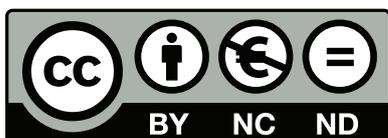




**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Vanessa Viviana Castro Rodríguez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

El N es un componente esencial de aminoácidos, ácidos nucleicos, fitohormonas y clorofilas, entre otras biomoléculas, y por lo tanto un elemento clave para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para la asimilación primaria, las plantas necesitan sistemas de captación del N, que en la mayoría de los casos se lleva a cabo mediante proteínas transmembrana llamadas transportadores. Una vez que el N es incorporado se asimila mayoritariamente mediante el ciclo de la glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2)/ glutamato sintasa (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1; NADH-GOGAT, EC 1.4.1.1) en el citosol o en los plastidios, y la glutamina puede ser incorporada para la producción de otros compuestos nitrogenados o transportada como aminoácido libre a otras células de la planta (Miflin y Lea, 1980).

En chopo, se ha estudiado previamente la familia de transportadores de amonio (Couturier et al., 2007). Sin embargo en pino, una especie modelo en árboles de gran interés ecológico, económico e industrial, estos transportadores no han sido estudiados con detalle. En el presente trabajo se discutirá la caracterización molecular y funcional de las diferentes isoformas de AMT en *Pinus pinaster* así como su localización subcelular en plantas jóvenes y bajo diferentes tratamientos de amonio.

El amonio incorporado por los AMT es posteriormente asimilado vía GS/GOGAT. Las enzimas implicadas en este proceso han sido descritas previamente por nuestro grupo de investigación (Cánovas et al., 2007). Sin embargo en chopo, la especie arbórea modelo de angiospermas, la familia génica de GS era desconocida hasta ahora. En esta tesis doctoral se discutirán los estudios que se han llevado a cabo sobre esta familia, su caracterización molecular y bioquímica así como el papel de sus miembros durante el desarrollo de la planta, en diferentes tejidos/órganos y en varios momentos durante el crecimiento estacional de los árboles.

Gracias al ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *Pinus pinaster* liderado por nuestro grupo de investigación, se han identificado un total de 7 transportadores de amonio que se distribuyen en dos familias, AMT1 y AMT2, en función de su estructura. Este número es inferior al número de genes que codifican los AMT de chopo, lo que puede explicarse por la ausencia de duplicaciones recientes en el genoma de las coníferas.

Hemos aislado y caracterizado las secuencias codificantes de 3 isoformas de la subfamilia de AMT1 (PpAMT1.1, PpAMT1.2 y PpAMT1.3) y 2 isoformas de la subfamilia de AMT2 (PpAMT2.1 y PpAMT2.3). La función de estas proteínas como transportadores de amonio se ha estudiado mediante ensayos de complementación en levadura y transformación en oocitos de *Xenopus*. La determinación de los parámetros cinéticos de las isoformas de AMT1 y AMT2 ha permitido la identificación inequívoca de transportadores de amonio de alta y baja afinidad, por primera vez en coníferas.

Los estudios de distribución, cuantificación e inmunolocalización de las isoformas de AMT de *P. pinaster* sugieren funciones diferentes para los distintos transportadores en diferentes tejidos y tipos celulares, y en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

La familia de GS de chopo está integrada por 8 genes organizados en 3 parejas de genes que codifican isoformas citosólicas PtGS1.1, PtGS1.2, PtGS1.3 y una pareja PtGS2 que codifica la isoforma cloroplastídica. Los genes duplicados *PtGS1.1*, *PtGS1.2*, *PtGS1.3* y *PtGS2* tienen patrones de expresión espacial y temporal diferentes, lo que sugiere que tienen funciones que no solapan en la biología del árbol.

Los genes duplicados codifican isoformas de GS con diferentes propiedades cinéticas y moleculares. La isoforma PtGS1.1 presenta una elevada afinidad por el amonio y una alta eficiencia catalítica. La expresión funcional de la pareja de genes PtGS1.2 produjo isoformas con propiedades moleculares y cinéticas esencialmente idénticas, lo que sugiere un papel redundante en la función de estos genes en la asimilación de amonio.

Los estudios de distribución y cuantificación de transcritos en diferentes tejidos y tipos celulares sugiere que los miembros duplicados de la familia de GS cumplen papeles fisiológicos diferentes: PtGS1.1 se localiza preferentemente en el parénquima de las hojas y podría desempeñar una función en la asimilación del amonio asociado a las hojas maduras. PtGS1.2 se expresa preferentemente en las raíces donde podría participar en la asimilación primaria del amonio disponible y en procesos de remobilización del nitrógeno. PtGS1.3 se expresa mayoritariamente en los haces vasculares y podría participar en la generación de glutamina para su movilización y el reciclaje del amonio durante la formación de la madera. PtGS2 se expresa especialmente en hojas jóvenes asimilando el amonio liberado durante la fotorrespiración y la asimilación primaria del nitrógeno.

Los estudios recogidos en esta Memoria sugieren que los genes duplicados de GS tienen funciones redundantes en los tipos celulares en que se expresan, contribuyendo a incrementar la abundancia de las enzimas y por tanto la capacidad de síntesis de glutamina en esas células. La duplicación de la familia génica de GS de *Populus* aparece en la última duplicación global del genoma que tuvo lugar hace alrededor de 65 millones de años (Tuskan et al., 2006) y proponemos que ha favorecido el crecimiento rápido de las especies de este género y la adaptación a nuevos nichos ecológicos. Los genes duplicados de la familia de GS no parecen haber sufrido un proceso de neofuncionalización.

Se ha estudiado la asimilación y utilización de elevados niveles de nitrato por plantas transgénicas de chopo que sobreexpresan una GS citosólica de pino. Las plantas transgénicas acumularon mayor biomasa vegetativa y altos niveles de proteínas, clorofilas y azúcares totales como glucosa, fructosa y sacarosa. Las plantas transgénicas también mostraron mayor eficiencia en el uso del nitrógeno y cambios en el transcriptoma en respuesta al exceso de nitrógeno que favorecen la producción de biomasa. Se propone la utilización de estos árboles para la fitorremediación de zonas contaminadas por nitrato y la producción forestal asociada a estas plantaciones puede servir para aplicaciones en bioenergía y producción de fibra y papel.