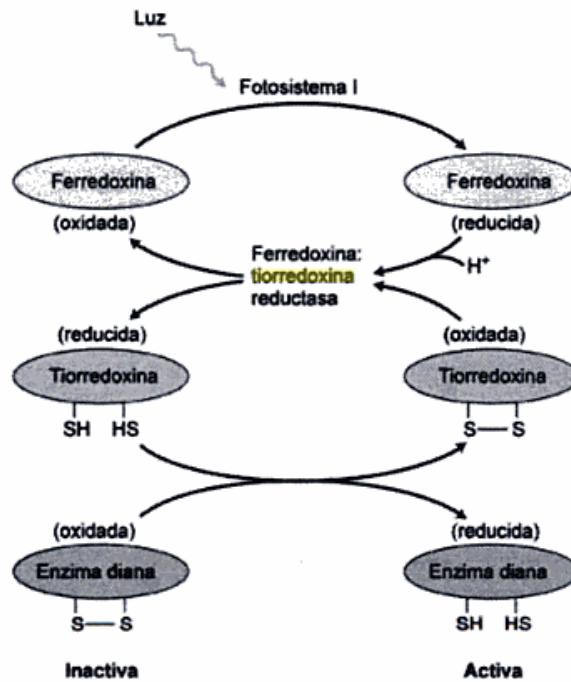


Figura 9. Esquema del procés d'activació de la Rubisco. Font: (Lincoln Taiz et al., 2002).

Un indicador general de l'estat proteic de les plantes es el TSP (proteïna total soluble) on s'hi troben integrades les proteïnes no insertades en les membranes cel·lulars. Dintre d'aquest indicador s'hi troba la Rubisco, proteïna majoritària de la biosfera.

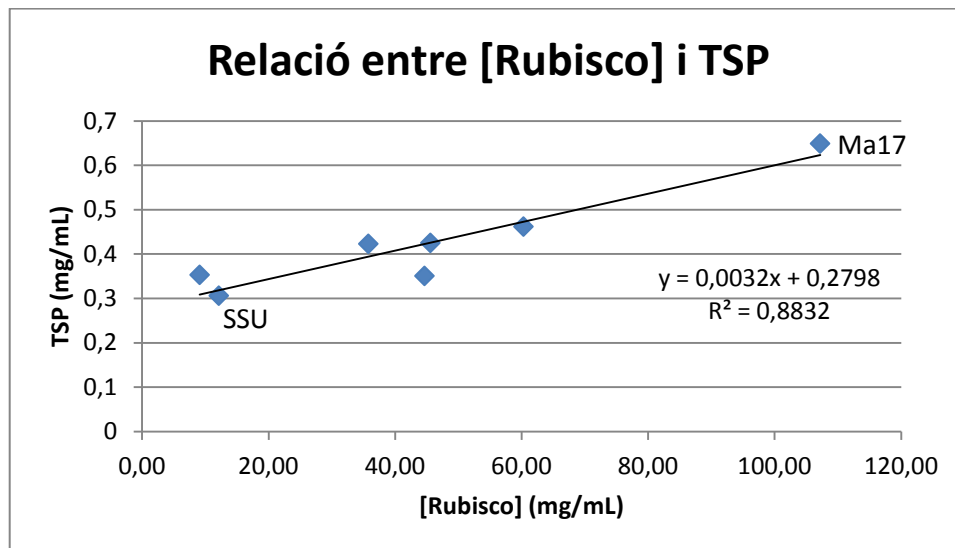


Figura 10. Correlació ($R^2=0,8832$) entre la proteïna total soluble (TSP) i la concentració de Rubisco (mg/mL) mesurada en les diferents línies de cultiu.

La figura 10 ens indica com la modificació de l'expressió de Rubisco, afecta la TSP, ja que la major part de la TSP es Rubisco, d'acord amb la taula següent:

	% Rubisco
L1	13
L4	13
L7	8
L9	4
L11	11
SSU	3
Ma-17	17

Taula 2. Percentatge de Rubisco respecte el total de proteïna total soluble en cada una de les línies de cultiu.

Per tant, per una banda la línia Ma17 (parental amb una expressió intermitja de Rubisco) és la línia amb major percentatge de Rubisco respecte la proteïna total soluble. Per altre banda, la línia SSU (parental amb una expressió reduïda de Rubisco) manifesta el valor més baix de Rubisco respecte el TSP amb només un 3%, en comparació amb el 17% de la Ma17. És interessant observar una gran variabilitat de valors intermedis en la descendència entre els dos parentals, la qual cosa indica diferents nivells d'expressió de Rubisco a la dels parentals i una altre ruta que regula l'aport de Rubisco, les AQP.

A continuació, la figura 11 mostra com afecta la modificació genètica de l'expressió de la Rubisco al percentatge de Rubisco respecte el TSP i la concentració de l'enzim.

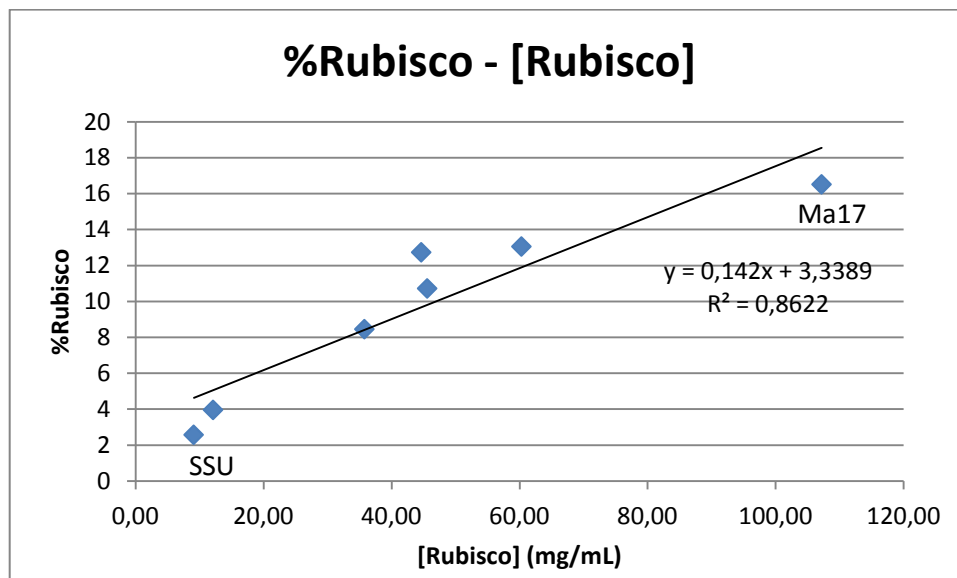


Figura 11. Correlació ($R^2=0,8622$) entre el percentatge de Rubisco respecte el total de TSP i la concentració de Rubisco mesurada en les diferents línies de cultiu.

La correlació és linealment positiva i per tant, confirma que degut a l'alt percentatge de Rubisco respecte el total de TSP, si disminueix el percentatge de Rubisco provocat per una limitació genètica, la concentració de Rubisco es veu reduïda, i per tant, la capacitat carboxilasa de la

planta.

No obstant, per que es produeixi la carboxilació per part de l'enzim, aquest s'ha de trobar en la seva forma activa.

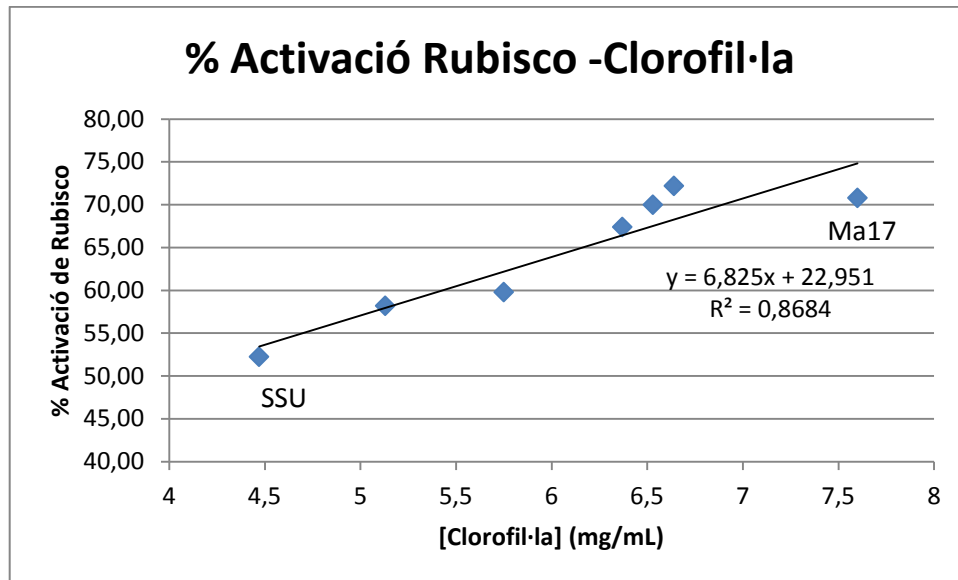


Figura 12. Correlació ($R^2=0,8684$) entre el percentatge d'activació de la Rubisco i la concentració de clorofil·la mesurades a les diferents línies de cultius.

Tal com s'observa a la figura 12, la quantitat de Rubisco activa depèn de la concentració de clorofil·les presents als cloroplasts a la vegada que de factors com la disponibilitat de CO_2 , on hi intervenen les AQP's, i el nivell d'expressió dels gens de Rubisco. A més, l'activació de la Rubisco depèn per una banda de la ratio $[Rubisco\ Activasa]/[Rubisco]$ i per altre de l'activació de l'enzim Rubisco activasa.

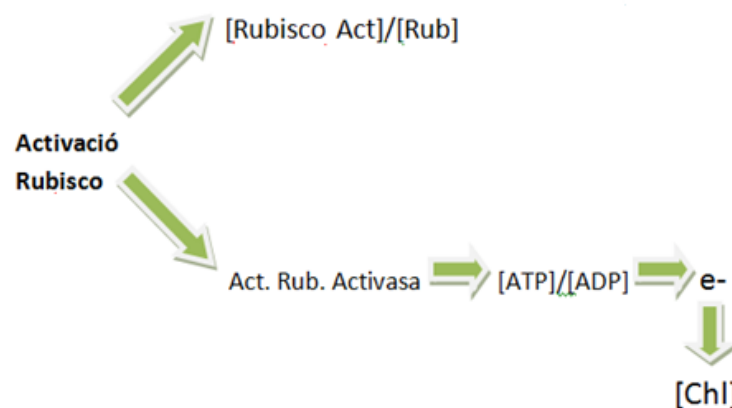


Figura 13. Esquema de les 2 vies principals que regulen l'activació de la Rubisco.

Per que es pugui dur a terme l'activació de la Rubisco Activasa és necessari un moviment d'electrons que produeixi un augment de $[ATP]/[ADP]$. Aquest moviment electrònic ve donat

per la cadena de transport electrònic, que té origen al PSII, localitzat a les clorofil·les, per tant, a major clorofil·la, major activació de la Rubisco (Figura 13)

Si s'observa la relació entre les clorofil·les i la Rubisco en les línies de cultiu amb diferents expressions de AQPs i Rubisco (Figura 14) es mantenen els resultats esperats i s'observa que les línies amb una expressió limitada de la SSU tenen una concentració de Rubisco menor, a la vegada que també tenen una concentració menor de clorofil·la.

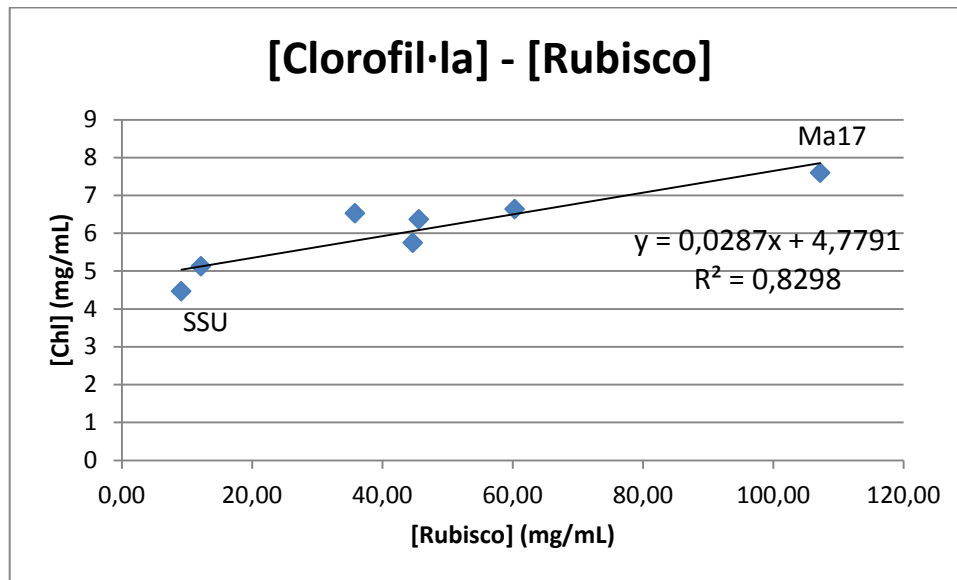


Figura 14. Correlació ($R^2=0,8622$) entre el percentatge de Rubisco respecte el total de TSP i la concentració de Rubisco mesurada en les diferents línies de cultiu.

Aquest fet es deu a un mecanisme compensatori ja que amb una menor disponibilitat de l'enzim, es necessita poca Rubisco activasa per activar tota la rubisco, per tant, la planta necessitarà poca concentració de clorofil·la per fer el mateix treball.

Un punt molt important a tenir en compte en els processos de regulació metabòlica (Figura 8) és la capacitat homeostàtica de la planta, de manera que la planta respon bloquejant o estimulament determinades vies per assolir l'equilibri. Seguint aquest argument, en condicions de baixa expressió d'AQP1 (L7, L11 i Ma17) es produeix un augment de la concentració de Rubisco per intentar captar tot el CO_2 que arriba a l'estroma, tal com mostra la Figura 6. A la vegada, una disminució de la concentració de clorofil·les, determina una menor activació de l'enzim i en conseqüència una major expressió d'AQPs per pal·liar els efectes d'una baixa disponibilitat de substrat (CO_2).

A la Taula 3 es posa de manifest la relació entre la biomassa, relacionada directament amb la productivitat dels cultius front els nivells d'expressió d'AQPs i Rubisco. El més característic de la taula és que les línies parentals mostren valors més baixos que tots els híbrids de la F1. A més, els valors més alts coincideixen amb les línies que presenten un alt nivell d'expressió en alguns dels gens modificats, tot i que els valors no mostren diferències significatives a $p < 0,05$.

	Ma17	SSU	L11	L1	L9	L7	L4
Biomassa (g)	17,508 ^a	18,345 ^a	24,2 ^a	24,52 ^a	24,912 ^b	25,012 ^b	25,46 ^b
Nivell d'expressió AQPs	B	I	B	I	A	B	I
Nivel expressió Rubisco	I	B	A	I	B	A	A

Taula 3. Relació entre el nivell d'expressió d'aquaporines i Rubisco: : A (alt), I (Intermedi), B (Baix) amb la Biomassa total (g)

Si es representa separadament la relació entre biomassa total i l'expressió relativa de SSU (Figura 15), i la biomassa amb l'expressió relativa d'AQP1 (Figura 16) no se'n pot extreure una conclusió fiable.

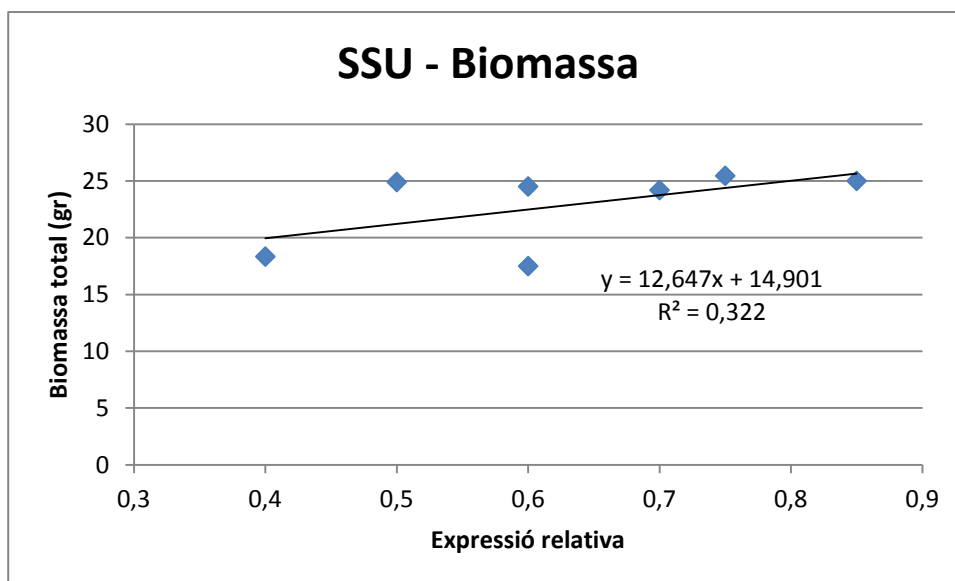


Figura 15. Correlació ($R^2=0,322$) entre la Biomassa total (gr) i l'expressió gènica relativa de SSU

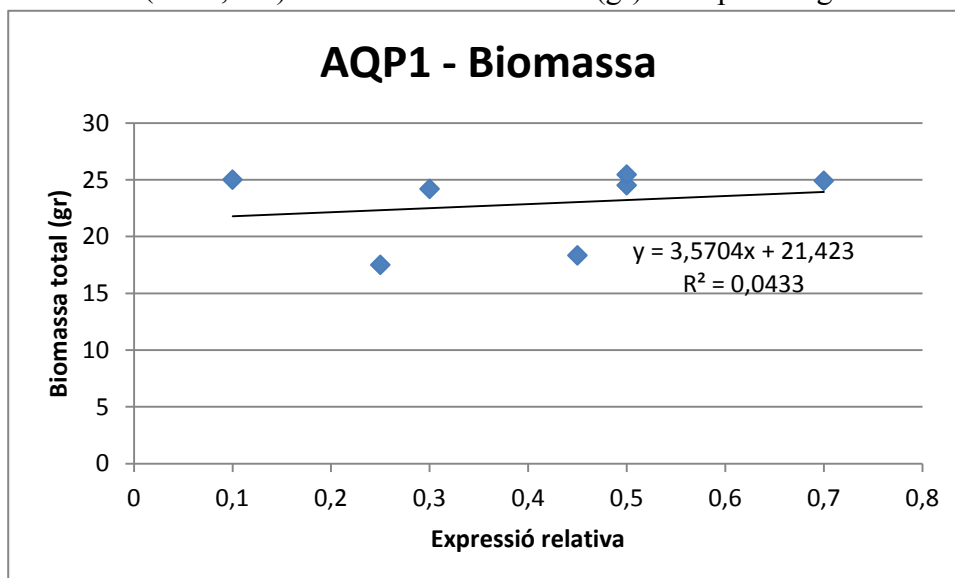


Figura 16. Correlació ($R^2=0,8622$) entre la Biomassa total (gr) i l'expressió gènica relativa de AQP1.

Les figures 15 i 16 representen com la modificació en l'expressió gènica d'una sola de les dues vies metabòliques principals que es plantegen per millorar la capacitat fotosintètica no implica directament un augment de la biomassa, degut a que la capacitat de tamponament de les plantes. La capacitat fotosintètica no només està determinada per mecanismes de Rubisco, sinó també per la disponibilitat de substrat, on hi participen les AQPs.

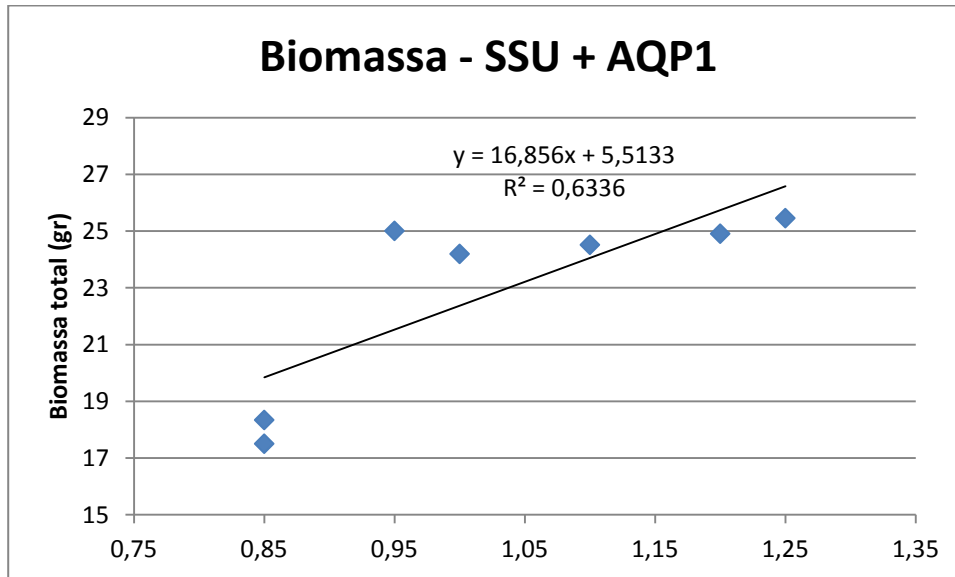


Figura 17 . Correlació ($R^2=0,6336$) entre la Biomassa total (gr) i l'expressió relativa de SSU i AQP1 mesurada a les línies de cultiu.

La figura 17 demostra com per poder aconseguir un augment de la Biomassa total i per tant una millora fotosintètica que es tradueixi en un augment en la productivitat es necessita tenir en compte les dues variables, de manera que es produeixi un equilibri entre la disponibilitat de substrat i la concentració de l'enzim actiu per iniciar la carboxilació.

6. CONCLUSIÓ

Objectiu general: Augmentar la productivitat dels cultius mitjançant la modificació genètica en l'expressió de 2 gens clau en el procés fotosintètic: Rubisco i Aquaporines.

La modificació de l'expressió gènica no es va traduir en un augment de la biomassa total dels cultius degut a la regulació conjunta dels gens que codifiquen per a Rubisco i Aquaporines.

Objectius específics

1. Determinar com afecta la inhibició de SSU i AQP1 sobre clorofil·les, TSP i biomassa.

Degut a la estreta relació entre els dos gens, la seva inhibició afecta disminuint la TSP, el % de rubisco, i les clorofil·les i per tant al moviment d'electrons necessari per impulsar els mecanismes fotosintètics, limitant l'activitat de la Rubisco activasa i per tant de la capacitat carboxilativa dels cultius que es tradueix en una menor biomassa.

2. Determinar els factors que limiten l'increment de biomassa.

L'increment de biomassa es veu limitat per la disponibilitat de substrat (CO₂) i la concentració i activació de l'enzim Rubisco. Els resultats demostren com la disminució de l'expressió d'un dels dos gens estudiats produeix una estimulació en l'altre, de manera que les línies dobles mutants L9 i L7 es veuen menys afectades per la modificació dels gens i creixen amb normalitat. Per tant, en darrera instància, la limitació de la productivitat es produeix per la co-regulació d'ambdues vies metabòliques, de manera que si es rompés la relació entre els dos gens milloraria la producció al no haver d'equilibrar l'expressió d'un front l'altre.

Bibliografia

- **Bradford MM** .1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**:248-54.
- **Bota J, Medrano H, Flexas J**. 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress?. *The New Phytologist*. **162**: 671-681.
- **Christophe M, Lionel V, Doan-Trung L, and Véronique S**. 2008. Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**:595–624.
- **FAO**. 2011. El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura.
- **Flexas J, Ribas-Carbó M, Handson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H and Kaldenhoff R**. 2006. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *The Plant Journal*. **48**: 427-439
- **Lincoln T, Eduardo Z**. 2002. *Universitat Jaume I*. Vol. 1: ed. III. 280-281
- **Joseph M.C, Randall D.D, and Nelson C.J**. 1981. Photosynthesis in polyploid tall fescue, II. Photosynthesis and RUBP case of polyploid tall fescue. *Plant Physiologist*. **68**, 894-898.
- **Jordan y Ogren**. 1981. Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxigenase. *Nature*. **291**:513 – 515.
- **Page T, Griffiths G. y Buchanan-Wollaston V**. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology*. **125**:718–727.
- **Porra R.J, Thompson W.A y Kriedemann P.E** 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **985**: 384–394.
- **Spencer M.W, Robert E, Sharwood, Susanne von Caemmerer, Pal M**. 2008. The Catalytic Properties of Hybrid Rubisco comprising Tobacco Small and Sunflower Large Subunits Mirror the Kinetically Equivalent Source Rubiscos and Can Support Tobacco Growth. *Plant Physiology*. **146**: 83–96.