

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



Facultad de Farmacia
Departamento de Biología Vegetal

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FUNCIONAL DE LA
FAMILIA 3-FOSFOGLICERATO DESHIDROGENASA
(PGDH) DE *Arabidopsis thaliana***

**Tesis doctoral presentada por WALID TOUJANI para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia**

D030-01 Programa oficial de Postgrado en Biotecnología

**Esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Investigación
“Metabolismo y Desarrollo Vegetal”**

Dirigida por Jesús Muñoz Bertomeu y Roc Ros Palau

Valencia, 2013

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Departamento de Biología Vegetal



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FUNCIONAL DE LA
FAMILIA 3-FOSFOGLICERATO DESHIDROGENASA
(PGDH) DE *Arabidopsis thaliana***

Tesis doctoral presentada por **WALID TOUJANI** para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Valencia

D030-01 Programa oficial de postgrado en Biotecnología

Esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Investigación

“Metabolismo y Desarrollo Vegetal”

Dirigida por Jesús Muñoz Bertomeu y Roc Ros Palau

VALENCIA, 2013



D. Jesús Muñoz Bertomeu, Doctor en Biología por de la Universidad de Valencia

D. Roc Ros Palau, Doctor en Biología y Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral titulada “**Caracterización genética y funcional de la familia 3-Fosfoglicerato Deshidrogenasa (PGDH) de *Arabidopsis thaliana***”, presentada para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada bajo nuestra dirección por el licenciado en Ciencias de la Vida y de la Tierra WALID TOUJANI

Fdo. Jesús Muñoz Bertomeu

Fdo. Roc Ros Palau

To my Father, Mother and Brothers

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer la primera vez que vine a Valencia, y aquí estoy, más de cuatro años después, a punto de acabar la tesis, y doy gracias a Dios por darme esta oportunidad tan especial de adquisición de nuevos conocimientos. Sin embargo, este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas que fueron indispensables para la realización de esta tesis doctoral, a las que ahora quiero mostrar, a través de algunas palabras, todo mi agradecimiento.

Primeramente agradezco de modo especial a mis directores de Tesis, Roc Ros Palau y Jesús Muñoz Bertomeu, por su trato amable, por guiar mis pasos en el mundo de la investigación durante estos años, por haber apostado por mí, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos y adentrarme en el mundo de la ciencia y, sobretodo, la biotecnología y la biología molecular. A Roc Ros Palau, por su apoyo científico, su crítica científica, que me ha ayudado muchísimo, por sus ánimos y motivación, y por su ayuda inolvidable en los momentos difíciles. Y a Jesús Muñoz Bertomeu, porque junto a él he dado los primeros pasos en el laboratorio, por ayudarme a pensar y sacar todo lo bueno del mundo de la experimentación, por sus consejos prácticos, que me han ayudado a resolver más de una duda durante mi investigación, y por su ayuda imparable.

A Alejandro Ferrando, investigador del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia, por su apoyo científico, por sus consejos, que me han ayudado mucho durante mi estancia aquí en España, por su motivación, y por su ayuda incondicional. Siempre te estaré agradecido. Gracias Alex,

Una tesis doctoral es un trabajo complejo, largo y tedioso, por eso, es obvio que no puede ser el resultado del trabajo de una sola persona, sino de un equipo. Por suerte, yo he tenido el apoyo de un magnífico grupo. Todos en mayor o menor medida han aportado su granito de arena. A mis compañeros de laboratorio, los técnicos, los estudiantes de colaboración y a todos los miembros de mi grupo de investigación: Armand, Sara y María, por ayudarme y animarme en esta última etapa siempre que lo he necesitado, por apoyarme en los momentos difíciles tanto fuera como dentro del laboratorio, por llenarme de energía y alegría en las horas de trabajo y por las fiestas que hemos disfrutado juntos. Gracias chicos por vuestra espontaneidad y por vuestro cariño.

También tengo que agradecer a todos los profesores y el personal del Departamento de Biología Vegetal (Unidad de Fisiología Vegetal) de la Facultad de Farmacia, por su apoyo durante el desarrollo de esta Tesis. En especial al profesor Juan Segura por su ayuda y consejos en la redacción de esta tesis.

I World like to thank Dr. Alisdair R. Fernie and Saleh Alseekh from the Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie for their help and collaboration in this work,

Al professor José Pertusa de la Universidad de Valencia, por su apoyo científico, por sus consejos, que me han ayudado mucho durante todo el tiempo que he pasado en su laboratorio haciendo experimentos de microscopía. Muchas gracias José por todo.

No me gustaría olvidar tampoco en estos agradecimientos a otros compañeros de la Universidad de Valencia que me han ayudado mucho. A Cristina y Carlos de la sección del invernadero por la ayuda y su disponibilidad. A María Teresa de la sección de microscopía electrónica y a Sonia de la sección de microscopía confocal por la ayuda y sus explicaciones que me han ayudado a enriquecer mis conocimientos, y a todos los miembros de la sección de secuenciación por su ayuda y aclaraciones sobre secuenciación y PCR cuantitativa a tiempo real. Gracias a todos.

A mis amigos y compañeros Miquel y Lupe porque me han escuchado y animado siempre que lo he necesitado, gracias por compartir momentos que me hicieron recargar las pilas para poder seguir adelante. Quiero dar las gracias también al colegio Mayor la Coma y sobre todo al director Alfonso García Ninet, por darme la oportunidad de tener la beca del colegio durante 2 años, porque sin esta beca no hubiera podido estar a punto de doctorarme. Muchas gracias también a todos los becarios del colegio por el buen ambiente que hemos tenido y los sentimientos que hemos compartido juntos.

بواسطة خاصة أريد أن أشكر عائلتي لدعمها لي في جميع الأوقات، خلال كل سنوات الدكتوراه. دون دعمهم غير المشروط والمتواصل، لم أستطعت الوصول إلى تقديم أطروحة الدكتوراه. شكرا جزيلا لكم. وكذلك أريد أن أشكر كل إخواني على مساندتهم لي.

Por último, un agradecimiento particular y especial a mi Mariann Majer, a la que me faltan palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí desde el momento en que la conocí. Gracias Mariann por confiar en mí, por tu paciencia en los momentos duros y por darme tus consejos siempre que los he necesitado. Gracias por tu preocupación, por querer siempre lo mejor para mí y por demostrarme que siempre te tendré en los momentos difíciles. Te agradezco por animarme en todo momento y valorar todo mi esfuerzo.

Y por si me olvido de alguien que sepa que tambien le agradezco lo que me haya aportado.

Gracias sinceramente.

Esta tesis se financió con los proyectos BFU2012-31519 del Ministerio de Ciencia e Innovación, y PROMETEO 2009/075 y GVACOMP/2011/244 de la Generalitat Valenciana.

INDICE	Página
ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN	xi
RESUM.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. La Biotecnología como herramienta para la mejora de plantas y animales.....	3
I.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo en el estudio del desarrollo vegetal.....	7
I.2.1. Aspectos generales.....	7
I.2.2. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
I.2.3. Análisis genómico funcional en <i>A. thaliana</i>	15
I.3. El metabolismo vegetal y su importancia como diana biotecnológica..	18
I.4. El plasto.....	22
I.5. Funciones de la serina.....	25
I.6. Rutas de biosíntesis de serina en las plantas.....	27
I.6.1. La ruta del glicolato.....	30
I.6.2. La ruta del glicerato.....	32
I.6.3. La ruta fosforilativa de biosíntesis de serina.....	32
I.7. Las enzimas de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina.....	34
II. OBJETIVOS.....	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
III.1. Material vegetal.....	51
III.2. Condiciones generales de crecimiento para el cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
III.2.1. Esterilización de semillas.....	53
III.2.2. Condiciones estándar para el cultivo <i>in vitro</i>	54
III.2.3. Cultivo en invernadero.....	56
III.3. Cepas bacterianas.....	57
III.3.1. <i>Escherichia coli</i>	57
III.3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
III.4. Medios y condiciones de cultivo bacteriano.....	58
III.4.1. Medio Luria Bertani (medio LB).....	58

III.4.2. Medio SOB.....	58
III.4.3. Medio SOC.....	58
III.4.4. Manipulación y crecimiento de las bacterias utilizadas.....	59
III.5. Vectores de clonación y transformación.....	60
III.6. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	65
III.6.1. Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	65
III.6.2. Aislamiento de ADN plasmídico.....	65
III.6.2.1. High Pure Plasmid Isolation Kit.....	66
III.6.2.2. Protocolo de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS.....	67
III.6.3. Extracción de ARN.....	68
III.6.4. Cuantificación del ARN total.....	69
III.7. Análisis de ácidos nucleicos.....	69
III.7.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	69
III.7.1.1. PCR diagnóstica.....	70
III.7.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	71
III.7.3. Diseño de los cebadores.....	72
III.7.4. Purificación de los productos de PCR.....	73
III.7.5. Extracción y purificación de bandas de ADN.....	74
III.7.6. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	75
III.7.7. Ligación de moléculas de ADN.....	75
III.7.8. Análisis y secuenciación de ADN.....	75
III.7.9. Localización del inserto de T-DNA.....	75
III.7.10. Análisis de la expresión génica.....	76
III.7.10.1. Reacción de síntesis de cDNA.....	76
III.7.10.2. RT-PCR cuantitativa.....	77
III.7.11. Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para la obtención de plantas transgénicas.....	78
III.7.11.1. Fusión de promotores al gen delator de la β -glucuronidasa.....	78
III.7.11.2. Construcción de los vectores conteniendo de los genes <i>PGDH</i> , <i>3-PGDH</i> y <i>EDA9</i> fusionados al gen de la proteína GFP.....	79
III.8. Obtención de células competentes y procedimientos de transformación.....	81
III.8.1. Células competentes de <i>Escherichia coli</i>	81
III.8.2. Protocolo de transformación de <i>Escherichia coli</i>	82

III.8.3. Células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	83
III.8.4. Protocolo de transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	83
III.9. Protocolo de transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
III.10. Manipulación y obtención de líneas puras transgénicas T ₃	85
III.11. Procedimientos utilizados para la caracterización fenotípica y fisiológica.....	87
III.11.1. Ensayos de germinación de polen.....	87
III.11.2. Estudio de la morfología de los granos de polen.....	87
III.11.3. Tinciones histológicas.....	88
III.11.3.1. Tinción Hoechst.....	88
III.11.3.2. Preparación Nomarski.....	88
III.11.3.3. Microscopía electrónica de transmisión.....	89
III.11.4. Localización subcelular de la proteína de fusión GFP.....	89
III.11.5. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad β -glucuronidasa.....	90
III.11.6. Determinación del peso fresco.....	90
III.11.7. Determinación de metabolitos.....	91
III.12. Análisis bioinformáticos.....	91
III.13. Tratamiento estadístico de los resultados.....	92
IV. RESULTADOS	95
IV.1. Identificación y análisis <i>in silico</i> de los posibles genes de la familia PGDH en arabidopsis.....	97
IV.1.1. Árbol filogenético y alineamiento de las proteínas PGDH.....	97
IV.1.2. Patrón de expresión de los genes de la familia PGDH.....	100
IV.1.3. Estudio de la región promotora de los genes de la familia PGDH.....	103
IV.2. Análisis de los patrones de expresión de los genes de la familia PGDH.....	104
IV.2.1. Patrón de expresión tisular mediante la reacción histoquímica GUS.....	104
IV.2.2. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de los genes de la familia PGDH.....	108
IV.2.3. Patrón cuantitativo de expresión de los genes de la familia PGDH en diferentes condiciones experimentales.....	111
IV.3. Localización subcelular de las tres enzimas de la familia PGDH.....	114
IV.4. Caracterización funcional de los genes de la familia PGDH.....	115

IV.4.1. Estudio genético de mutantes para los genes <i>PGDH</i> , <i>3-PGDH</i> y <i>EDA9</i>	115
IV.4.2. Estudio fenotípico de los mutantes para los genes <i>PGDH</i> , <i>3-PGDH</i> y <i>EDA9</i>	119
IV.4.3. Obtención de plantas transgénicas para los genes <i>PGDH</i> , <i>3-PGDH</i> y <i>EDA9</i>	120
IV.4.4. Estudio genético del alelo <i>eda9.1</i>	121
IV.4.5. Caracterización del fenotipo de letalidad de <i>eda9.1eda9.1</i>	126
IV.4.6. Análisis de complementación de <i>eda9.1eda9.1</i>	129
IV.4.7. Caracterización del fenotipo de esterilidad de <i>eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9</i>	131
IV.4.8. Caracterización metabólica de las líneas mutantes y sobreexpresoras de los 3 genes de la familia PGDH.....	137
V. DISCUSIÓN	143
V.1. Ruta fosforilativa de biosíntesis de serina: nuevos datos sobre la regulación génica y los patrones de expresión de los genes de la familia PGDH.....	145
V.2. Implicación del gen <i>EDA9</i> en el desarrollo de las anteras y del embrión de arabidopsis.....	150
V.3. Interés biotecnológico de las vías de biosíntesis de serina.....	155
VI. CONCLUSIONES	159
VII. BIBLIOGRAFÍA	163
VIII. ANEXOS	183

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Significado
3-PGA	3-Fosfoglicerato
3-PGDH	Enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa
<i>3-PGDH</i>	Gen de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa
<i>3-pgdh1</i>	Alelo mutante 1 del gen <i>3-PGDH</i>
<i>3-pgdh1 3-pgdh1</i>	Mutante homocigoto (SM_3_37584) del gen <i>3-PGDH</i>
<i>3-pgdh2</i>	Alelo mutante 2 del gen <i>3-PGDH</i>
<i>3-pgdh2 3-pgdh2</i>	Mutante homocigoto por inserción de T-DNA (GK_877F12) del gen <i>3-PGDH</i>
3-PGDH-GFP	Fusión de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa con la proteína GFP
3-PHP	3-Fosfohidroxipiruvato
3-PS	3-Fosfoserina
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Ácido abscísico
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
<i>AG</i>	Gen <i>AGAMOUS</i>
<i>BAR</i>	Gen de resistencia a BASTA
BASTA	Herbicida glufosinato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BP	Cebador interno del T-DNA
cDNA	ADN complementario
col.	Colaboradores
DDP	Días después de la polinización
DH5 α	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
Dnasa	Dexosirribonucleasa
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EDA9</i>	Gen <i>EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 9</i>
EDA9	Enzima EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 9
<i>eda9.1</i>	Alelo mutante 1 del gen <i>EDA9</i>
<i>eda9.1eda9.1</i>	Mutante homocigoto por inserción de T-DNA (GK_155B09) del gen <i>EDA9</i>

<i>eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9</i>	Individuo homocigoto para el alelo mutante <i>eda9.1</i> transformado con el vector pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>EDA9</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
<i>eda9.1eda9.1 ProEDA9:EDA9</i>	Individuo homocigoto para el alelo mutante <i>eda9.1</i> transformado con el vector pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>EDA9</i> bajo el control de su propio promotor
<i>eda9.2</i>	Alelo mutante 2 del gen <i>EDA9</i>
<i>eda9.2eda9.2</i>	Mutante homocigoto por inserción de T-DNA (GK_867A04) del gen <i>EDA9</i> .
<i>EDA9EDA9</i>	Individuo silvestre para el gen <i>EDA9</i> .
<i>EDA9eda9.1</i>	Individuo heterocigoto para el gen <i>EDA9</i> para el alelo 1
<i>EDA9eda9.1 Pro35S:EDA9</i>	Individuo heterocigoto para el gen <i>EDA9</i> transformado con el vector pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>EDA9</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
<i>EDA9eda9.2</i>	Individuo heterocigoto para el gen <i>EDA9</i> para el alelo 2
<i>EDA9EDA9 Pro35S:EDA9</i>	Individuo silvestre transformado con el vector pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>EDA9</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
EDA9-GFP	Fusión de la proteína EDA9 a la proteína GFP
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eFP	<i>electronic Fluorescent Pictograph</i>
ESTs	Marcador de secuencia expresada; en inglés <i>expressed sequence tag</i>
GAPCp	Enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial
<i>gapcp1 gapcp2</i>	Doble mutante <i>gapcp</i>
GAPCps	Isoformas glicolíticas plastidiales de GAPCp
GDC	Glicina descarboxilasa
GFP	Proteína verde fluorescente
<i>GUS</i>	Gen de la β -glucuronidasa
GV3101	Cepa bacteriana de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
HSP18.2	Proteína de choque térmico 18.2
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Borde izquierdo del T-DNA
LP	Cebador de unión al ADN genómico con la misma dirección que el cebador BP
Medio LB	Medio de Luria y Bertani

Medio MS	Medio de Murashige y Skoog
Medio SOB	Medio <i>Super Optimal Broth</i>
Medio SOC	Medio <i>Super Optimal Broth with catabolic repressor</i>
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico
mQ	MilliQ
MS1/2	Medio MS diluido a la mitad
MS1/5	Medio MS diluido un quinto
NAD ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina
NASC	<i>European Arabidopsis Stock Center</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOS	Gen de la nopalina sintasa
<i>nptII</i>	Gen que codifica para la resistencia a kanamicina
<i>Oex3-PGDH</i>	Líneas sobreexpresoras del gen <i>3-PGDH</i>
<i>Oex3-PGDH-L4, L5, o L6</i>	Líneas independientes sobreexpresoras del gen <i>3-PGDH</i>
<i>OexEDA9</i>	Líneas sobreexpresoras del gen <i>EDA9</i>
<i>OexEDA9-L1, L2 o L3</i>	Líneas independientes sobreexpresoras del gen <i>EDA9</i>
<i>OexPGDH</i>	Líneas sobreexpresoras del gen <i>PGDH</i>
<i>OexPGDH-L1, L2 o L5</i>	Líneas independientes sobreexpresoras del gen <i>PGDH</i>
ORF	Pauta abierta de lectura; en inglés <i>Open reading frame</i>
p(DT)	Oligo de desoxinucleótidos de timina
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
<i>pBI121ProEDA9:GUS</i>	Vector de transformación pBI121 que expresa el gen <i>GUS</i> bajo el control del promotor del gen <i>EDA9</i>
<i>pCAMBIA1303 Pro3-PGDH:GUS</i>	Vector de transformación pCAMBIA1303 que expresa el gen <i>GUS</i> bajo el control del promotor del gen <i>3-PGDH</i>
<i>pCAMBIA1303 ProPGDH:GUS</i>	Vector de transformación pCAMBIA1303 que expresa el gen <i>GUS</i> bajo el control del promotor del gen <i>PGDH</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pfu</i>	polimerasa termófila de <i>Pyrococcus furiosus</i>
PGDH	Enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa
<i>PGDH</i>	Gen de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa
<i>pgdh1</i>	Alelo mutante 1 del gen <i>PGDH</i>

<i>pgdh1pgdh1</i>	Mutante homocigoto por inserción de T-DNA (SALK_048256) del gen <i>PGDH</i>
<i>pgdh2</i>	Alelo mutante 2 del gen <i>PGDH</i>
<i>pgdh2pgdh2</i>	Mutante homocigoto por inserción de T-DNA (SALK_149747) del gen <i>PGDH</i>
PGDH-GFP	Fusión de la proteína fosfoglicerato deshidrogenasa con la proteína GFP
<i>PGDHpgdh1</i>	Individuo heterocigoto para el gen <i>PGDH</i> para el alelo mutante 1
<i>PGDHpgdh2</i>	Individuo heterocigoto para el gen <i>PGDH</i> para el alelo mutante 2
<i>pMDC83Pro35S:3-PGDH</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>3-PGDH</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
<i>pMDC83Pro35S:EDA9</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>EDA9</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
<i>pMDC83Pro35S:PGDH</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>PGDH</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
PPBS	<i>Phosphorylated pathway of serine biosynthesis</i>
<i>Pro35S:3-PGDH</i>	<i>pMDC83Pro35S:3-PGDH</i>
<i>Pro35S:EDA9</i>	<i>pMDC83Pro35S:EDA9</i>
<i>Pro35S:PGDH</i>	<i>pMDC83Pro35S:PGDH</i>
<i>Pro35S:PSP</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>PSP</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
PSAT	Enzima 3-fosfoserina aminotransferasa
<i>PSAT</i>	Gen de la 3-fosfoserina aminotransferasa
PSP o PSP1	Enzima 3-fosfoserina fosfatasa
<i>PSP</i> o <i>PSP1</i>	Gen de la 3-fosfoserina fosfatasa
<i>psp1.1psp1.1</i>	Mutante homocigoto del gen <i>PSP1</i>
<i>psp1.1psp1.1 Pro35S:PSP1</i>	Individuo homocigoto para el alelo mutante <i>psp1.1</i> transformado con el vector pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>PSP1</i> bajo el control del promotor <i>35S</i>
PSS1	Fosfatidilserina sintasa
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa
RB	Borde derecho del T-DNA
RFBS	Ruta fosforilativa de biosíntesis de serina
RNasa	Ribonucleasa
RP	Cebador de unión al ADN genómico con distinta dirección que el cebador BP

rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR en tiempo real
Rubisco	ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa
SALK	SALK <i>institute</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SE	Error estándar
SGAT	Serina/glioxilato aminotransferasa
SHMT	Serina hidroximetil transferasa
SM	<i>Suppresor mutators</i>
Spm	Elemento transponible <i>Suppressor-Mutator</i>
<i>Stm</i>	Mutante de gen que codifica para la serina transhidroximetilasa o serina hidroximetil transferasa
SYBR	Compuesto fluorescente utilizado en las reacciones de qRT-PCR
T ₁	Primera generación de plantas transgénicas
T ₂	Segunda generación de plantas transgénicas
T ₃	Tercera generación de plantas transgénicas
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
<i>Taq</i>	ADN polimerasa termoestable de <i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tampón de transformación utilizado para la obtención de células competentes de <i>E. coli</i>
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
T-DNA	ADN de transferencia.
TOP10	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
UTR	Región no traducida de un gen
v/v	Volumen/volumen
WT	Tipo silvestre / grupo control
X ²	Prueba estadística Chi cuadrado
X-GlcA	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucurónico

RESUMEN

El metabolismo primario de las plantas es un proceso complejo, en el que las vías que participan deben estar perfectamente coordinadas e integradas con el fin de lograr el desarrollo adecuado de las plantas y su aclimatación al medio ambiente. Un ejemplo de tal complejidad es la biosíntesis del aminoácido L- serina, que se lleva a cabo en al menos dos orgánulos diferentes y por rutas distintas. A pesar del papel crucial de la serina en las plantas, no se conoce cuál es la importancia biológica de la coexistencia de varias rutas biosintéticas; tampoco se conoce cómo interactúan estas rutas para mantener la homeostasis de dicho aminoácido en las células. Se han descrito tres rutas diferentes de biosíntesis de serina en las plantas: la ruta del glicolato, asociada a la fotorrespiración, y dos rutas no fotorrespiratorias denominadas ruta del glicerato y ruta fosforilativa. La ruta fosforilativa de biosíntesis de serina (RFBS) se ha estudiado relativamente poco, probablemente debido a que se consideró de menor importancia en comparación con la ruta del glicolato.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido contribuir a dilucidar el papel de la RFBS en las plantas, utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*. Específicamente se ha procedido a la caracterización funcional de genes que codifican para la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), primera enzima de la RFBS. Se han identificado tres genes que podrían codificar para la enzima PGDH, denominados *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9* (Embryo Sac Developmental Arrest9). Mientras que *PGDH* ya había sido clonado y la enzima que codifica caracterizada bioquímicamente, *3-PGDH* y *EDA9* no habían sido estudiados hasta la fecha. A nivel de su secuencia aminoacídica, *3-PGDH* y *EDA9* presentan un alto porcentaje de identidad con *PGDH*, por lo que se les agrupó dentro de una familia génica que denominamos “familia PGDH”. Los tres genes mostraron un patrón de expresión diferente, indicando que no son funcionalmente redundantes. Los mutantes de los genes *PGDH* y *3-PGDH* no presentan fenotipos visuales drásticos, pero el mutante *eda9.1eda9.1* es letal, mostrando un retraso en el desarrollo embrionario que

conduce al aborto de los embriones. El fenotipo de letalidad del embrión del mutante *eda9.1eda9.1* se complementó con el cDNA del gen *EDA9* bajo el control del promotor *35S* (*Pro35S:EDA9*) y de su propio promotor (*ProEDA9:EDA9*). Sin embargo, la construcción que lleva el promotor *35S*, que muestra baja expresión en el tapete de las anteras, no complementó la fertilidad del mutante. El desarrollo de las microsporas en *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* se detiene en la etapa de microspora polarizada. El polen de estas líneas carece de trifina en los intersticios de la exina, la capa más externa del grano de polen, mostrando formas colapsadas y deformadas que no fueron capaces de germinar cuando se cultivaron *in vitro*. Un análisis metabólico de los mutantes de la familia PGDH y de las líneas que sobreexpresan estos genes, reveló que los tres genes de la familia pueden regular la homeostasis de la serina, siendo *PGDH* el más importante cuantitativamente en el proceso de biosíntesis de serina en toda la planta. Por el contrario, el papel esencial de *EDA9* podría estar relacionado con su expresión en tipos celulares muy específicos. En esta tesis, ponemos de manifiesto el papel crucial de *EDA9* en el desarrollo del embrión y del polen, lo que sugiere que la RFBS es un importante nexo de unión entre el metabolismo primario y el desarrollo.

RESUM

El metabolisme primari de les plantes és un procés complex, en el qual les vies que participen han d'estar perfectament coordinades i integrades amb la finalitat d'aconseguir el desenvolupament adequat de les plantes i la seva aclimatació al medi ambient. Un exemple de tal complexitat és la biosíntesi de l'aminoàcid L-serina, que es duu a terme en almenys dos orgànuls diferents i per rutes diferents. Malgrat el paper crucial de la serina en les plantes, no es coneix quina és la importància biològica de la coexistència de diverses rutes biosintètiques; tampoc es coneix com interactuen aquestes rutes per mantenir l'homeòstasi d'aquest aminoàcid a les cèl·lules. En les plantes, s'han descrit tres rutes diferents de biosíntesi de serina: la ruta de glicolat, associada a la fotorespiració, i dues altres rutes no fotorespiratòries denominades ruta del glicerat i ruta fosforilativa. La ruta fosforilativa de biosíntesi de serina (RFBS) s'ha estudiat relativament poc, probablement perquè es va considerar de menor importància en comparació amb la ruta del glicolat.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat contribuir a dilucidar el paper de la RFBS en les plantes, utilitzant com a model *Arabidopsis thaliana*. Específicament s'ha procedit a la caracterització funcional dels gens que codifiquen per a la 3-fosfoglicerat deshidrogenasa (PGDH), primer enzim de la RFBS. S'han identificat tres gens que podrien codificar per a l'enzim PGDH anomenats *PGDH*, *3-PGDH*, *EDA9* ((Embryo Sac Developmental Arrest9) respectivament. Mentre que *PGDH* ja havia estat clonat i, l'enzim que codifica, caracteritzat bioquímicament, *3-PGDH* i *EDA9* no havien estat estudiats fins avui. A nivell de la seva seqüència aminoàcida, *3-PGDH* i *EDA9* presenten un alt percentatge d'identitat amb *PGDH*, per la qual cosa se'ls va agrupar dins d'una família gènica que denominarem "família PGDH". Els tres gens van mostrar un patró d'expressió diferent, la qual cosa indica que no són funcionalment redundants. Els mutants dels gens *PGDH* i *3-PGDH* no van presentar fenotips visuals dràstics, però el mutant *eda9.1eda9.1* és letal perquè mostra un retard en el desenvolupament embrionari,

que condueix a l'avortament dels embrions. El fenotip de letalitat de l'embrió del mutant *eda9.1eda9.1* es va complementar amb el cDNA del gen *EDA9* sota el control del promotor *35S* (*Pro35S:EDA9*) i del seu propi promotor (*ProEDA9:EDA9*). No obstant això, la construcció que porta el promotor *35S*, que mostra baixa expressió en el tapetum de les anteres, no complementa la fertilitat del mutant. El desenvolupament de les microspores en *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* es deté a l'etapa de microspora polaritzada. El pol·len d'aquestes línies manca de trifina en els intersticis de l'exina, la capa més externa del gra de pol·len, mostrant formes col·lapsades i deformatades que no van ser capaces de germinar quan es van conrear *in vitro*. Un anàlisi metabolòmic dels mutants de la família PGDH i de les línies que sobreexpresen aquests gens, va revelar que els tres gens de la família PGDH poden regular l'homeòstasi de la serina, sent *PGDH* el més important quantitativament en el procés de biosíntesi de l'aminoàcid en tota la planta. Per contra, el paper essencial de *EDA9* podria estar relacionat amb la seva expressió en tipus cel·lulars molt específiques. En aquesta tesi, posem de manifest el paper crucial de *EDA9* en el desenvolupament de l'embrió i del pol·len, la qual cosa suggereix que la RFBS és un important nexa d'unió entre el metabolisme primari i el desenvolupament.

ABSTRACT

Plant primary metabolism is a complex process where many interacting pathways must be finely coordinated and integrated in order to achieve proper plant development and acclimation to the environment. An example of such complexity is the biosynthesis of the amino acid L- serine which takes place in at least two different organelles and by different pathways. In spite of the crucial role of serine in plants, the biological significance of the coexistence of several biosynthetic pathways, and also how they interact to maintain amino acid homeostasis in cells is not yet understood. Three different serine biosynthesis pathways have been described in plants: The glycolate pathway associated with photorespiration, and two others non fotorespiratory pathways denominated glycerate pathway and phosphorylated pathway. The phosphorylated pathway of serine biosynthesis (PPSB) has been poorly studied, probably because it was considered of minor importance compared to the glycolate pathway.

The main objective of this thesis is to elucidate the role of PPSB in plants, using *Arabidopsis thaliana* as a model. Specifically, the functional characterization of genes coding for the first enzyme of the PPSB, 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH) has been elucidated. We have identified three genes coding for putative PGDHs named *PGDH*, *3-PGDH* and *EDA9* (Emryo Sac Developmental Arrest9) respectively. While *PGDH* have already been cloned and biochemically characterized, *3-PGDH* and *EDA9* have not been studied to date. *3-PGDH* and *EDA9* have a high percentage of amino acid identity as compared to *PGDH*. Therefore they were grouped within a gen family called “PGDH family”. All three genes displayed a different expression pattern indicating that they are not functionally redundant. The mutants of *PGDH* and *3-PGDH* presented no drastic visual phenotypes, but the mutant *eda9.1eda9.1* is lethal showing delayed embryo development that led to aborted embryos. The embryo-lethal phenotype of the mutant *eda9.1eda9.1* was complemented with *EDA9* cDNA under the control of *35S* promoter (*Pro35S:EDA9*) and its own promoter (*ProEDA9:EDA9*). However,

the construct that carries the 35S promoter, which is poorly expressed in the anther tapetum, did not complement mutant fertility. Microspore development in *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* was arrested at the polarized stage. Pollen from these lines lacked tryphine in the interstices of the exine, the external layer of pollen grain, and displayed shrunken and collapsed forms that were unable to germinate when cultured *in vitro*. A metabolomic analysis of *PGDH* mutant and overexpressing plants revealed that all three *PGDH* family genes can regulate serine homeostasis, with *PGDH* being quantitatively the most important in the process of serine biosynthesis at the whole plant. By contrast, the essential role of *EDA9* could be related to its expression in very specific cell types. In this thesis, we evidence the crucial role of *EDA9* in embryo and pollen development, suggesting that the PPSB is an important link connecting primary metabolism with development.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La Biotecnología como herramienta para la mejora de plantas y animales

En la historia de la mejora vegetal hay tres momentos clave que han permitido el aumento de la productividad de las cosechas. El primero fue el establecimiento de las leyes de la herencia por Gregor Mendel durante el siglo XIX, cuando la mejora de las variedades de plantas dejó de ser un proceso lento y tradicional y se convirtió, poco a poco, en un proceso más empírico y planificado a través de métodos cada vez más sofisticados. El segundo momento se produce en la mitad del siglo XX, tras el desarrollo de las distintas técnicas de mutagénesis y/o cultivo *in vitro* (obtención de organismos haploides, regeneración de plantas, rescate de embriones, etc.), que permitieron la generación de organismos mejorados genéticamente. Finalmente, el tercer momento está ligado a las técnicas de la biotecnología moderna (desarrollo de la ingeniería genética) a finales del siglo XX, que reporta grandes beneficios a la agricultura a través de la manipulación genética de microorganismos, plantas y animales.

La biotecnología existe en nuestra sociedad desde épocas remotas, en las que ya se practicaba la siembra de cultivos, los sistemas de fermentación para la producción de vinos, o la utilización de rutas bioquímicas de algunos microorganismos para el procesamiento de compuestos orgánicos y producción de quesos o cervezas.

La mejora de las plantas contribuye al progreso de la humanidad, porque ayuda a mejorar las condiciones primordiales de la vida humana. El aumento de la población mundial, el establecimiento de las nuevas agroindustrias, la complejidad de la alimentación actual, etc., exigen la constante incorporación de nuevos cultivos y variedades, con gran potencial de rendimiento, de mayor rango de adaptación y de buena calidad para el procesamiento industrial. Por eso, en nuestros días, los continuos avances metodológicos en ingeniería genética y en

biotecnología han revolucionado la biología del desarrollo vegetal. Así, en la actualidad es posible la introducción y la mayor o menor expresión de genes propios o foráneos en células embrionarias o adultas. También es posible la clonación de cualquier gen, la determinación de su secuencia nucleotídica y de sus patrones de expresión espacial y temporal, así como la deducción de la estructura de su producto proteico y la obtención y purificación de este último. Las técnicas basadas en la hibridación de ácidos nucleicos han permitido el hallazgo de genes de naturaleza similar en organismos tan dispares como las bacterias y el hombre, lo que ha consolidado la idea de la existencia de mecanismos genéticos universales (Davidson, 1994). Las nuevas tecnologías de secuenciación automatizada de fragmentos de ADN o de genomas completos (Hood y col., 1987; Hunkapiller y col., 1991) han abierto nuevas vías de acceso experimental a los genes de un organismo y a la determinación de su papel en el desarrollo. Los secuenciadores automáticos también han hecho posible la secuenciación en masa de segmentos de cDNA (ADN complementario), para obtener las denominadas ESTs (del inglés *Expressed Sequence Tags*), que dan lugar a extensos catálogos de los genes expresados en un organismo, en alguno de sus órganos, tejidos o estados de desarrollo (Adams y col., 1991 y 1992). La presencia en las bases de datos de secuencias nucleotídicas y proteicas (Benson y col., 1994; Emmert y col., 1994) ha creado un nuevo tipo de Biología Comparada, la que se fundamenta en el análisis de las secuencias de los genes y sus productos.

En la actualidad, la biotecnología está focalizada, entre otros campos, hacia aplicaciones agrícolas y médicas basadas en la información codificada en el ADN, lo cual ha llevado al uso en estos ámbitos de términos como ingeniería genética, tecnología del ADN recombinante, modificación o transformación genética. En este sentido, se están utilizando diversas técnicas de transferencia de genes como son la manipulación y transformación de protoplastos, la transformación biolística o el uso de microorganismos tales como *Agrobacterium* para introducir genes en las plantas. Mediante estas técnicas se ha acelerado y optimizado la mejora de las

especies cultivadas. Así, los aportes de las técnicas de ingeniería genética permiten saltar las barreras entre especies y obtener plantas mejoradas en sus propiedades agronómicas y en su calidad nutricional o industrial como por ejemplo:

- Plantas tolerantes a herbicidas de amplio espectro que asociados a sistemas de siembra directa evitan las tareas de labranza que erosionan los suelos.
- Plantas resistentes a enfermedades y plagas, como el algodón y el maíz BT, a las que se les ha transferido el gen que codifica para una toxina proveniente de *Bacillus thuringiensis*, que provoca la muerte de las larvas de insectos.
- Plantas tolerantes a estrés abiótico que pueden sobrevivir mejor en suelos salinos, a bajas temperaturas o en climas con lluvias escasas.
- Plantas con calidad nutricional mejorada (por ejemplo modificación en la proporción de nutrientes y vitaminas), con menor contenido en alérgenos, con mayores tiempos de conservación, o con características organolépticas mejoradas, etc. Un ejemplo de ello es el arroz dorado, que es una variedad a la que se le han introducido dos genes, uno proveniente del genoma del narciso y otro del genoma bacteriano (Ye y col., 2000). Estos genes codifican pasos de la ruta de síntesis de la provitamina A, que las variedades convencionales de arroz no tienen. Este arroz con provitamina A, permitiría paliar en gran medida los problemas de avitaminosis en poblaciones cuyo principal aporte nutricional proviene del arroz.
- Plantas con propiedades nuevas desarrolladas para trabajar como biofábricas produciendo fármacos, vacunas y plásticos. Por ejemplo, la producción de anticuerpos monoclonales humanos para combatir el virus de la hepatitis B a partir de células transgénicas de la planta del tabaco.

En el ámbito animal, la biotecnología se aplica tanto a la producción como a la alimentación y salud de los animales. En estos organismos, la ingeniería genética permite transferir genes de una especie a otra diferente, que se integren en su genoma, que sean funcionales y que puedan transmitirse a la descendencia. Por tanto, la transgénesis animal puede tener objetivos tan diversos como el estudio de enfermedades humanas, la mejora del ganado (aumento de la tasa de crecimiento corporal, modificación de la relación carne/grasa, resistencia a enfermedades, etc.) o la producción de moléculas de interés para diferentes industrias, como la farmacéutica, la alimentaria, la química, etc. En este sentido, se han obtenido proteínas recombinantes de interés farmacológico en la leche de animales transgénicos de granja (ovejas, vacas, cerdos o cabras). De esta manera, las proteínas recombinantes se pueden producir en grandes cantidades y, dado que su purificación es relativamente sencilla y su producción puede no interferir con la biología del animal, su impacto ambiental y su coste puede ser bajo.

Una vez conseguido el animal transgénico, éste puede ser clonado para obtener una descendencia numerosa genéticamente idéntica que tendrá los efectos beneficiosos de sus progenitores. Entre los animales transgénicos utilizados para la producción de proteínas de interés farmacológico se encuentran ovejas que producen la proteína alfa₁ proteinasa así como los factores de coagulación VII y IX, y vacas que producen la hormona de crecimiento humano (Salamone y col., 2006).

Por último, a pesar de estos logros de la biotecnología como herramienta de mejora, es importante hacer hincapié en su papel en la investigación básica, como paso previo para alcanzar metas dentro del marco definido por la ciencia aplicada. En este último marco conceptual, es donde se desarrolla la presente tesis doctoral.

I.2. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo en el estudio del desarrollo vegetal

I.2.1. Aspectos generales

En el siglo pasado, la mayoría de los estudios en plantas se realizaron con especies de interés económico para poder mejorar sus cultivos. Estas especies por lo general presentan dificultades para su estudio, ya que en la mayoría de los casos sus genomas son de gran tamaño y tienen un elevado grado de ploidía, lo que dificulta su manipulación y análisis (Meyerowitz, 2001; Page y Grossniklaus, 2002). Entre estas especies se encuentran el tomate (*Solanum lycopersicum*), el maíz (*Zea mays*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) o el guisante (*Pisum sativum*). Debido a los inconvenientes que presentaban las plantas cultivadas para su utilización en investigación, se hizo necesaria la búsqueda de sistemas modelo vegetales menos complejos.

La denominación de sistema u organismo modelo hace referencia a cualquiera de los organismos experimentales en cuyo estudio se concentran los esfuerzos de un grupo amplio de equipos de investigación, con el fin de obtener conclusiones que puedan ser generalizadas a otras especies. La elección de sistemas modelo para el estudio de la función vegetal a nivel molecular ha sido guiada por criterios diversos, entre ellos tener un pequeño tamaño, ciclo de vida corto, mantenimiento simple y económico en el laboratorio, etc.

En los abordajes genéticos del desarrollo en animales se han empleado organismos como *Drosophila melanogaster* (Leptin, 1994) o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Hope, 1994). En el campo de la biología molecular vegetal, a partir de los años 1980, se generalizó la utilización de una crucífera sin valor económico llamada vulgarmente arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; Figura I.1), que en pocos años se convirtió en la planta modelo por excelencia (Meyerowitz y Pruitt, 1985; Meyerowitz, 1987, 1989, 2001; Bowman, 1994; Page y Grossniklaus, 2002; Somerville y Koornneef, 2002). Arabidopsis presenta unas

características óptimas como organismo modelo en Biología vegetal, entre las que destacan su capacidad de crecimiento bajo condiciones controladas, su pequeño tamaño (unos 30-50 cm de altura, que posibilita cultivar hasta 10000 plantas/m²), su ciclo de vida corto (aproximadamente unas 6 semanas) y la producción de varios miles de semillas, lo que unido a su genoma pequeño [$1,2 \times 10^8$ pares de bases (pb), aproximadamente 26000 genes, comparado con los $2,4 \times 10^9$ pb del maíz, 20 veces más, o los $1,6 \times 10^{10}$ pb del trigo, 130 veces más] y su facilidad para obtener mutantes o transgénicas, permite hacer estudios genéticos. Se han desarrollado y adaptado también para esta especie métodos de bioquímica y biología molecular como son el aislamiento y detección de ADN, ARN, proteínas, etc.

Arabidopsis es una planta angiosperma que pertenece a la clase de Dicotiledóneas, a la subclase de las Dilénidas, al orden de las Caparales y a la familia de las Brasicáceas o Crucíferas (Strasburger y col., 1994), que es una familia muy amplia en la que encontramos aproximadamente 340 géneros y más de 3500 especies (Al-Shehbaz, 1984 citado en Hall y col., 2002). Algunos miembros de esta familia con interés económico son las diversas variedades de col (*Brassica oleracea*), el rábano (*Raphanus sativus*), el nabo (*B. napus* subsp. *rapifera*) y la colza (*B. napus* var. *arvensis*).

Aunque se ha descrito la presencia de *arabidopsis* en casi todo el planeta, es bastante difícil conocer exactamente su origen geográfico. A pesar de ello y al igual que otras crucíferas, es una especie cosmopolita que se localiza, mayoritariamente, en regiones de clima moderado (Meyerowitz, 1989; Strasburger y col., 1994; Innan y col., 1997). *Arabidopsis* tiene el tallo erecto con ramificaciones un poco alejadas de la base, en el que aparecen pelos ramificados y cortos (tomentosos), dispuestos muy densamente, que van desapareciendo o reducen su densidad a medida que nos aproximamos a las inflorescencias. Las hojas son simples, de elípticas a ovales, con los bordes enteros. Se distinguen dos tipos de hojas: las basales, que forman una roseta de unas 10-15 hojas, y las caulinares, más pequeñas y sésiles. Sus inflorescencias se presentan en racimos en

el extremo de las ramas o del tallo. Las flores, de unos 5 mm de diámetro, son hermafroditas y están formadas por cuatro pétalos blancos espatulados. El fruto es una silicua linear de unos 3 cm de longitud y 1-2 mm de anchura, cilíndrica, un poco arqueada y sin pelos (Figura I.1). Los frutos contienen dos cavidades en las que se alojan las semillas ovoideas en hilera. Presenta un ciclo de vida de alrededor de 6 semanas, permitiendo la obtención de hasta 8 generaciones al año en determinadas condiciones de cultivo (25°C e iluminación continua). Se trata de una especie autógena y muy prolífica, pudiendo conseguir hasta 25000 semillas por planta sin necesidad de intervención alguna. Las semillas pueden almacenarse durante unos pocos años a temperatura ambiente sin perder mucha viabilidad (Bowman 1994; Somerville y Koornneef, 2002; Page y Grossniklaus, 2002), aunque a 4°C esa viabilidad aumenta considerablemente.

I.2.2. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*

A pesar de que en condiciones de laboratorio, esta especie puede tener hasta ocho generaciones en un año, *arabidopsis* es una planta anual. Al igual que otras muchas angiospermas, presenta un ciclo de vida típico con alternancia de generaciones haploides y diploides (gametofítica y esporofítica, respectivamente). El gineceo es el órgano reproductivo femenino de la flor, y está compuesto de estigma, estilo y ovario. En el ovario se localizan los óvulos en cuyo interior se encuentra el gametofito femenino. Los estambres constituyen los órganos reproductivos masculinos de la flor y se componen del filamento y antera en la que se encuentran los granos de polen (gametofito masculino; Figura I.2; Bowman, 1994; Meinke y col., 1998).

El gametofito femenino, también conocido como saco embrionario o megagametofito, se desarrolla dentro del óvulo, que se encuentra dentro del ovario del carpelo. La parte del ovario a la que se une el óvulo se llama placenta y éste se une a ella a través del funículo (en el caso de *arabidopsis* y otras plantas un ovario

puede tener varios óvulos). La parte apical del primordio del óvulo constituye la nucela, de la cual derivará el saco embrionario. La nucela está rodeada de uno o dos integumentos que formarán la cubierta seminal. Una de las células diploides de la nucela llamada célula madre de la megaspora, se divide por meiosis dando lugar a 4 megasporas (células haploides), de las que 3 degeneran y una (megaspora funcional) continua su desarrollo, produciéndose 3 divisiones mitóticas que forman el saco embrionario, formado por las 7 células con 8 núcleos haploides: tres células antípodas, dos células sinérgidas, una ovocélula y una célula central con dos núcleos (Figura I.3; Yadegari y Drews, 2004).

El gametofito masculino, o grano de polen, es un organismo tricelular que proviene de divisiones meióticas de las células madre del polen (Figura I.4). El polen se inicia dentro de la antera, cuando a partir de estas células madre se forman tétradas de células rodeadas por paredes de calosa tras la meiosis. Las microsporas haploides de cada tétrada se liberan por la acción de la enzima calasa producida por una capa de células de la antera llamada tapete, que rodea al gametofito durante su formación, y cuya función es nutrirlo y proporcionarle materiales para la formación de la compleja pared del polen, aunque en etapas posteriores degenera y desaparece (Scott y col., 2004). Cada una de estas microsporas sufre una mitosis asimétrica, dando lugar a células binucleares, una de mayor tamaño (célula vegetativa) y otra de menor tamaño (célula generativa, que está embebida en la vegetativa) y que sufrirá una segunda mitosis originando dos células espermáticas. En este momento, el grano de polen ya formado sufre una deshidratación parcial antes de liberarse de la antera (Figura I.4; McCormick, 2004).

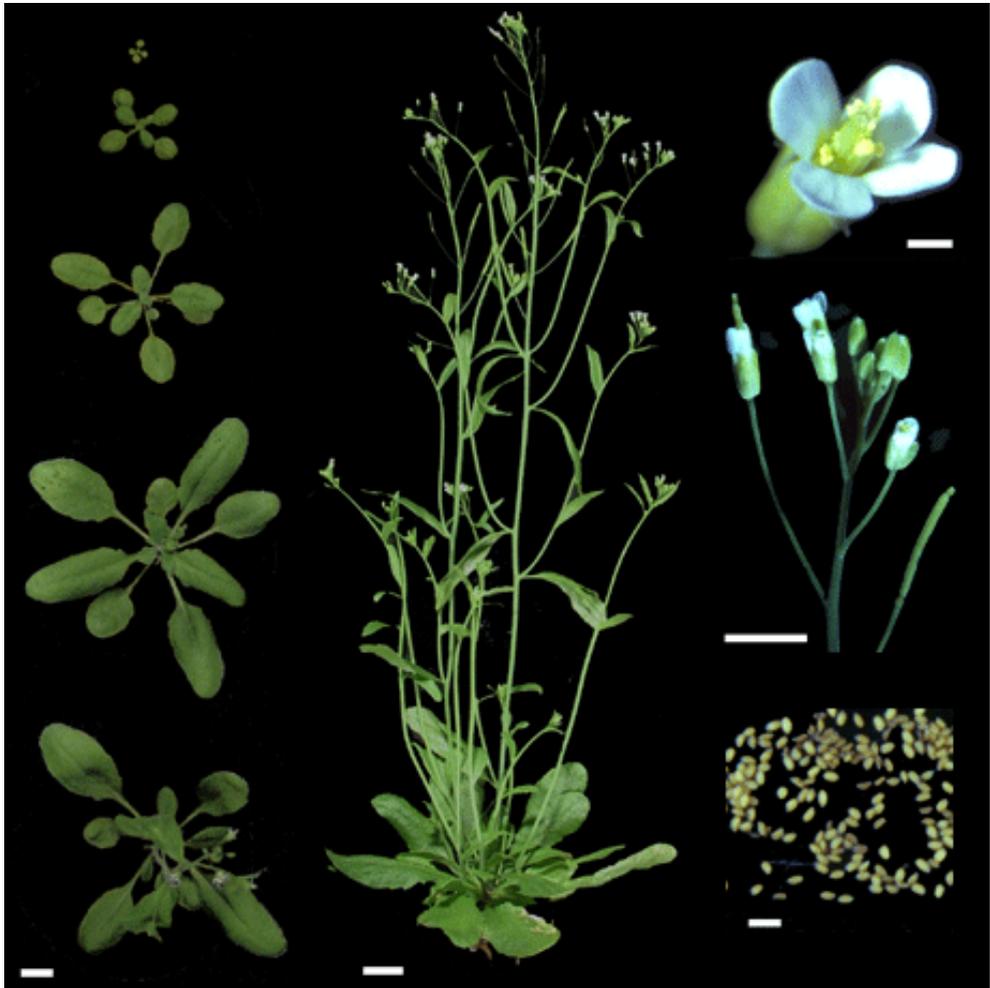


Figura I.1. Fotografías de diferentes estadios y órganos de *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda se muestra el estado vegetativo con roseta y en el centro la planta adulta en floración; las barras representan 1 cm. A la derecha se muestran detalles de la flor, inflorescencia y semillas; las barras representan 1 mm. Imagen ha sido extraída de la web <http://ambiental.unab.cl/etiqueta/arabidopsis-thaliana/>

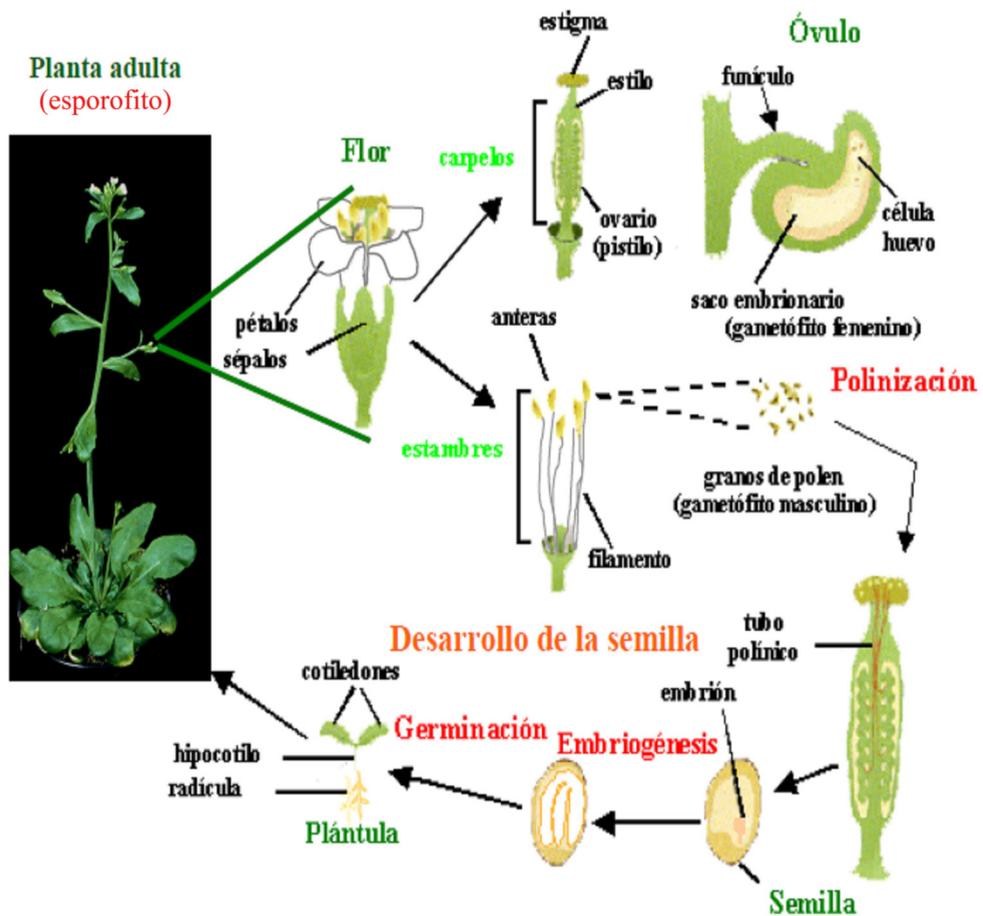


Figura 1.2 Representación del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* en la que se indican los distintos estadios de desarrollo de esta crucifera. Se presentan algunos de los órganos de esta planta. En rojo, se indican cada uno de los procesos que tienen lugar durante el ciclo vital de la planta. Dibujo modificado de Ripio-Samper (2004).

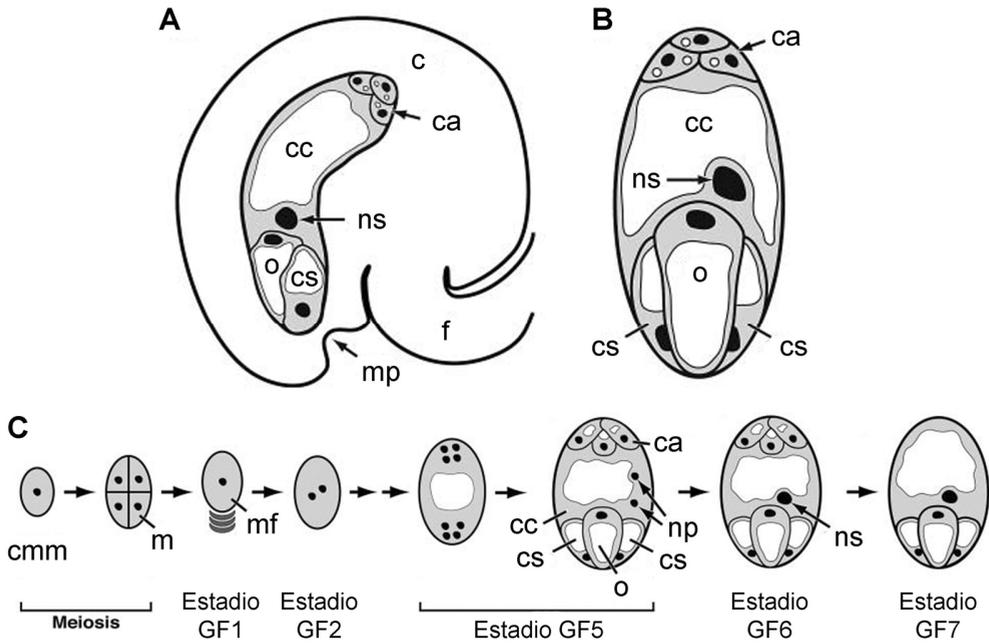


Figura I.3. Representación de un ovulo (A) y gametofito femenino (B) de *Arabidopsis thaliana*. La visión en (B) es perpendicular respecto a (A) y tanto en (A) como en (B) las áreas grises del gametofito representan citoplasma, las áreas blancas representan vacuolas, y las áreas negras representan núcleos. (C) Desarrollo del gametofito femenino de *Arabidopsis thaliana*. En esta representación, la región de la calaza está arriba y el micropilo está abajo. Abreviaturas: c, calaza; ca, células antípodas; cc, célula central; cmm, célula madre de la megaspora; cs, célula sinérgida; f, funículo; GF, gametofito femenino; m, megaspora; mf, megaspora funcional; mp, micropilo; np, núcleos polares; ns, núcleo secundario; o, ovocélula. Modificado de Yadegari y Drews, 2004.

Cuando el polen llega al estigma, se rehidrata y germinará, dando lugar al tubo polínico por el que viajarán el núcleo de la célula vegetativa y las dos células espermáticas (Figura I.4). Cuando el tubo polínico llega al saco embrionario a través del micropilo, las dos células espermáticas se liberarán para producir la doble fecundación (McCormick, 2004). Una de las células espermáticas se fusionará con la ovocélula para dar lugar a un cigoto diploide. La otra célula espermática se fusionará con la célula central del saco embrionario y al fusionarse su núcleo con el núcleo secundario (formado por la unión de los dos núcleos polares) de ésta se originará un núcleo triploide que desarrollará el endospermo.

La generación esporofítica comienza con la fusión de los gametos, que da lugar al cigoto o embrión diploide, que junto con el tejido materno y el endospermo extraembrionario, dará lugar a la semilla (Bowman, 1994; Meinke y col., 1998; Laux y col., 2004). Durante el desarrollo de las semillas, se suceden las distintas fases de la embriogénesis, que culminan con la formación del embrión maduro, que presenta las características básicas del plan corporal de la planta (Figura I.2). Las semillas están dentro de la silicua pudiendo contener hasta 60 semillas cada una de ellas.

El desarrollo vegetativo comienza con la germinación de la semilla. El crecimiento del embrión rompe la cubierta de la semilla y se produce la emergencia, con la elongación de la radícula y la posterior expansión de los cotiledones. A continuación, la radícula emergente, crece y se diferencia, dando lugar a la raíz. Las estructuras aéreas se desarrollan con la aparición de las hojas verdaderas, que inicialmente forman la roseta vegetativa (Figura I.1).

La transición floral, que marca el inicio de la fase reproductiva se produce al final del desarrollo vegetativo, tras la integración de señales endógenas (hormonas, regulación génica, etc.) y exógenas (temperatura, luz, fotoperiodo, nutrientes, disponibilidad de agua, etc.). El meristemo apical se transforma en meristemo de inflorescencia y emerge un tallo floral principal y algunos tallos florales secundarios. En estos tallos se sitúan las hojas caulinares, más pequeñas que las de la roseta y sésiles. Cada uno de los tallos desarrolla inflorescencias terminales y secundarias, con flores dispuestas en racimos siguiendo un patrón de filotaxia helicoidal (Boyes y col., 2001; Page y Grossniklaus, 2002). Las flores son hermafroditas, de unos 0,5 cm de diámetro, con cuatro pétalos blancos, 4 sépalos y 6 estambres (Figura I.1).

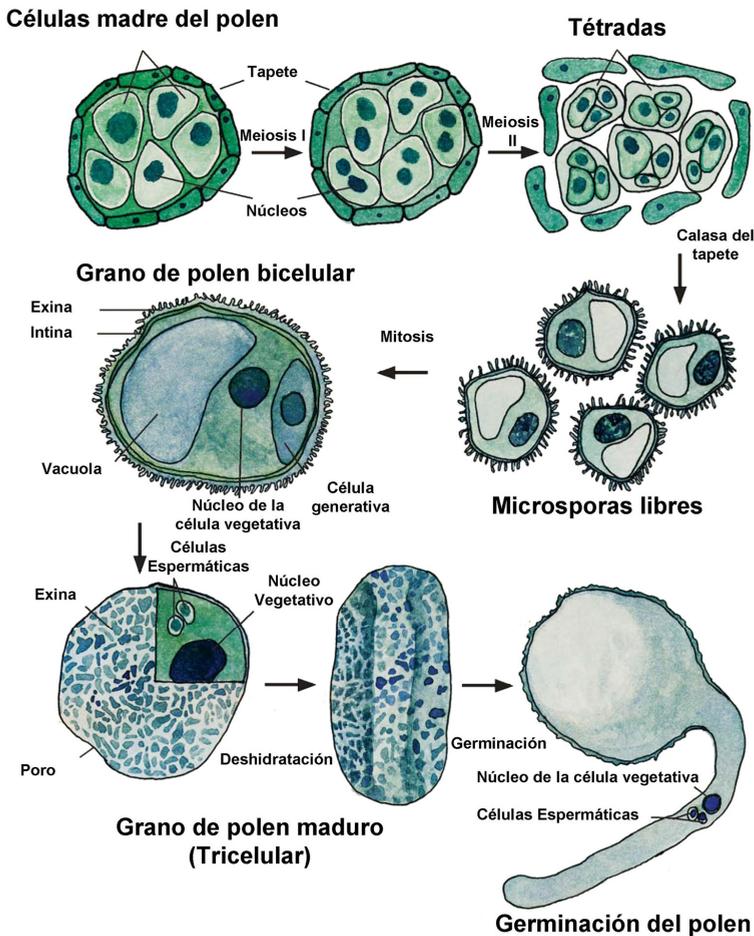


Figura I.4. Esquema de la gametogénesis masculina de *Arabidopsis thaliana*. Modificado de McCormick, (2004).

I.2.3. Análisis genómico funcional en *A. thaliana*

El genoma de *Arabidopsis thaliana*, uno de los más pequeños entre las plantas superiores, está organizado en cinco cromosomas. Además de por su pequeño tamaño, desde un punto de vista de la genética molecular, el genoma de *Arabidopsis thaliana* es muy apropiado para los estudios moleculares por la escasez de secuencias repetitivas de ADN. Estas características permitieron el inicio de un proyecto de secuenciación a gran escala, que concluyó a finales de los años 1990. Además de

tener completamente secuenciado su genoma, actualmente se dispone de un extenso banco de datos de cDNAs, parcialmente secuenciados (ESTs) y detallados mapas físicos y genéticos de los cinco cromosomas con datos de ligamiento de más de 500 genes (Azpiroz-leeahan y Feldmann, 1997).

A estas características debe añadirse la capacidad de realizar cruzamientos de forma relativamente sencilla entre distintas plantas de esta especie, de ser fácilmente transformada y de incorporar mutaciones, lo cual la convierten en un organismo competente para el estudio del efecto/respuesta a diferentes factores endógenos y exógenos (Feldmann y Marks, 1987; Zhu, 2001). Por otra parte, de forma intrínseca, su uso como modelo biológico en los últimos años, ha contribuido positivamente a incrementar su valor como herramienta para la investigación biotecnológica.

Tal como indica Ripio-Samper (2004), esta especie modelo puede ser mutagenizada con bastante facilidad, mediante mutágenos físicos (neutrones rápidos y rayos X), químicos (metanosulfonato de etilo, EMS) o elementos de inserción (transposones y T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*). A finales del siglo XX, se realizaron numerosas mutagénesis sobre *arabidopsis* con el propósito de poder analizar diferentes procesos biológicos (Rédei, 1970, 1975; Estelle y Somerville, 1986; Meyerowitz, 1987, 1989, 2001; Bowman y col., 1988; Griffing y Scholl, 1991; Koornneef y Stam, 1992; Rédei y Koncz, 1992; Berná y col., 1999; Quesada y col., 2000). Además de la posibilidad de ser mutagenizada con gran facilidad, se puede transformar *arabidopsis* utilizando como vector *A. tumefaciens* (Krysan y col., 1999; Brunaud y col., 2002), lo que ha permitido la obtención de multitud de colecciones de mutantes de inserción (Jander y col., 2002; Sessions y col., 2002; Alonso y col., 2003).

El estudio de la función biológica de un gran número de genes secuenciados es uno de los mayores retos de la biología. La genética reversa, basada en la caracterización de los efectos de la pérdida de función de un gen

conocido, tiene una gran importancia para lograr este objetivo. El silenciamiento de genes por cosupresión o mediante secuencias antisentido es un método válido para estudiar la función génica, pero su análisis e interpretación puede resultar complicado (van der Krol y col., 1993; Baulcombe, 1996).

La disrupción génica es una herramienta poderosa para la obtención de mutantes de pérdida de función. Dado que en plantas la mutagénesis dirigida es laboriosa, en los últimos años se han perfeccionado las técnicas de mutagénesis insercional hasta conseguir poblaciones saturadas de mutantes de inserción de T-DNA o transposones (Kempin y col., 1997; Maes y col., 1999), gracias a los cuales se han clonado y caracterizado una gran multitud de genes. Su uso intensivo en investigación ha propiciado la creación de bases de datos de dominio público en las que se ofrecen gran cantidad de herramientas informáticas, así como información acerca de mutantes, polimorfismos de ADN, protocolos de laboratorio y otros aspectos [*The Arabidopsis Genome initiative* (AGI), *Centre national de séquençage* (French genome center), *John Innes Center* (JIC), *Munich information Center for Protein sequences* (MIPS), *Arabidopsis Information Management System* (AIMS), *The Institute for Genomic Research* (TIGR) *Arabidopsis thaliana EST assembly Database*, etc.]. La mayoría de la información relativa a aspectos moleculares de *arabidopsis* está centralizada en TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>). Se ha generado una amplísima colección de alelos mutantes de prácticamente todos los genes de *arabidopsis*, que pueden ser consultados en la página web (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Se han creado varios centros de conservación y distribución de líneas y clones de ADN, dos en Europa (NASC: *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*; *Institut national de la recherche agronomique* (INRA)-*Versailles Genomic Resource Center*), dos en Estados Unidos (ABRC: *Arabidopsis Biological Resource Center*; *Lehle Seeds*) y el tercero en Japón (RIKEN *Bioresource Center* (BRC)/*SENDAI Arabidopsis Seed Stock Center* (SASSC)).

A pesar de que su genoma es reducido, *arabidopsis* presenta las características básicas de otras angiospermas en lo referente a anatomía, crecimiento, morfología, desarrollo y respuestas al ambiente. Los resultados de las investigaciones sobre *arabidopsis* son potencialmente aplicables a cualquier otra planta con flores. Por las características de esta planta, sus estudios pueden generalizarse a la mayor parte de las especies vegetales que el hombre utiliza (Meyerowitz, 1989).

I.3. El metabolismo vegetal y su importancia como diana biotecnológica

En todas las células, unos compuestos se transforman en otros a través de reacciones mediadas por enzimas. Al conjunto de esas reacciones le llamamos metabolismo. Se denomina metabolismo primario a todas aquellas reacciones que intervienen, de forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos. Entre las reacciones pertenecientes al metabolismo primario de las plantas están la fotosíntesis, la respiración, la glicólisis, la síntesis de proteínas, la biosíntesis de aminoácidos, la asimilación de nutrientes y, en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estas reacciones o son parte estructural de las plantas (Figura I.5). Los metabolitos primarios, muy abundantes en la naturaleza, son indispensables para el desarrollo de la planta; se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y su explotación es relativamente barata (Petiard y Bariaud-Fontanel, 1987). Además de los procesos metabólicos primarios y a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos anteriormente descritos, y que se denominan metabolitos secundarios (Figura I.6). Los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de ciertos compuestos primarios, por lo que ambos tipos de metabolismo están interconectados (Figura I.5). Estos compuestos también cumplen funciones esenciales en las plantas

relacionadas principalmente con interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Los metabolitos secundarios, difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a ciertas especies. Tal y como indica Avalos y Pérez-Urria (2009), algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como repelentes o atrayentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de sus semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Los metabolitos secundarios se pueden agrupar en cuatro clases diferentes:

- Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

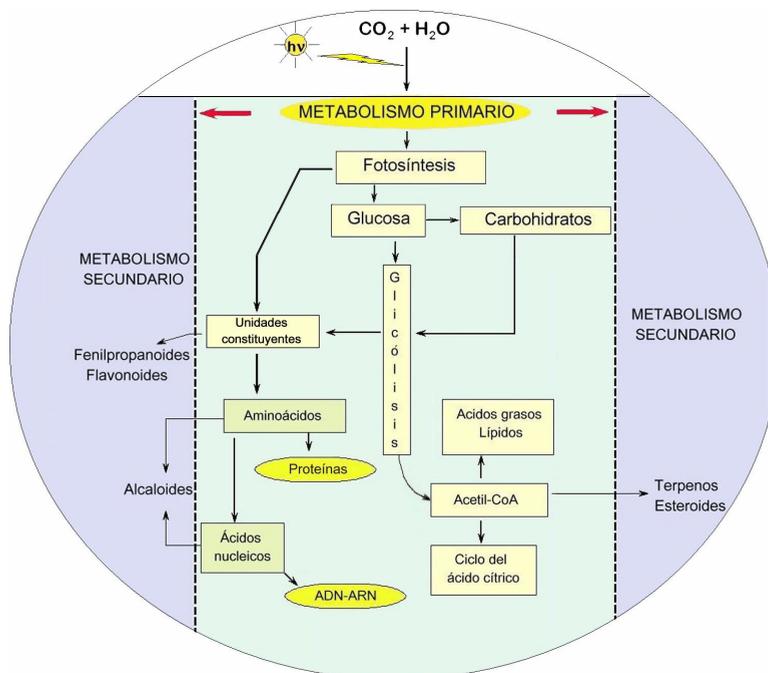


Figura I.5. El metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario en las plantas. Extraído de Ávalos y Pérez-Urria (2009).

Es importante destacar que los metabolitos secundarios también reciben la denominación de productos naturales y tienen un valor medicinal y económico considerable, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

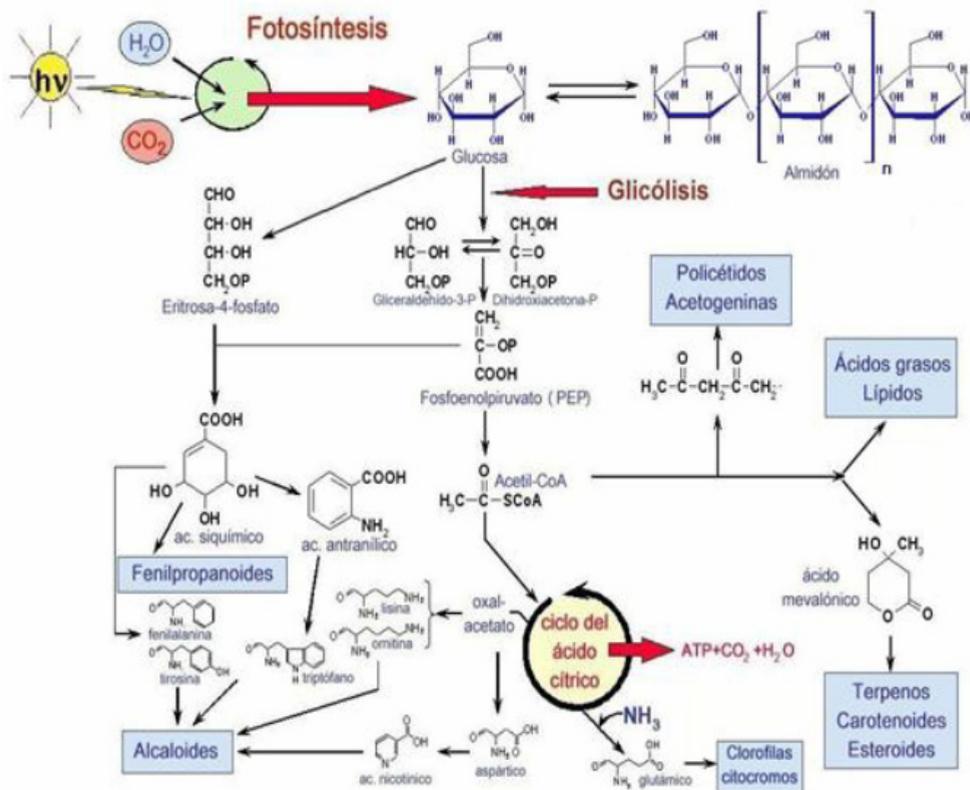


Figura I.6. Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario. Extraído de Ávalos y Pérez-Urria (2009).

El conocimiento sobre el metabolismo vegetal, si bien es verdad que tiene interés por sí mismo, tiene también un interés potencial en su vertiente más aplicada, dado que puede ofrecer beneficios biotecnológicos a medio y largo plazo en la agricultura, la medicina y el medio ambiente. Las enzimas responsables del metabolismo están codificadas por genes, de modo que el conocimiento del genoma completo implica, en principio, el conocimiento del repertorio completo de las enzimas que pueden funcionar en una célula. Como sabemos, cada tipo de célula en un momento dado, expresa un subconjunto del repertorio génico total y lo hace de un modo regulado y coordinado, que determina qué cantidad de cada

enzima se fabrica en cada momento. La transgénesis permite investigar la función de cada enzima estudiando, por ejemplo, qué consecuencias tiene para el metabolismo el bloqueo de su expresión o su sobreexpresión. Además, al poder alterar a voluntad, nucleótido a nucleótido, la región promotora, podemos averiguar de qué secuencias concretas depende la expresión del gen, ya que unos genes responden a la luz, otros al frío y otros a la sequía, por citar algunas condiciones. Aunque la mayoría de las reacciones básicas del metabolismo primario han sido bioquímicamente caracterizadas, la regulación, las interconexiones y el grado de integración de las distintas rutas son muy poco conocidos. En este sentido, muchas, si no la mayoría de las investigaciones en biología vegetal, basadas en la ingeniería metabólica con posibles aplicaciones prácticas, han tenido un éxito limitado debido a la complejidad del metabolismo vegetal. La manipulación de éste tendrá mayor éxito en el futuro si se consigue generar modelos cuantitativos de la totalidad de redes que interconectan las distintas vías metabólicas. Por lo tanto, para poder mejorar la calidad nutricional de los vegetales, es necesario conocer primero con gran precisión la regulación de las rutas metabólicas y cómo interactúan entre sí. Por ello, actualmente se están aunando esfuerzos para poder llegar a la caracterización funcional del metabolismo primario vegetal.

I.4. El plasto

Los plastos son orgánulos celulares, propios de las plantas y algas. Según la “Teoría endosimbiótica”, los eucariotas serían organismos constituidos por simbiosis de varios organismos procariotas, aceptándose actualmente que los plastos, en su inicio fueron organismos procarióticos, por lo que en la actualidad presentan todavía un genoma reducido en su interior. Al poseer su propio ADN tienen la capacidad de llevar a cabo la división independientemente de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula vegetal.

Un cloroplasto procede de un proplasto, originado a su vez por la división de otro plasto, y que después de la exposición a luz se transforma en cloroplasto maduro, diferenciándose de otros tipos de plastos, como los cromoplastos, que almacenan carotenoides, o los amiloplastos que acumulan almidón, por citar algunos ejemplos. Los cloroplastos tienen una doble membrana limitante. La membrana interna emite prolongaciones al espacio interior. Estas prolongaciones son tubulares, pero en algunas zonas se ensanchan y aplanan formando discos. Los discos, a su vez, pueden apilarse para formar estructuras llamadas granum. Túmulos y granum (tilacoides estromáticos y granarios, respectivamente) son el lugar donde se acumulan los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides; Figura I.7).

La fotosíntesis, principal vía de entrada de energía en los seres vivos, se realiza en los cloroplastos. En ellos, se utiliza la energía de la luz solar para activar la síntesis de moléculas de carbono pequeñas y ricas en energía, acompañándose el proceso con la liberación de oxígeno. De estos orgánulos y de su función depende en gran medida la vida sobre la Tierra. El número de cloroplastos por célula varía de unas especies a otras, desde las que tienen uno solo, que se divide sincrónicamente con el núcleo, hasta las que tienen cincuenta o más.

Además de la fotosíntesis, los cloroplastos y plastos no fotosintéticos llevan a cabo otras actividades metabólicas que son esenciales para las plantas, incluyendo la síntesis de aminoácidos, de cofactores enzimáticos, de lípidos y de reguladores de crecimiento (Osteryoung y Weber, 2011).

Los plastos son una importante diana biotecnológica, ya que son responsables de la síntesis de productos de gran interés agrícola, como el almidón y los aceites vegetales, elementos importantes tanto para la alimentación como para la producción de biocombustibles (Maliga y Bock, 2011). Los plastos son también responsables de la producción de una gran variedad de moléculas relevantes para la salud humana, como por ejemplo, los carotenoides, los flavonoides, vitaminas y

ácidos grasos poliinsaturados, todos ellos considerados como fitonutrientes, que desempeñan un papel potencialmente beneficioso para la prevención y tratamiento de enfermedades (Osteryoung y Weber, 2011).

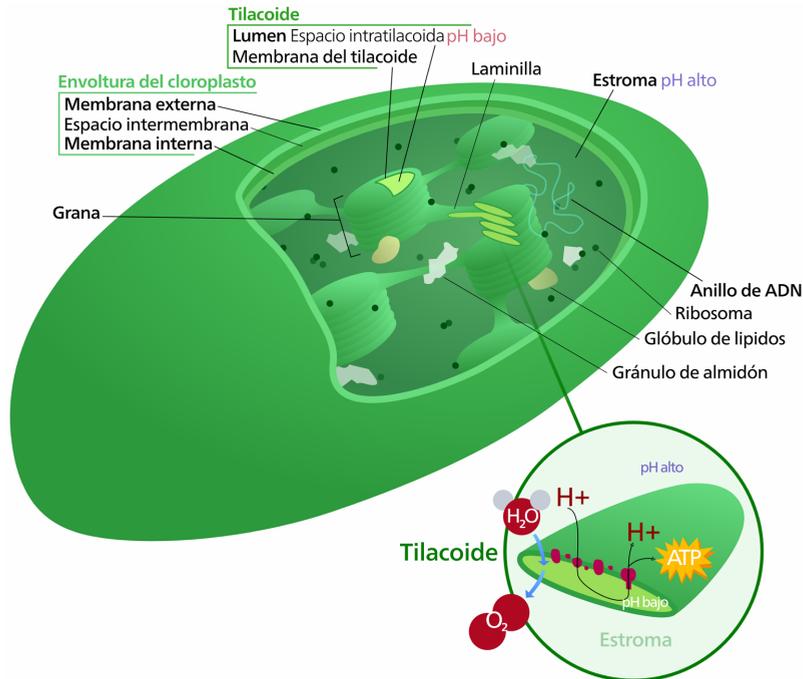


Figura I.7. Representación de un cloroplasto indicando sus partes y donde se realiza la fotosíntesis. Imagen tomada de la página web [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast_\(borderless_version\)-es.svg#file](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast_(borderless_version)-es.svg#file).

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, es necesario comprender tanto las funciones básicas de los plastos en las plantas, las funciones específicas de las enzimas que catalizan las reacciones plastidiales, la regulación de sus vías metabólicas así como su integración con el metabolismo celular. Además de avanzar en el conocimiento básico de las funciones vegetales, el estudio del metabolismo plastidial permitirá posibles aplicaciones prácticas en la agricultura, la biotecnología y la medicina entre otras disciplinas (Osteryoung y Weber, 2011).

I.5. Funciones de la serina

Entre los aminoácidos que pueden ser sintetizados en los plastos se encuentra la serina, que por tener un grupo hidroxilo se considera un aminoácido polar. En animales, la L-serina se clasifica como un aminoácido nutricional no esencial, dado que lo puede generar el organismo a través de la llamada ruta fosforilativa de biosíntesis de serina (RFBS). Además de formar parte de la estructura de las proteínas y de tener una función catalítica en muchas enzimas, tanto en animales como en plantas, la L-serina participa en varios procesos esenciales que incluye la biosíntesis de otros aminoácidos, de bases nitrogenadas, de fosfolípidos y de esfingolípidos. También juega un papel indispensable en varios procesos celulares, como por ejemplo en el metabolismo de moléculas de un carbono, donde es la principal fuente de estas moléculas para las reacciones de metilación de ácidos nucleicos y proteínas vía la generación de S-adenosil metionina (Kalhan y Hanson 2012).

Los mayores avances sobre el conocimiento de la función de la serina se han realizado en animales. Hay evidencias que indican que la L-serina desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular en el sistema nervioso central, así como durante su desarrollo y funcionamiento (Yoshida y col., 2004). Recientemente, también se ha implicado a la L-serina en la proliferación de células cancerosas y en el control del ciclo celular (Locasale y col., 2011; Pollari y col., 2011; Possemato y col., 2011). Otras funciones adjudicadas a la L-serina en animales son: ser necesaria para el correcto metabolismo de las grasas, ayudar a la producción de inmunoglobulinas y anticuerpos, participar en la síntesis de la porfirina, creatina y purina, estimular la síntesis de glucosa en el hígado y evitar la hipoglucemia reactiva (Iturrioz, 2004). Este aminoácido también es un componente primario de la fosfatidilserina, el principal fosfolípido que determina la integridad y fluidez de las membranas celulares. Finalmente, la L-serina es el precursor de la D-serina, que es un neuromodulador bien documentado (Mothet y col., 2000).

Las funciones de la serina en las plantas son menos conocidas que en los mamíferos. La L-serina es un intermediario clave en una serie de vías metabólicas específicas de plantas, como es el metabolismo fotorrespiratorio desde el glicolato hasta el 3-fosfoglicerato (3-PGA; Keys, 1980; Tolbert, 1980; Walton y Woolhouse, 1986). Además, y al igual que en animales la L-serina es importante como precursor de la síntesis de numerosos compuestos esenciales como glicina, triptófano o cisteína, y en la interconversión de la homocisteína y la metionina (Walton y Woolhouse, 1986; Ireland y Hiltz, 1995). También está implicada en la síntesis de esfingolípidos, fosfolípidos, porfirinas, purinas o timidina y es fuente de moléculas de un carbono.

Además de participar en el metabolismo vegetal, se han descrito funciones adicionales no metabólicas para la serina. En este sentido, se ha implicado a la D-serina en un mecanismo de señalización entre el gametofito masculino y el pistilo, que afecta el crecimiento del tubo polínico y la morfogénesis (Michard y col., 2011). Yamaoka y colaboradores (2011) mostraron que los mutantes en fosfatidilserina sintasa (PSS1), una enzima implicada en la biosíntesis de fosfatidilserina, exhiben un fenotipo de fertilidad disminuida debido a la inhibición de la maduración del polen y a una tasa de letalidad embrionaria. Además, los mutantes *pss1* también mostraron un fenotipo de enanismo (Yamaoka y col., 2011).

Por último, hay evidencias que sugieren que la serina puede estar involucrada en las respuestas de las plantas a diversos tipos de estrés ambientales. Así, se ha demostrado que las plantas cultivadas en condiciones de baja temperatura y de elevada salinidad presentan altos contenidos en serina (Ho y Saito, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que plantas de *Arabidopsis* con mayores niveles endógenos de serina son más resistentes a estrés salino (Waditee y col., 2007). No se conoce el mecanismo molecular por el cuál la serina aumentaría la tolerancia de las plantas a estos estreses, aunque se ha relacionado con su participación en la biosíntesis de glicina-betaína. La L-serina es un importante precursor de la anolamina en ciertas halófitas, que posteriormente se convierte en

glicina-betaína, la cual se acumula considerablemente cuando estas plantas están sometidas a estrés ambiental (Stewart y Larcher, 1980).

Todos estos resultados, tanto en animales como en plantas, subrayan el papel fundamental desempeñado por la serina en el metabolismo y en los mecanismos de señalización, por lo que cabe esperar que los procesos de biosíntesis de este aminoácido deban regularse de manera muy exacta para poder controlar correctamente el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

I.6. Rutas de biosíntesis de serina en las plantas

En plantas, se han descrito varias rutas de biosíntesis de serina (Figura I.8). Una de ellas, la llamada ruta del glicolato, está asociada a la fotorrespiración (Tolbert, 1980; Keys, 1980), Además, se han descrito otras dos rutas no fotorrespiratorias llamadas ruta fosforilativa (abreviada anteriormente como RFBS) y ruta del glicerato (Bryan, 1988; Kleczkowski y Givan, 1988; Ho y col., 1998, 1999a, 1999b; Ho y Saito, 2001).

Durante los años 1970-90 varias evidencias, proporcionadas por estudios de marcaje con radioisótopos, efectos de inhibidores y estudios ambientales indicaban la presencia de varias vías de síntesis de serina *in vivo*. Así, Servaites y Ogren (1977) demostraron que inhibiendo químicamente la ruta fotorrespiratoria, la síntesis de serina solo disminuía un 50%, lo que sugería que existían otras vías que podrían jugar un papel importante en su suministro. Basándose en los estudios de inhibidores como el ácido isonicotínico de hidrazida, inhibidor del complejo glicina descarboxilasa (GDC), del butil-2-hidroxi-3-butinoato y del α -hidroxi-piridina-metanosulfonato, inhibidores de la glicolato oxidasa, dos enzimas de la ruta fotorrespiratoria, se pudo determinar que aproximadamente la mitad de la serina se sintetizaba a partir de la vía fotorrespiratoria, mientras que la otra mitad debía de sintetizarse a través de otras rutas cuando se mantienen las plantas en

condiciones con niveles normales de CO_2 y O_2 (Hess y Tolbert, 1966; Servaites y Ogren, 1977; Kaminska y Maleszewski, 1992).

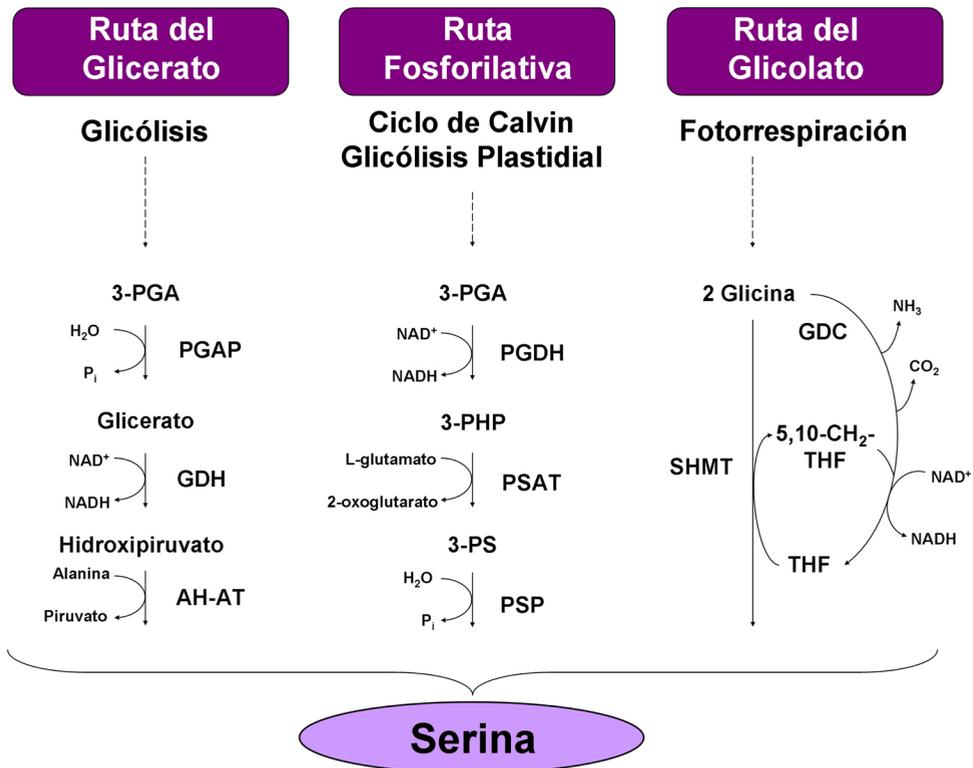


Figura I.8. Representación esquemática de la biosíntesis de serina en las plantas. Las enzimas que participan en cada vía de biosíntesis de serina son las siguientes: Ruta de la fotorrespiración (ruta del glicolato): GDC, glicina descarboxilasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa. Ruta del glicerato: PGAP, 3-fosfoglicerato fosfatasa; GDH, Glicerato deshidrogenasa; AH-AT, Alanina-hidroxipiruvato aminotransferasa. Ruta fosforilativa: PGDH, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa; PSAT, 3-fosfoserina aminotransferasa; PSP, 3-fosfoserina fosfatasa. Abreviaturas utilizadas para los metabolitos: THF, tetrahidrofolato. 5,10 CH_2 -THF, 5,10-metileno tetrahidrofolato. 3-PGA, 3-fosfoglicerato. 3-PHP, 3-fosfohidroxipiruvato. 3-PS, 3-fosfoserina. (Extraído y modificado de Cascales-Miñana y col., 2013).

Somerville y Ogren (1981 y 1982) en experimentos con ^{14}C en arábidopsis mostraron que los mutantes *stm* [serina transhidroximetilasa también llamada serina hidroximetil transferasa (SHMT), implicada en la ruta del glicolato] acumulaban un gran contenido de glicina marcada, pero no de serina marcada, por

lo que la síntesis de serina por esta ruta fotorrespiratoria estaba bloqueada. Por otro lado, Beckmann y colaboradores (1997) habían indicado previamente que los niveles de serina en las hojas de plantas silvestres y en los mutantes *stm* se habían mantenido prácticamente sin cambios durante el crecimiento. Estos resultados indicarían que en los mutantes *stm* la serina no puede ser sintetizada a partir del carbono del glicolato, pero sí a partir de otras rutas metabólicas iniciadas a partir del 3-PGA ya sea a través de 3-fosfohidroxipiruvato (3-PHP) y 3-fosfoserina (3-PS), o a través de glicerato e hidroxypiruvato (Platt y col., 1977).

Experimentos de Wingler y colaboradores (1997) con plantas de cebada con actividad reducida del complejo GDC (implicado en la ruta del glicolato) y en condiciones de alta fotorrespiración (iluminación elevada y baja concentración de CO₂) mostraron que el contenido de glicina aumentó bastante en las hojas, mientras que no hubo una disminución fuerte sobre el contenido de serina. De esta manera se volvía a indicar la existencia de otra vía alternativa para la biosíntesis de serina.

Otros experimentos realizados con *Lemna* mostraron que la serina provenía principalmente del 3-PGA, especialmente en las plantas cultivadas en presencia de amonio (Marques y col., 1985). En experimentos con altas concentraciones de CO₂, que reducen la proporción de la serina sintetizada a través de la vía del glicolato, debido a la competencia entre CO₂ y O₂ por el sitio activo de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), indicaron que la concentración de serina no disminuyó proporcionalmente en comparación con la disminución de la glicina, sugiriendo también la existencia de otras rutas no fotorrespiratorias de biosíntesis de serina en las plantas. Además, otros autores mostraron que la contribución relativa de estas rutas alternativas podía aumentarse si se suministraba 3-PGA como un precursor potencial de serina (Snyder y Tolbert, 1974; Platt y col., 1977).

De todas estas investigaciones se puede inferir que las vías no fotorrespiratorias desempeñan un papel importante en el suministro de serina a las

plantas, sugiriéndose que las tres rutas biosintéticas de serina comentadas anteriormente deben interactuar con el fin de mantener la homeostasis de este aminoácido en las células vegetales. No obstante y aunque la síntesis de serina a través de la ruta del glicolato ha sido considerada la más importante cuantitativamente, al menos en las células fotosintéticas, la importancia biológica de cada una de estas tres rutas era desconocida. Específicamente, seguía sin conocerse la contribución exacta de cada ruta al contenido total de serina en diferentes tejidos y órganos, la integración de las vías y su regulación.

1.6.1. La ruta del glicolato

La fotorrespiración es una ruta metabólica asociada a los organismos fotosintéticos en la cual la enzima Rubisco en vez de utilizar el CO_2 atmosférico para fijarlo a una molécula de ribulosa-1,5-bisfosfato utiliza el O_2 como sustrato. Consecuencia de ello se forma una molécula de 3-PGA y otra de 3-fosfoglicolato que mediante la ruta que lleva su nombre es recuperado parcialmente en forma de 3-PGA (Figura I.9). El glicolato es tóxico e inhibe varias enzimas del ciclo de Calvin por lo que ha de ser eliminado. Para ello es transportado desde el cloroplasto, donde se produce, al peroxisoma, donde es modificado por la enzima glicolato oxidasa utilizando O_2 , produciendo por una parte peróxido de hidrógeno y por otra glioxilato. Posteriormente, la enzima serina/glioxilato aminotransferasa (SGAT) transamina el glioxilato, añadiéndole nitrógeno, y forma el aminoácido glicina. Dos moléculas de este aminoácido son llevadas a la mitocondria, donde finalmente se transforman en tres compuestos: serina, amoníaco y CO_2 , siendo catalizada esta reacción por el complejo multienzimático GDC y por la SHMT. El CO_2 se libera y el amoníaco se recicla mediante el ciclo fotorrespiratorio del nitrógeno. La serina puede transportarse a otros compartimentos celulares, para ser utilizada en procesos metabólicos, o regresa al peroxisoma, donde se transforma en hidroxipiruvato mediante SGAT. El hidroxipiruvato, mediante la enzima hidroxipiruvato reductasa, se convierte en glicerato, que es llevado al cloroplasto

donde, mediante el gasto de una molécula de adenosín trifosfato (ATP) por la enzima glicerato quinasa, se reintegra al ciclo de Calvin como 3-PGA.

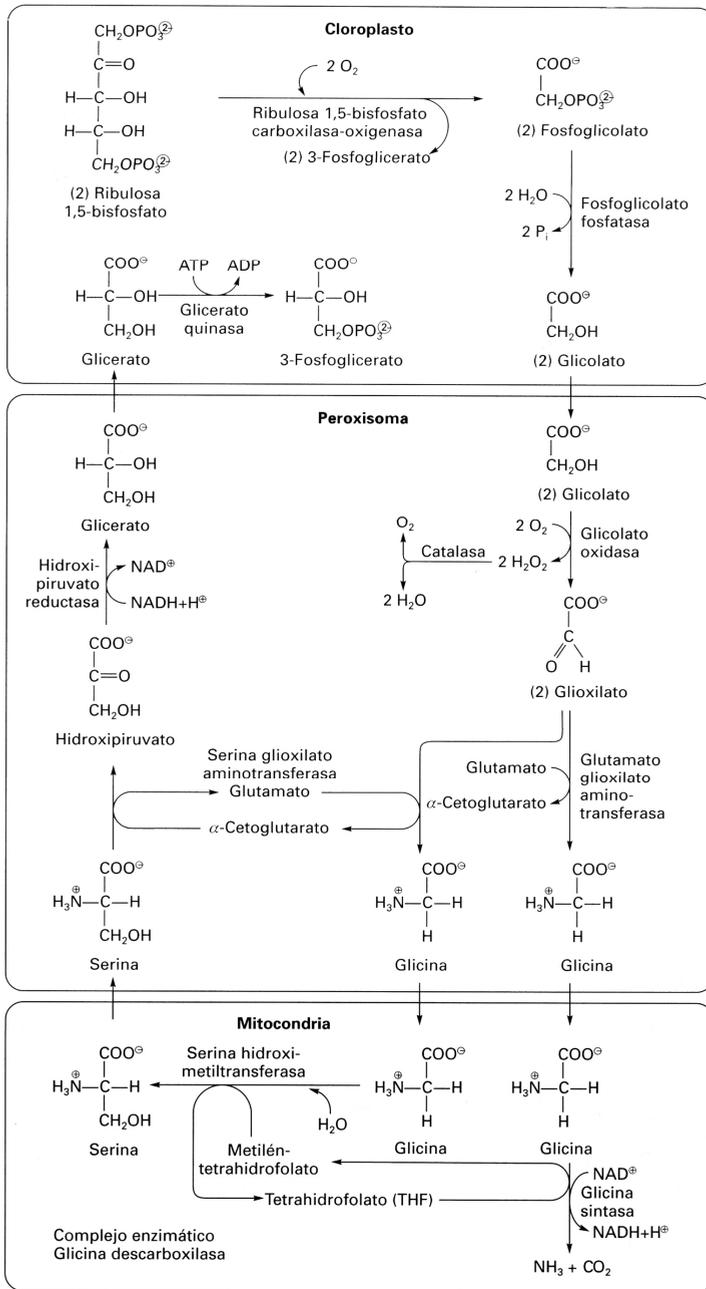


Figura I.9. Ciclo de la fotorrespiración. Extraído y modificado de Azcón-Bieto y Talón, 2008.

I.6.2. La ruta del glicerato

En esta ruta se formaría serina por desfosforilación de 3-PGA e incluye algunas de las reacciones reversas del ciclo fotorrespiratorio (Kleczkowski y Givan 1988). En esta ruta participan las enzimas 3-fosfoglicerato fosfatasa (catalizando la primera reacción en la que se transforma el 3-PGA a glicerato), la glicerato deshidrogenasa (cataliza la formación de hidroxipiruvato a partir del glicerato) y la alanina hidroxipiruvato aminotransferasa, que cataliza la última reacción de esta ruta, generando serina a partir del hidroxipiruvato (Figura I.10). La existencia de estas actividades enzimáticas parece demostrar el posible funcionamiento de esta vía en las plantas (Kleczkowski y Givan 1988). Sin embargo, no está claro que esta vía sea funcional en plantas, ya que hasta la fecha los genes que codifican para las enzimas específicas de la vía no han sido clonadas y/o caracterizadas.

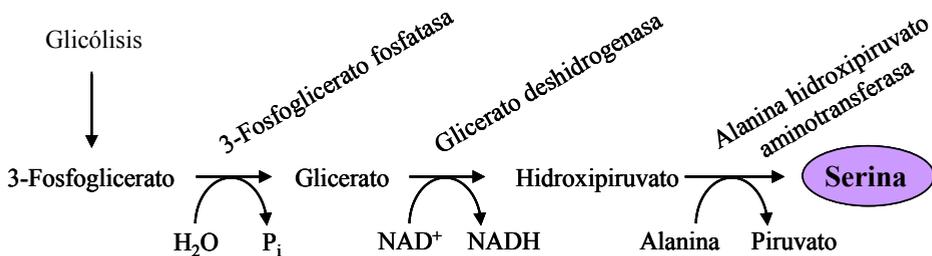


Figura I.10. Ruta del glicerato de síntesis de serina

I.6.3. La ruta fosforilativa de biosíntesis de serina

En esta ruta, la serina se sintetiza en los plastos a partir del precursor 3-PGA (Handford y Davies 1958). La evidencia bioquímica que apoyó la ruta fosforilativa en plantas derivó de la caracterización de las actividades enzimáticas de la vía por diferentes autores (Larsson y Albertsson 1979; Walton y Woolhouse, 1986).

Esta vía fosforilativa, que se conserva tanto en mamíferos como en plantas, define un punto de bifurcación de la glicólisis en el 3-PGA y comprende tres enzimas que catalizan tres reacciones secuenciales: la enzima PGDH, la 3-fosfoserina aminotransferasa (PSAT) y la 3-fosfoserina fosfatasa (PSP). El intermediario glicolítico 3-PGA se oxida por la PGDH utilizando NAD^+ como cofactor para formar 3-PHP, que a su vez se convierte en 3-PS por PSAT (Figura I.11). En el paso final, una desfosforilación de 3-PS por la PSP produce serina (Kleczkowski y Givan, 1988).

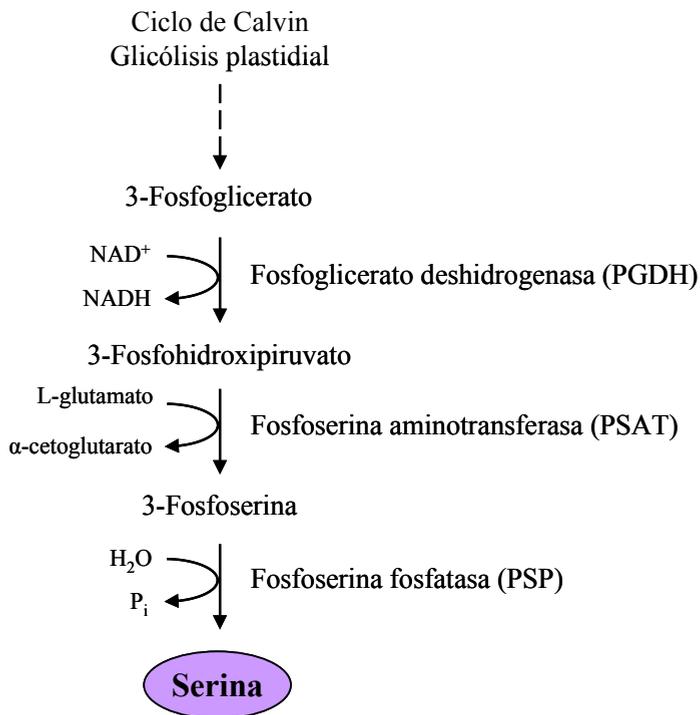


Figura I.11. Ruta fosforilativa de biosíntesis de serina.

En los últimos años, ha aparecido información que relaciona la RFBS con el control de la proliferación celular y la oncogénesis en los mamíferos. En este sentido, un aumento del flujo de la vía fosforilativa incrementa la tasa de proliferación celular asociada con ciertos cánceres de mama (Bachelor y col., 2011;

Locasale y col., 2011; Pollari y col., 2011; Possemato y col., 2011). Por el contrario, la inhibición del flujo de la RFBS provoca una restricción en la proliferación celular tumoral (Possemato y col., 2011).

A finales del siglo XX, con el inicio de las herramientas de biología molecular, se clonaron y se caracterizaron bioquímicamente tres genes de la RFBS en plantas que codifican para las enzimas PGDH, PSAT y PSP (Ho y col., 1998, 1999a, 1999b; Ho y Saito, 2001). Desde entonces, no se había investigado más esta ruta y por tanto no había sido caracterizada funcionalmente, probablemente debido a que había sido considerada de menor importancia en comparación con la ruta del glicolato. Se había sugerido que podría tener un papel relevante en los tejidos o en procesos donde no se realiza la fotosíntesis (por ejemplo las raíces, desarrollo y germinación de las semillas, etc.), pero no se habían aportado pruebas genéticas y/o moleculares que lo confirmasen. También se había propuesto que en los tejidos verdes, durante el día, la ruta fosforilativa tendría una menor importancia, en comparación con la ruta del glicolato, dado que la planta está fotorrespirando; no obstante, la RFBS podría ser importante en oscuridad o en las primeras etapas del desarrollo de las hojas (Ho y Saito, 2001).

Como se comentó anteriormente, la contribución exacta de cada ruta al contenido total de serina en los distintos tejidos y órganos, cómo se regula cada una de ellas y cómo se integran siguen siendo desconocidos.

I.7. Las enzimas de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina

Como ya se ha comentado en el Apartado I.6.3, la RFBS consta de tres pasos catalizados por tres actividades enzimáticas distintas (PGDH, PSAT y PSP). En relación con la primera reacción de la ruta, Slaughter y Davies (1968) observaron que la actividad de la PGDH en los extractos de guisante se inhibía por serina. Sin embargo, Larsson y Albertsson (1979) no pudieron encontrar ninguna inhibición de la enzima en extractos de cloroplastos de espinacas en presencia del

aminoácido o de su forma fosforilada (fosfoserina). Por lo tanto, en este punto existe controversia en cuanto a si los niveles de serina pueden modular el flujo metabólico de esta ruta de síntesis.

A finales de los años 90, Ho y colaboradores (1999b) clonaron un cDNA del gen que codifica para una isoforma de la PGDH de *Arabidopsis* de 623 aminoácidos (con una masa molecular de 66,4 kDa) que fue caracterizada bioquímicamente.

El análisis y comparación del cDNA y del ADN genómico del gen *PGDH* identificado por Ho y colaboradores (1999b), permitió concluir que este gen está compuesto por tres exones y dos intrones. Los resultados del análisis de Southern blot y del análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) confirmaron que el gen *PGDH* en *Arabidopsis* es un gen de copia única que se encuentra en la parte superior del cromosoma 1 entre los marcadores g3786 y g3829 (Ho y col., 1999b).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la PGDH identificada por Ho y colaboradores (1999b), mostró que poseía una señal de tránsito para su transporte dentro del plasto de unos 60 aminoácidos. Este péptido presenta unas características determinadas: se inicia con metionina-alanina, es rico en aminoácidos hidroxilados como serina y treonina (19/60), presenta alanina y valina como aminoácidos pequeños hidrofóbicos (13/60), es deficiente en aminoácidos ácidos como aspártico y glutámico (1/60) y por último tiene una carga neta positiva con un punto isoeléctrico de 11,5 (Ho y col., 1999b). Ho y colaboradores (1999a) proporcionaron evidencias experimentales de que la proteína PGDH se encontraba en los cloroplastos utilizando fusiones de PGDH con la proteína verde fluorescente (GFP).

En cuanto a la expresión de *PGDH*, Ho y colaboradores (1998 y 1999b) mostraron que el gen se expresa tanto en parte aérea como en las raíces, aunque de forma mayoritaria en estas últimas y sobre todo en presencia de luz, de forma

similar a las expresiones de los genes *PSAT* y *PSP*, aunque estos últimos también tienen bastante expresión en la parte aérea. Por el contrario, la expresión de los genes de la proteína H (una subunidad del complejo multienzimático GDC) y de *SHMT*, ambos responsables de la biosíntesis de serina en la vía fotorrespiratoria, se encontraba únicamente en hojas siendo mayoritaria en presencia de luz (Figura I.12). Ho y colaboradores (1999a) sugirieron que la RFBS podría ser la principal vía biosintética de serina, tanto en tejidos verdes como no verdes, durante la oscuridad, cuando la tasa fotorrespiratoria es baja. No obstante estas sugerencias contradicen sus propios resultados puesto que no dejaban claro por qué había más expresión de *PGDH* en raíces durante el periodo de luz que durante el de oscuridad.

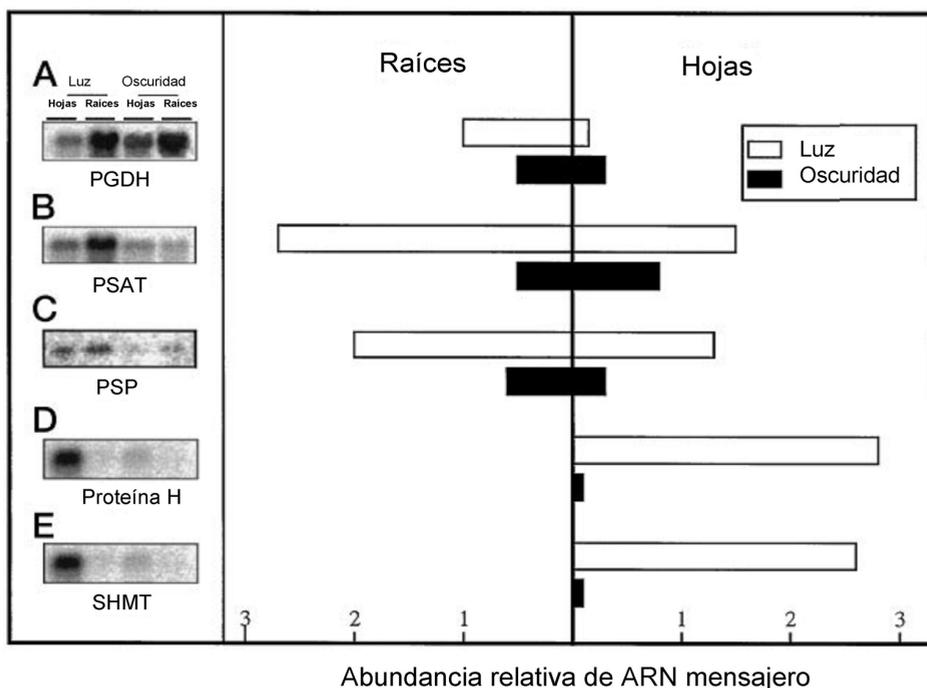


Figura I.12. Expresión de genes implicados en la biosíntesis de serina de *Arabidopsis thaliana*. El panel de la izquierda muestra el resultado del análisis Northern blot, el panel de la derecha muestra la cuantificación relativa de la abundancia de los ARN mensajeros. Modificado de Ho y col (1999a).

Un estudio filogenético de la proteína PGDH de arabidopsis, comparada con la de otras siete especies, demostró que la PGDH de arabidopsis, *Bacillus subtilis*, *Synechocystis* spp, rata y del ser humano forman una familia distinta de las otras PGDH de bacterias (*Escherichia coli* y *Haemophilus influenza*), y de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*; Figura I.13; Ho y col., 1999a).

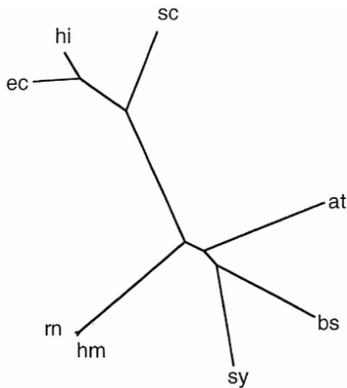


Figura I.13. Árbol filogenético de las proteínas PGDH. Abreviaciones: at: *Arabidopsis thaliana*, bs: *B. subtilis*, sy: *Synechocystis* spp, rn: *rattus norvegicus*, hm: *Homo sapiens*, sc: *Saccharomyces cerevisiae*, hi: *Haemophilus influenza*, ec: *E. coli*. Extraído de Ho y col., (1999b).

La segunda enzima de la RFBS, la PSAT, cataliza la transaminación del glutamato hasta α -glutarato, produciendo 3-PS a partir de 3-PHP. Lund y colaboradores (1987) purificaron y estudiaron las propiedades de la enzima PSAT del hígado de bovino y constataron que la PSAT es un dímero con unidades de mismo peso molecular.

En las plantas se ha demostrado que PSAT se localiza en los plastos (Reynolds y Belvins, 1986). A finales de los años 1990, Stolz y Dörnemann (1994) purificaron y caracterizaron la proteína PSAT del alga verde, *Scenedesmus obliquas*, y al medir su actividad observaron unos altos niveles en condiciones normales de CO₂ (con un nivel de fotorrespiración bajo).

Esta enzima también se ha estudiado en arabidopsis. Así, mediante la clonación molecular y la caracterización bioquímica de la PSAT, se ha demostrado que se acumula preferencialmente en las hojas y raíces de las plantas cultivadas en presencia de luz (Stolz y Dörnemann 1994). Estos autores también mostraron que

el gen codificante de esta enzima se expresa en todos los tipos celulares pero con una gran expresión a nivel del meristemo apical de la raíz. El análisis del Northern blot mostrado en la Figura I.12 corrobora el resultado anterior y mostró una expresión preferencial del gen *PSAT* en las condiciones de crecimiento de la planta en presencia de luz (Ho y col., 1998).

La última enzima de esta ruta, la PSP, ha sido estudiada y caracterizada en *arabidopsis*. Como se ha comentado anteriormente, estudios realizados por Ho y colaboradores (1999b) mostraron que el gen *PSP* presenta una expresión preferencial en raíces en condiciones de luz, mientras en condiciones de oscuridad se observó una expresión mucho menor tanto en raíces como en parte aérea (Figura I.12; Ho y col., 1999b). Según estos autores, la expresión del gen *PSP* es consistente con la expresión de *PGDH* y *PSAT*. Los tres genes se expresan preferentemente en raíces y en presencia de luz (Figura I.12; Saito y col., 1997; Ho y col., 1998 y 1999a), lo que indica que la vía fosforilativa puede desempeñar un papel importante en el suministro de serina a la raíz u otros tejidos no fotosintéticos en los que las tasas de fotorrespiración son bajas.

A pesar de que algunos genes de la vía fosforilativa han sido clonados y sus enzimas caracterizadas bioquímicamente en *arabidopsis* (Ho y Saito, 2001; Ho y col., 1998, 1999a, 1999b), hasta muy recientemente no existía ninguna evidencia genética que proporcionase información sobre la función de estos genes y/o conocimiento sobre la red de regulación que controla esta ruta.

En nuestro laboratorio se caracterizó funcionalmente la familia glicolítica plastidial de las gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasas (GAPCps) de *arabidopsis*, mostrando que los dobles mutantes *gapcp1gapcp2* presentan un fenotipo drástico del desarrollo, como son la disminución del crecimiento de la raíz primaria, el enanismo y la esterilidad masculina (Figura I.14). Además estos mutantes presentan alteraciones en los niveles de carbono y azúcares. Los autores de estos trabajos demostraron que los dobles mutantes *gapcp1gapcp2* son

deficientes en serina en las raíces, y que si se suplementa el aminoácido al medio de cultivo se recupera el crecimiento de la raíz (Figura I.15), se restauran los niveles normales de azúcares y las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Con todos estos resultados, los autores propusieron que la actividad de las GAPCps es esencial para abastecer el precursor 3-PGA a la RFBS en los plastos de los órganos no fotosintéticos (Muñoz-Bertomeu y col., 2009, 2010a, 2010b, 2011a, 2011b).

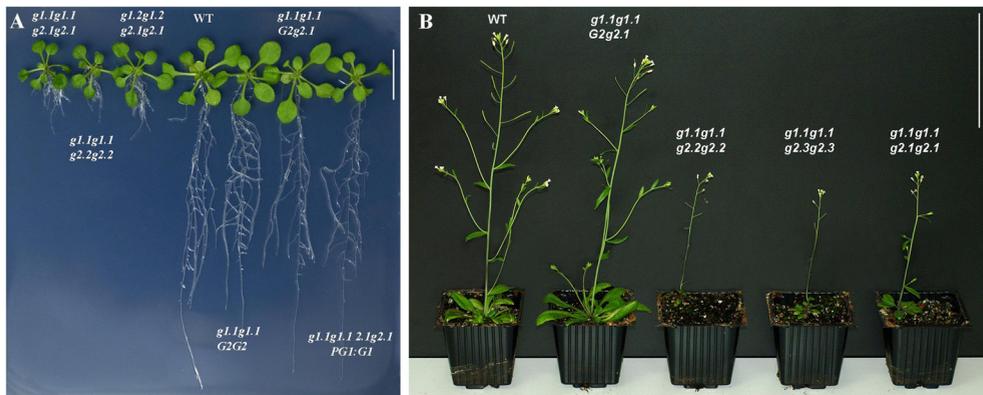


Figura I.14. Caracterización fenotípica de los mutantes *gapcp* y sus líneas complementadas. A) fenotipo radicular de los mutantes *gapcp*. Las plantas fueron cultivadas durante 18 días en placas con medio MS1/5. Los dobles mutantes (*g1.1g1.1 g2.1g2.1*, *g1.1g1.1 g2.2g2.2* y *g1.2g1.2 g2.1g2.1*) mostraron una reducción de su desarrollo radicular. Los mutantes simples (*g1.1g1.1 G2G2*), las líneas heterocigotas (*g1.1g1.1 G2g2.1*), y el doble mutante *gapcp* complementado con una construcción portadora del ADN genómico de *GAPCp1* (*g1.1g1.1 g2.1g2.1 PG1: G1*) presentan un desarrollo normal de la raíz, en comparación con las plantas control (WT). B) plantas doble mutantes *gapcp* (*g1.1g1.1 g2.1g2.1*, *g1.1g1.1 g2.2g2.2* y *g2.3g2.3 g1.1g1.1*) enanas en su etapa adulta. Plantas heterocigotas (*g1.1g1.1 G2g2.1*) fueron similares a las plantas silvestres. Para simplificar la nomenclatura, *g* significa *gapcp*. Escala = 1 cm (A), 5 cm (B). Para más detalle esta figura ha sido extraída y modificada de Muñoz-Bertomeu y col (2009).

A partir de estos resultados, se podría sugerir que la RFBS podría desempeñar un papel importante en los eventos específicos del desarrollo de la planta, tales como desarrollo de las raíces y las anteras. Por ello, nuestro grupo abordó la caracterización funcional de la RFBS en arábidopsis, mediante una estrategia de ganancia y pérdida de función.

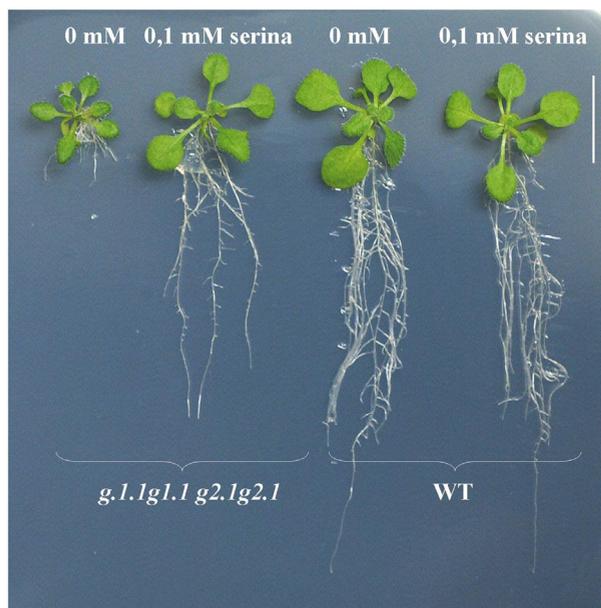


Figura I.15. Crecimiento de plántulas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* donde la serina restablece el crecimiento normal de la raíz en el doble mutante *gapcp1gapcp2*. En el experimento, semillas silvestres (WT) y doble mutante *gapcp* (*g1.lg1.1 g2.lg2.1*) se germinaron en un medio de cultivo MS1/5 de 8 a 10 días, para luego ser trasplantadas a un segundo medio suplementado con 0.1 mM de serina. Para simplificar la nomenclatura, *g* significa *gapcp*. Escala = 1 cm. Figura modificada de Muñoz-Bertomeu y col (2009).

Un estudio reciente de nuestro grupo sobre la PSP (Cascales-Miñana y col., 2013), muestra que la falta de actividad de la enzima durante el desarrollo embrionario provoca un retraso en su crecimiento, lo que conduce a que los embriones aborten en un estado que se puede clasificar como de embrión cotiledonar (Figura I.16). El fenotipo letal de los embriones en plantas mutantes para el gen *PSP1* pudo complementarse con un cDNA *PSP1* bajo el control del promotor constitutivo *35S*. Sin embargo, esta construcción que presenta expresión baja o nula en el tapete de la antera, no permitió complementar la fertilidad de los mutantes. Los granos de polen de estas líneas no son viables y tienen la misma morfología que los descritos para los dobles mutantes *gapcp1gapcp2* (Muñoz-Bertomeu y col., 2010a). El desarrollo de las microsporas en estas líneas *pspl.1pspl.1 Pro35S:PSP1* se detuvo en la etapa de microspora polarizada. En relación con esto, los mutantes *pspl* muestran un retraso en el desarrollo e irregularidades en el tapete de la antera (Figura I.17). La expresión en el tapete del gen *PSP1* en las etapas críticas del desarrollo de las microsporas sugiere que la actividad PSP en esta capa de células es un requisito esencial en el desarrollo del polen (Figura I.18). Además de tener embriones letales y anteras con polen estéril,

los mutantes condicionales *psp1* (mutantes *psp1* transformados con un cDNA de *PSP1* bajo el control de un promotor inducible por choque térmico) son viables, pero muestran un fenotipo de raíz corta que fue revertido en presencia de serina. Igual que ocurría con los dobles mutantes *gapcp1gapcp2* (Figura I.19 y I.15, respectivamente). Estudios metabolómicos con plantas silvestres, silenciadas para el gen *PSP1*, y con plantas sobreexpresoras mostraron que la RFBS juega un papel crucial en el metabolismo vegetal al afectar a la glicólisis, al ciclo de los ácidos tricarbónicos y a la biosíntesis de aminoácidos sugiriendo que esta vía de síntesis de serina es un importante eslabón de conexión entre el metabolismo primario y el desarrollo.

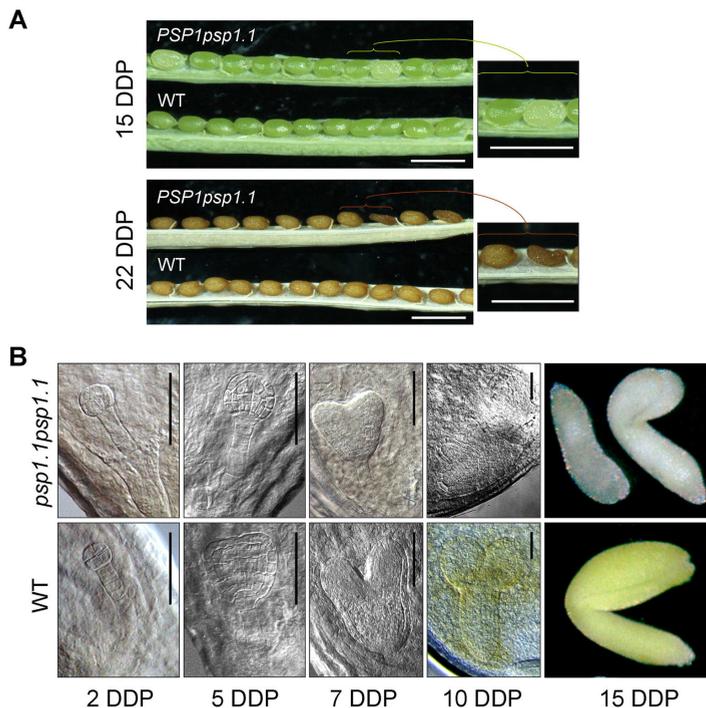


Figura I.16. Estadios de desarrollo de los embriones y semillas en mutantes homocigotos *psp1* y plantas control. A) Silicuas de plantas control (WT) y de plantas heterocigotas *PSP1psp1.1* en un estadio de desarrollo 15 y 22 días después de la polinización (DDP). En la silicua *PSP1psp1.1* una población de semillas de diferentes genotipos es observada. Las fotografías de la derecha muestran un detalle de algunas semillas mutantes *psp1*. Barras = 1 mm. B) Las microfotografías muestran el desarrollo de embriones WT y *psp1.1psp1.1* de la misma silicua en diferentes estados de desarrollo embrionario. Barra = 50 μ m. Figura modificada de Cascales-Miñana y col. (2013).

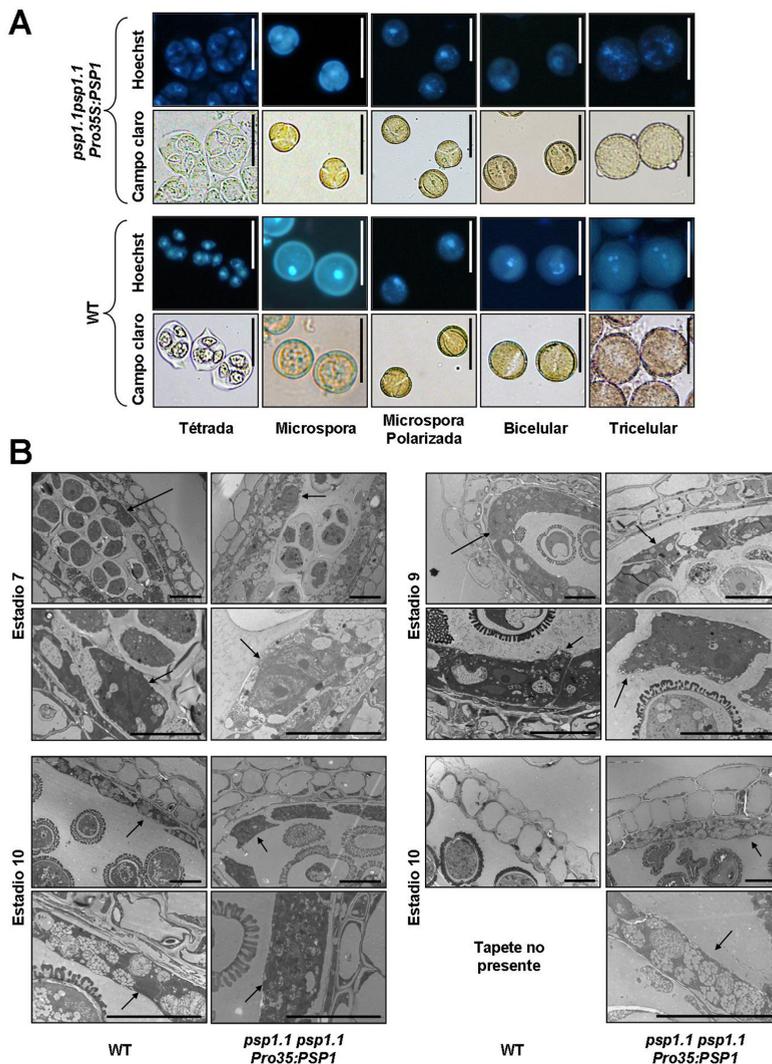


Figura I.17. La expresión del gen *PSPI* es esencial para el desarrollo del tapete y del polen. **A)** Análisis del desarrollo del polen (de tétrada a estadio tricelular) en plantas control (WT) y plantas mutantes *psp1* transformadas con una construcción que lleva el cDNA *PSPI* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Se muestran las imágenes de campo claro y de la tinción con Hoechst. Barra = 25 μ m. **B)** Análisis por microscopía electrónica de transmisión del desarrollo de la antera [de estadios 7 a 12 de acuerdo con Sanders y col (1999) en plantas WT y plantas homocigotos *psp1* transformadas con el mismo vector que en A]. En cada estadio y genotipo la imagen de abajo es un detalle magnificado de las células del tapete. Las flechas indican células del tapete. Barra = 20 μ m. Figura modificada de Cascales-Miñana y col. (2013).

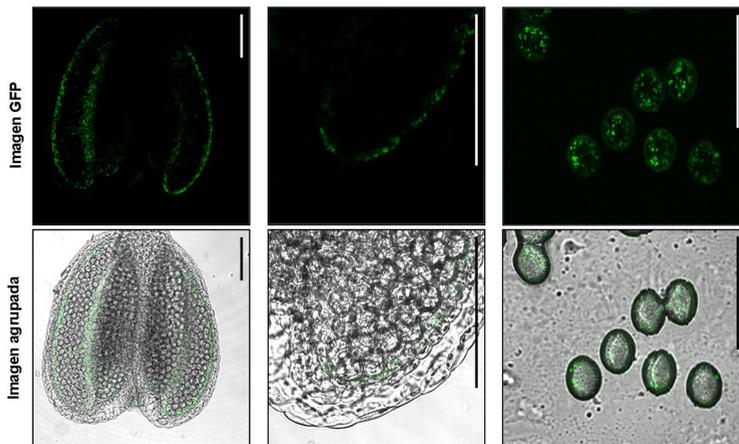


Figura I.18. Expresión del gen *PSP1* en el tapete y polen en diferentes estadios de desarrollo (estadio 9 y 12 en la antera y polen, respectivamente según Sanders y col., 1999) visualizado por microscopía confocal en plantas transformadas con una construcción que lleva el cDNA *PSP1* fusionado a GFP en C-terminal bajo el control del propio promotor del gen *PSP1*. Barras = 75 μ m. Figura modificada de Cascales-Miñana y col. (2013).

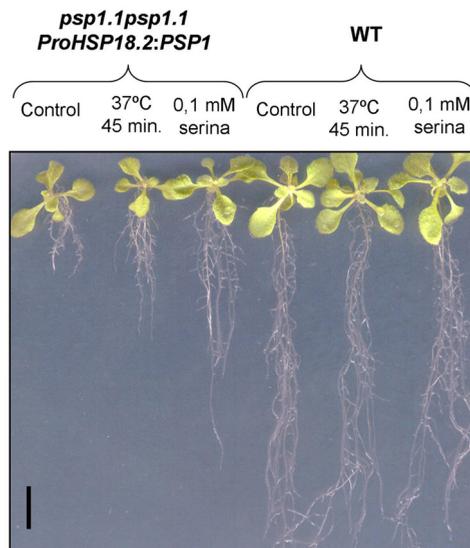


Figura I.19. El aminoácido serina rescata el desarrollo de la raíz en mutantes condicionales *psp1*. Se utilizaron semillas de plantas control (WT) y de mutantes *psp1* condicionales obtenidos tras transformar plantas heterocigotas *PSP1psp1.1* con una construcción que lleva el cDNA del gen *PSP1* bajo el promotor inducible por choque térmico del gen *HSP18.2*. Estas semillas germinaron en medio MS1/5 durante 8-10 días y posteriormente se transfirieron a placas de MS1/5 suplementadas o no con 0,1 mM de serina. El mismo experimento se realizó también con plantas tratadas con choques térmicos cada dos días (37°C 45 minutos). Barra = 1 cm. Figura extraída de Cascales-Miñana y col. (2013).

En esta tesis doctoral proporcionamos nuevos conocimientos sobre las funciones básicas de la RFBS en arabisopsis. En concreto, se ha procedido a la caracterización molecular y funcional de tres genes que codifican para posibles isoformas de la PGDH (*PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se enmarca en un proyecto más amplio que tiene como objetivo final profundizar en el conocimiento de las rutas de biosíntesis del aminoácido serina en las plantas; se pretende esclarecer tanto las aportaciones de cada una de ellas a los flujos metabólicos así como su interconexión y relación con el desarrollo. En concreto, en esta tesis se estudia la RFBS utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

- 1) Identificar genes candidatos que codifiquen para la primera enzima de la RFBS, la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH).
- 2) Caracterizar molecularmente los genes identificados, a los que llamamos genes de la familia PGDH.
- 3) Caracterizar molecular, genética y fenotípicamente los mutantes y las líneas sobreexpresoras de los genes de la familia PGDH.
- 4) Estudiar los cambios metabólicos que se producen en los mutantes y plantas sobreexpresoras de los genes de la familia PGDH.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material vegetal

La especie vegetal utilizada en esta tesis doctoral ha sido la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las semillas de arabidopsis del ecotipo Columbia, (Col 0, N1092) fueron suministradas por el NASC (Scholl y col., 2000) y se usaron como control silvestre y para generar líneas transgénicas sobreexpresoras de los distintos genes estudiados. Además de este control silvestre, como material de partida se emplearon varias líneas mutantes por inserción de T-DNA y por transposones provenientes también del NASC. Se trata de los mutantes de los 3 genes de la familia de la fosfoglicerato deshidrogenasa: *PGDH* (At1g17745), *3-PGDH* (At3g19480) y *EDA9* (At4g34200). Las semillas proporcionadas por el NASC (T₃ segregantes generadas por infiltración con *A. tumefaciens*) fueron analizadas para obtener mutantes homocigotos simples. Para la enzima PGDH se utilizaron las líneas que nombramos como *pgdh1pgdh1* (SALK_048256) y *pgdh2pgdh2* (SALK_149747), que corresponden a líneas independientes que llevan alelos mutantes del locus At1g17745 por inserción de un T-DNA en el gen. Para la enzima 3-PGDH, se trabajó con las líneas *3-pgdh1 3-pgdh1* (SM_3_37584) y *3-pgdh2 3-pgdh2* (GK_877F12), y para la enzima EDA9, se pidieron las semillas de los mutantes que tenían las inserciones que llamamos *eda9.1* (GK_155B09), y *eda9.2* (GK_867A04).

Los mutantes de la enzima PGDH son todos del SALK y fueron obtenidos por la transformación de plantas con el plásmido pROK2 (Figura III.1).



Figura III.1. Esquema del T-DNA del plásmido pROK2. Extraído de Schmidt y Bancroft (2011).

El mutante *3-pgdh1 3-pgdh1* (SM_3_37584) fue obtenido por inserción de un transposon SM “*Suppressor-Mutator*” y fue generado transformando las plantas con un plásmido que tiene un T-DNA como el mostrado en la Figura III.2.

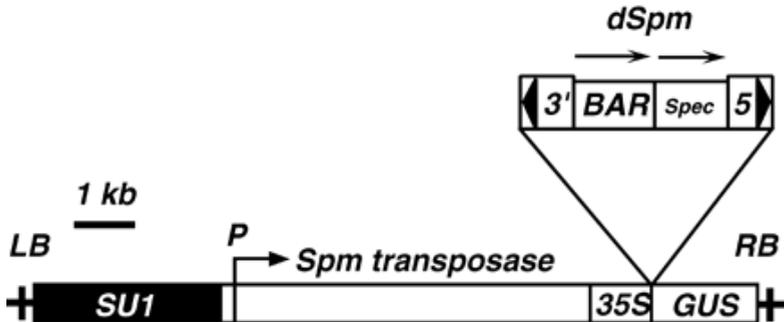


Figura III.2. Esquema del T-DNA del plásmido utilizado por Tissier y colaboradores (1999) para obtener la colección por inserción de transposones.

Las líneas con los alelos *3-pgdh2* (GK_877F12), *eda9.1* (GK_155B09) y *eda9.2* (GK_867_A04) pertenecían a la colección GABI Kat y fueron obtenidas por la inserción del T-DNA del plásmido pAC161 (Figura III.3) en las plantas de arabis.

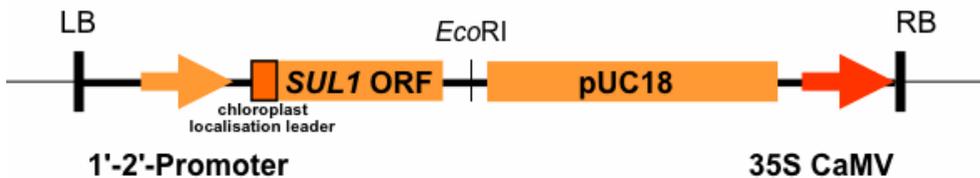


Figura III.3. Esquema del T-DNA del plásmido pAC161. Extraído de la web <http://www.gabi-kat.de/faq/vector-a-primer-info.html>

Las principales características de estos vectores se detallan a continuación.

El vector pROK2, con un tamaño de 12883 pb, es un plásmido derivado del vector pBIN19 (van Engelen y col., 1995; Lee y Gelvin, 2008). Este vector contiene en su T-DNA (Figura III.1) el gen *nptII*, que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa II, bajo el control del promotor del gen de la nopalina sintasa

(*Nos*). Dicha enzima confiere resistencia al antibiótico kanamicina, por lo que este marcador puede ser utilizado para la selección de plantas transgénicas.

El vector de transformación utilizado para obtener las líneas SM tiene un T-DNA (resumido en la Figura III.2) que desde el borde izquierdo (LB) hasta el borde derecho (RB) consta de los siguientes componentes: el gen *SUI* de *Streptomyces griseolus*, que codifica un citocromo P450 y confiere sensibilidad a R7402 (proherbicida de sulfonilurea); el gen de la transposasa *TnpA* y el elemento transponible Spm que contiene un gen de resistencia al herbicida glufosinato, también conocido como BASTA (gen *BAR*, para la selección del T-DNA o del transposón si se ha reinsertado); el terminador del gen *Nos* en el 3' del gen *BAR* tiene una orientación opuesta al terminador del elemento Spm, ya que así inserciones en un intrón de un gen mutagenizado deberían detener la expresión de dicho gen. El elemento transponible Spm se encuentra entre el promotor 35S y el ATG del gen *GUS* (que codifica para la enzima β -glucuronidasa), lo que permite comprobar si el elemento transponible se ha movido (Tissier y col., 1999).

El vector de transformación pAC161 (T-DNA en la Figure III.3) tiene un tamaño de 10828 pb y desde el borde izquierdo hasta el borde derecho del T-DNA consta de: un gen de resistencia al sulfadiazina (*SUL1*), que permite la selección *in vitro* de las líneas mutantes; el plásmido pUC18, que contiene el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina; por último, cerca del borde derecho tiene un promotor 35S que podría activar los genes cercanos a la zona de inserción.

III.2. Condiciones generales de crecimiento para el cultivo de *Arabidopsis thaliana*

III.2.1. Esterilización de semillas

Para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*, las semillas se alicuotaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y fueron esterilizadas como sigue. En primer lugar, se

trataron con 1 mL de una solución de 70% etanol y 0,05% SDS (Dodecil Sulfato Sódico, SIGMA, Ref. 1667289), durante 30 minutos en agitación. A continuación, y una vez retirada la solución anterior, se añadió 1 mL de una solución de etanol al 70% y se mantuvo en agitación durante 5 minutos, con la que se eliminaron los restos de SDS. Durante los lavados, las semillas se mantuvieron en agitación. Por último, las semillas, junto con la solución, se depositaron con ayuda de una pipeta, sobre un papel de filtro estéril en una cabina de flujo laminar, dejándose secar al aire. Finalmente, tras la evaporación del etanol, se procedió a su siembra en placa o a guardarlas estériles a 4°C hasta su uso.

En el caso de esterilizaciones de grandes cantidades de semillas (500 a 2000) el tratamiento de 30 minutos con la primera solución se sustituyó por dos tratamientos consecutivos con 1 mL de la misma solución; así, las semillas se lavaron y esterilizaron de manera más efectiva antes de añadir durante 5 minutos la solución sin SDS.

III.2.2. Condiciones estándar para el cultivo *in vitro*

En general el cultivo *in vitro* se llevó a cabo utilizando placas de cultivo redondas de 9 cm de diámetro o placas cuadradas de 12 cm de lado que contenían un medio de cultivo que denominamos MS1/5 compuesto por 0,9 g/L de un preparado de DUCHEFA BIOCHEMIE (Ref. P03769-05) de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y vitaminas de Gamborg (Gamborg y col., 1968), 0,9 g/L de MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico, SIGMA, Ref. 32K5465), 8 g/L de agar (PRONADISA, Ref. SB090321), pH de 5,7 [ajustado con tris(hidroximetil)aminometano (Tris)-Base 1M o KOH]. Para la selección de plantas transgénicas se utilizaron placas redondas con un medio similar al anterior excepto por contener más sales del preparado de MS con vitaminas Gamborg (2,2 g/L), que denominamos MS1/2 y que suplementamos con 0,5% de sacarosa. La esterilización de los medios se llevó a cabo en autoclave (20 minutos a 120°C, 10⁵ Pa). En el caso de sustancias termolábiles, como los antibióticos, el herbicida

fosfotricina o el aminoácido serina, éstos se esterilizaron por filtración a través de membranas estériles de 0,20 μm y se añadieron al medio esterilizado en autoclave y enfriado a unos 40-50°C. Las concentraciones finales de los antibióticos utilizados se especifican en la Tabla III.1. En los experimentos de tolerancia a estrés salino, se adicionó NaCl al medio antes de ajustar el pH. En el caso de las placas redondas se vertieron 25 mL de medio por placa, mientras que para las placas cuadradas se utilizaron 75 mL.

Una vez realizada la siembra en condiciones de esterilidad, las placas se sellaron con cinta porosa *Micropore Hypoallergenic* (3M MICROPORE TM, Ref. 1530-0 para las placas redondas y Ref. 1530-1 para las placas cuadradas), que permite el intercambio de gases pero mantiene la humedad en el interior de las placas. Con objeto de favorecer y sincronizar la germinación de las semillas se estratificaron un mínimo de 72 horas a 4°C, antes de ser transferidas a cámaras de crecimiento para su germinación, donde permanecieron los días adecuados para cada experimento a una temperatura de 22-25°C y un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) e intensidad de luz de 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tabla III.1. Concentración final de los antibióticos utilizados en el cultivo *in vitro* de arabisopsis.

Antibiótico	Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Higromicina	25
Kanamicina	50
Cefotaxima	100
Sulfadiazina	5,25
Fosfotricina-BASTA	25

III.2.3. Cultivo en invernadero

El cultivo de *A. thaliana* en invernadero se realizó en macetas de poliestireno cuadradas, de 7x7x6,5 cm de 200 mL de capacidad, rellenas con una mezcla previamente humedecida de vermiculita exfoliada calibre 3 (ASFALTEX) y sustrato Kekkila (enriquecido con macronutrientes N-P-K 15-10-20, KEKKILÄ IBERIA), en proporción 1:1 (volumen/volumen). Una vez hecha la siembra, las macetas fueron colocadas en bandejas que se regaron y se recubrieron con plástico transparente, que permite una alta humedad relativa, y se transfirieron a una cámara fría a 4°C. Al cabo de cuatro días, las bandejas se transfirieron a las cabinas del invernadero, depositándose debajo de las mesas para evitar que durante la germinación les diera luz directa del sol, ya que de lo contrario al estar tapadas se acumula mucho calor y se mueren. Pasados dos días, se hicieron perforaciones en el plástico y 2-3 días más tarde se retiró totalmente el plástico protector y se subieron las bandejas a la parte superior de la mesa para recibir luz directa. El riego se realizó añadiendo agua desionizada a las bandejas cada 3-5 días según las necesidades hídricas de las plantas.

Cuando fue necesario, plántulas de cultivo *in vitro* se transplantaron a macetas con una mezcla similar a la anterior y se colocaron en bandejas directamente encima de las mesas del invernadero.

Con las plantas que se cultivaron para obtener semillas se utilizó el sistema Arasistem para evitar cruces no deseados; para ello se colocaron las arabases y los aratubos cuando las plantas estaban desarrolladas pero todavía no habían empezado a alargar los tallos florales. Al final del ciclo biológico de las plantas, cuando el botón floral dejaba de producir flores, se cesaron los riegos y se dejaron secar hasta la desaparición completa de su color verde. Finalmente, las plantas se transfirieron a sobres de papel para asegurar su secado completo; una o dos semanas después, las semillas de cada una de las plantas se limpiaron de otros restos vegetales mediante tamizado a través varios coladores de cota de maya decreciente, hasta

dejar las semillas completamente limpias en tubos Eppendorf. Las semillas se guardaron a 4°C hasta su uso.

Las condiciones de crecimiento en la cabina del invernadero fueron de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) con una intensidad de luz aproximada de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 50-70% de humedad relativa y una temperatura alrededor de 24°C durante el día y 17°C durante la noche. La luz natural fue suplementada con luz artificial (lámparas de vapor de sodio y lámparas de vapor de mercurio) cuando fue necesario.

III.3. Cepas bacterianas

III.3.1. *Escherichia coli*

Para la obtención de las distintas construcciones, plásmidos con promotores y cDNAs, con las que transformamos más adelante las plantas, fue necesario la utilización de las siguientes cepas de *E. coli*.

1- **DH5 α** : F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (\square *lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1*
hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻

2-**TOP10**: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1*
araD139 Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* λ ⁻

III.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de plantas se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 pSOUP. Esta cepa posee resistencia a los antibióticos gentamicina,

rifampicina y tetraciclina. Estas resistencias son debidas a que la cepa GV3101 contiene el plásmido pMP90, que posee genes de resistencia a gentamicina y rifampicina (Koncz y Schell, 1986; Furni y col., 1997; Mullins y col., 2001), junto al vector binario pSOUP, que contiene un gen de resistencia al antibiótico tetraciclina.

III.4. Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Los medios utilizados para el crecimiento de las bacterias se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 10⁵ Pa.

III.4.1. Medio Luria Bertani (medio LB)

Para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens* se utilizó el medio de cultivo LB (Bertani, 1951), que es el medio utilizado por excelencia para el mantenimiento de estas dos cepas (Sambrook y Russell, 2001). Este medio de cultivo está formado por 1% (p/v) de triptona (PRONADISA, Ref. 1612.00), 0,5% (p/v) de extracto de levadura (PRONADISA, Ref. 1702.00) y 1% (p/v) de NaCl. El pH se ajustó a 7 con NaOH. Cuando este medio de cultivo se requirió en estado sólido se agregaron 1,5% (p/v) de agar (PRONADISA, Ref. 1802.00).

III.4.2. Medio SOB

Durante el crecimiento previo de las bacterias de *E. coli* para preparar células competentes por choque térmico (ver Apartado III.8.1), el medio SOB (del inglés *Super Optimal Broth*) fue utilizado por ser más rico que el medio LB. Este medio de cultivo está compuesto por 2% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ y 10 mM de MgSO₄.

III.4.3. Medio SOC

Durante el proceso de transformación de *E. coli* se empleó el medio SOC (del inglés *Super Optimal Broth with Catabolic represor*; ver Apartado III.8.2) por

ser también un medio de cultivo enriquecido para el cultivo microbiológico. La característica fundamental de este medio es que permite obtener elevadas eficiencias de transformación bacteriana mediada por plásmidos al crecer las células bacterianas en él después de ser transformadas por choque térmico (Apartado III.8.2). Este medio está compuesto por 2% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 10 mM de NaCl y 2,5 mM de KCl. El pH se ajustó a 7 con NaOH. Finalmente, después de autoclavar el medio se agregaron las soluciones estériles de MgCl₂ y glucosa a una concentración final de 10 y 20 mM, respectivamente.

III.4.4. Manipulación y crecimiento de las bacterias utilizadas

Las bacterias se cultivaron en medio líquido o sólido, en función del objetivo y del protocolo aplicado. Para el crecimiento en medio líquido de *E. coli* y *A. tumefaciens* se utilizaron tubos Corning o matraces estériles de 15 ó 250 mL, respectivamente. Los medios de cultivos con las bacterias inoculadas se colocaron en un incubador orbital (COMECTA, Ref. 5312090) a 37°C (*E. coli*) ó 28°C (*A. tumefaciens*) y una velocidad constante de agitación de entre 200 y 250 revoluciones por minuto (rpm) para mantener una aireación adecuada.

Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas Petri colocadas en posición invertida (para evitar la condensación del vapor de agua en la tapa) en una estufa a la temperatura óptima requerida por cada cepa bacteriana.

Finalmente, tanto en el cultivo en medio sólido como en medio líquido, se añadieron al medio los antibióticos de selección necesarios en función de las resistencias especificadas para cada una de las cepas y los vectores utilizados. Para la adición de antibióticos se procedió como se indica en el Apartado III.2.2 . Las concentraciones finales de los antibióticos utilizados se especifican en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Concentración final de los antibióticos de selección en cultivo *in vitro* de bacterias.

Antibiótico	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	50
Espectinomicina	100
Gentamicina	25
Kanamicina	50
Tetraciclina	5

III. 5. Vectores de clonación y transformación

Los vectores utilizados en esta tesis doctoral, así como sus principales características, se especifican a continuación.

1. **pCR8[®]/GW/TOPO[®]**: Plásmido multicopia de 2817 pb utilizado para la clonación de productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en *E. coli*. Posee el gen marcador de resistencia al antibiótico espectinomicina. Este plásmido, que incorpora la tecnología *Gateway* de la empresa INVITROGEN, fue utilizado para clonar los productos de PCR necesarios para la elaboración los plásmidos pMDC43 y pMDC83 con los genes de interés, aprovechando que se comercializa linealizado y posee, en cada uno de sus extremos un nucleótido de deoxitimidina en los cuales tiene covalentemente unida una enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia* por cada nucleotido (Figura III.4).

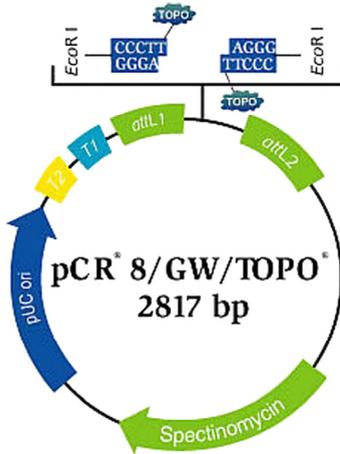


Figura III.4. Esquema del plásmido pCR8[®]/GW/TOPO[®]. Extraído de la web <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K250020>

2. **pUNI51:** El vector de clonación pUNI51 (Figura III.5) posee un tamaño de 2554 pb. Este vector lleva en su secuencia un gen de resistencia a kanamicina (Liu y col., 1998). El vector pUNI51 fue utilizado para el subclonaje del cDNAs que codifican las enzimas PGDHs en los diferentes vectores utilizados para transformar plantas con *Agrobacterium*. El pUNI51 con el cDNA del gen *PGDH* y *EDA9* fueron obtenidos del *DNA Stock Center* del ABRC.

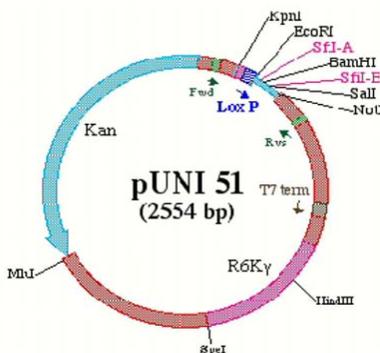


Figura III.5. Esquema del plásmido pUNI51. Extraído de la web <http://www.arabidopsis.org/jsp/common/image.jsp?id=1635&format=jpg>

3. **pUC18:** Es un plásmido de 2686 pb derivado del plásmido pBR322. En líneas generales, posee una región lacZ de clonaje múltiple, un sitio de lectura abierta derivado del plásmido pMB1 y un gen de resistencia al

antibiótico ampicilina (Figura III.6). Este plásmido fue utilizado para evaluar la calidad de las células competentes de *E. coli*.

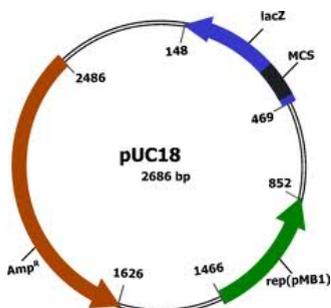


Figura III.6. Esquema del plásmido pUC18. Extraído de la web <http://openclipart.org/detail/130471/plasmid-vector-by-gsagri04>

4. **pBI121**: Este plásmido binario de 14758 pb se utilizó para obtener plantas transgénicas que nos permitieran conocer el patrón de expresión de los genes de interés. Este vector deriva del plásmido pBI19 (Bevan, 1984). En la región comprendida entre las zonas del LB y del RB del T-DNA, contiene el gen delator *GUS*, bajo el control del promotor *35S* del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S; *35S*). Este vector tiene el gen *nptII* flanqueado por el promotor y terminador del gen *NOS* (Figura III.7).

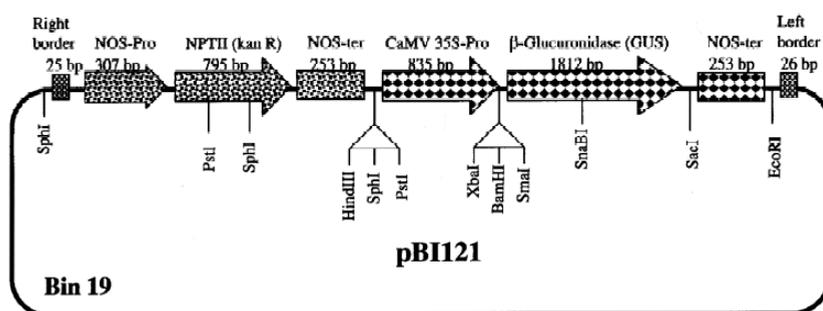


Figura III.7. Esquema del plásmido pBI121 modificado de Chen y col., (2003).

5. **pCAMBIA1303**: Plásmido de 12361 pb (Figura III.8) que se utilizó para obtener plantas transgénicas que nos permitieran conocer el patrón de expresión de los genes de interés. Este plásmido es portador de un gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un gen de resistencia a higromicina (*hptII*) para la selección en plantas. Los dos genes de resistencia están bajo el control del promotor 35S. El vector pCAMBIA1303, como miembro de la familia pCAMBIA1300, posee también el sitio de clonaje múltiple del plásmido pUC18. La característica principal pCAMBIA1303 es poseer bajo el control del promotor 35S el gen delator *GUS* fusionado al gen de la proteína GFP y por último una secuencia que codifica para una cola de histidina.

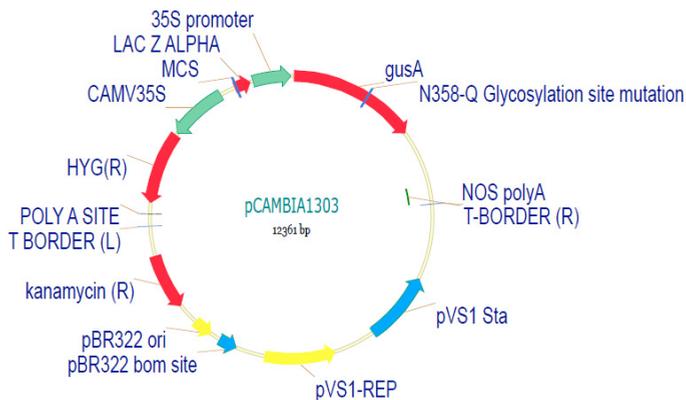


Figura III.8. Esquema del plásmido pCAMBIA1303. Extraído de la web <http://www.cambia.org/daisy/cambia/2048/version/1/part/4/data/pCAMBIA1303.pdf?branch=main&language=default>

6. **pMDC83**: El vector de clonación pMDC83 se empleó para sobreexpresar genes de interés en arábidopsis y para estudiar la localización subcelular de las proteínas que codifican dichos genes. Este vector utiliza la tecnología Gateway, basada en la utilización de un *cassette* portador del sitio de recombinación *att*, que permite la

transferencia del producto de clonación desde otros vectores, generalmente utilizados para el clonaje en *E. coli*. En nuestro caso, el vector donador fue el pCR8[®]/GW/TOPO[®] (comentado anteriormente). El vector pMDC83 está formado por 12513 pb; sus principales características son la presencia de dos genes de resistencia a kanamicina e higromicina (resistencia utilizada para bacterias y plantas, respectivamente) junto con la secuencia de la proteína GFP fusionada a la secuencia de la cola de histidina en el extremo C-terminal. La secuencia codificante de la proteína de interés puede clonarse en fase con la secuencia de la GFP, lo que posibilita la generación de una proteína de fusión en la cual la proteína fluorescente está en posición C-terminal (Figura III.9).

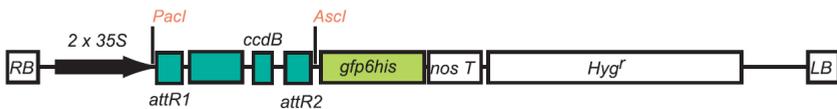


Figura III.9. Esquema del T-DNA del plásmido pMDC83. Extraído de la web http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html

7. **pMDC43:** El vector pMDC43, utilizado también para sobreexpresar genes de interés en arábidopsis y para estudiar la localización subcelular de las proteínas que codifican dichos genes, posee una estructura similar al vector pMDC83, con la salvedad de que pMDC43 lleva el elemento GFP en posición N-terminal en la proteína de fusión y no tiene la secuencia de la cola de histidinas (Figura III.10).

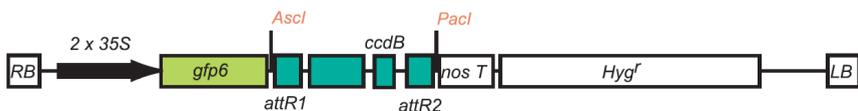


Figura III.10. Esquema del T-DNA del plásmido pMDC43. Extraído de la web http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html

III.6. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

III.6.1. Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*

En la extracción de ADN genómico se partió de una pequeña cantidad (50-100 mg) de material vegetal joven (trozo de hoja de aproximadamente 25 mm²) que fue triturado a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf con ayuda de pistilo de plástico. Tras homogeneizar se agregaron 400 µL de tampón de extracción [200 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético; pH 7,5 - 8,0) y 0,5% SDS] y se agitó vigorosamente durante 5 segundos en un vortex. En este paso, las muestras las mantuvimos a temperatura ambiente o en hielo hasta completar la homogeneización de las muestras a analizar como máximo 1 hora. Las muestras se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm, se recuperaron 300 µl del sobrenadante, evitando aspirar el precipitado, y se transfirieron a un nuevo tubo. A continuación, se añadió 300 µl de isopropanol, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, induciéndose así la precipitación del ADN. Se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente, recuperando de esta forma el ADN precipitado en el fondo del Eppendorf. Se eliminó el sobrenadante por decantación, se centrifugó a las mismas revoluciones durante 5 segundos, se eliminó el resto de solución con ayuda de una pipeta y se dejó secar el precipitado durante unos 20 minutos. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 100 µl de H₂O MilliQ (mQ) y se conservó el ADN extraído a 4°C hasta su uso.

III.6.2. Aislamiento de ADN plasmídico

Para el aislamiento y recuperación de ADN plasmídico se siguieron dos protocolos distintos, en función de los pasos a realizar con el material resultante de dicha extracción. Cuando el ADN plasmídico se extrajo para su posterior secuenciación, se utilizó una modificación del protocolo descrito en el kit de ROCHE APPLIED SCIENCE *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Ref. 11754785001), dado que en este caso se requirió un mayor grado de pureza del

plásmido. Sin embargo, cuando el ADN plasmídico fue requerido para posteriores análisis de restricción con el fin de clonar o verificar la presencia o no de un determinado fragmento de ADN, se utilizó el protocolo de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS descrito por Birnboim y Doly (1979). Ambos procedimientos se detallan a continuación.

III.6.2.1. High Pure Plasmid Isolation Kit

Como material de partida se prepararon 4 mL de un cultivo saturado de *E. coli* en un tubo Corning estéril de 15 mL. El protocolo se inició cuando la densidad óptica de dicho cultivo, medida a una absorbancia de 600 nm, fue de 2 unidades aproximadamente. Cuando el cultivo estaba saturado se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos, se eliminaron los restos del medio de cultivo y al precipitado de bacterias se le añadieron 250 μ L de tampón de resuspensión (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8,0). El precipitado se resuspendió y a continuación se añadieron 250 μ L de tampón de lisis (0,2 M de NaOH, 1% de SDS), tras agitar se añadieron 350 μ L de tampón de unión a la membrana (4 M de hidrocilguanidina, 0,5 M de acetato de potasio, pH 4,2) frío (preincubado en hielo 15 minutos). La mezcla resultante se incubó en hielo 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm 10 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se cargó sobre las columnas con filtro suministradas por el kit y se procedió a su centrifugación (13000 rpm, 1 minuto). Acto seguido, se eliminó el filtrado y se realizaron dos pasos de lavado sobre la columna. El primer lavado consistió en la adición de 500 μ L del primer tampón de lavado [5 M de hidrocilguanidina, 20 mM de Tris-HCl, pH 6,6 (25°C)], mientras que el segundo consistió en la aplicación de 500 μ L de segundo tampón [20 mM de NaCl, 2 mM de Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)]. Entre ambos pasos se realizaron sendas centrifugaciones de 1 minuto a 13000 rpm. Para la elución final del plásmido se depositaron sobre la membrana de la columna 50 μ L de tampón de elución [10 mM de Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)] y se centrifugó la muestra (13000 rpm, 1 minuto); este paso se realizó otra vez para recuperar el máximo de

plásmido. Los 100 μL recuperados con el plásmido se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

III.6.2.2. Protocolo de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS

El protocolo seguido fue una modificación del descrito por Sambrook y Russell (2001), basado en que una disolución de un detergente aniónico fuerte y pH elevado, rompe las células y desnaturaliza tanto las proteínas como el ADN cromosómico; la subsiguiente centrifugación de la suspensión permite recuperar el ADN plasmídico en el sobrenadante (Birnboim y Doly, 1979).

Las colonias aisladas en las transformaciones de *E. coli* se cultivaron durante 16-20 horas en 4 mL de medio LB con sus respectivos antibióticos. Seguidamente, se procedió a la centrifugación (13000 rpm durante 5 minutos a 4°C) de este cultivo y a la resuspensión del precipitado celular en 100 μL de la solución de lisis (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM EDTA, pH 8,0); inmediatamente después, se añadieron 200 μL de la solución alcalina recién preparada (0,2 N NaOH, 1% SDS), se agitó manualmente y la mezcla se colocó en hielo. A continuación, se añadieron 150 μL de la solución ácida (60 mL de acetato potásico 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua), se volvió a agitar manualmente y la mezcla se mantuvo en hielo otros 5 minutos. Para la precipitación del ADN plasmídico, producida a temperatura ambiente durante 2 minutos, el sobrenadante resultante de la centrifugación (13000 rpm durante 10 minutos a 4°C) se mezcló con 2 volúmenes de etanol 96%. Por último, la mezcla alcohólica se centrifugó (13000 rpm, 20 minutos) y el precipitado, una vez seco, se resuspendió en 50 μL de agua mQ más 1 μL de ribonucleasa (RNasa; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) incubándose 10 minutos a 37°C . El ADN plasmídico fue almacenado a -20°C hasta su uso.

III.6.3. Extracción de ARN

La extracción del ARN de diferentes tejidos y líneas de *Arabidopsis* se realizó a partir de 100 mg de muestra siguiendo un protocolo modificado del descrito por MACHEREY-NAGEL *Total RNA Isolation* (Ref. 740955.50). Este ARN se utilizó para las distintas qRT-PCRs (PCR cuantitativa a tiempo real) para el estudio de los 3 genes.

Las soluciones utilizadas fueron suministradas por el kit. Dado que durante el proceso de extracción, el ARN puede ser degradado por RNAsas, el material era libre de RNAsas.

Para realizar la extracción, el material de partida se congeló con nitrógeno líquido y se trituró en mortero. Se pesaron 100 mg del material pulverizado, se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 350 μ L de tampón RA1 junto con 3,5 μ L de β -mercaptoetanol. La muestra se agitó con un vórtex y se cargó en una columna con filtro (suministrada por el kit) depositada dentro de un tubo de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. El filtrado se transfirió a un nuevo Eppendorf, sin coger restos del precipitado que se queda en el fondo del tubo, y se le añadieron 350 μ L de etanol 70%. La mezcla homogeneizada se cargó en una nueva columna con filtro y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm para que el ARN en la solución se quedara unido en la membrana de la columna al atravesarla. A partir de aquí, la membrana se lavó en primer lugar con 350 μ L de MDB y se centrifugó adicionalmente 1 minuto a 13000 rpm, para posteriormente adicionar 95 μ L de reacción de la desoxirribonucleasa (DNasa; 90 μ L de tampón DNasa + 10 μ L de DNasa). Finalmente, antes de la elución del ARN, la membrana se lavó con 200 μ L de RA2, 600 μ L de RA3 y 250 μ L de RA3, entre cada pasó se realizó una centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm. La elución final se realizó añadiendo 40 μ L de H₂O libre de RNAsas, tras una centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm se añadieron otros 20 μ L a la columna y se volvió a centrifugar, ya que eluyendo en dos tiempos se obtiene una mayor concentración de ARN final.

III.6.4. Cuantificación del ARN total

La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría en el ultravioleta ($\lambda = 260$ nm). La pureza se calculó en base a la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm. Para obtener los $\mu\text{g/mL}$ de ARN de la muestra se utilizó la siguiente expresión: absorbancia a 260 nm x factor ARN (1 unidad de absorbancia a 260 nm, equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de ARN) x factor de dilución. Alternativamente se midió la absorbancia a 260 nm de 1 μL de ARN en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 el cual indica directamente la concentración.

III.7. Análisis de ácidos nucleicos

III.7.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa

La PCR, es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo número de ellas (Mullis y col., 1986; Saiki y col., 1985, 1988). Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo partiendo de una cantidad de ADN molde de entre 10 ng y 50 ng, que podía ser bien ADN genómico o plasmídico.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de forma rutinaria en placas multipocillos (VWR, Ref. 82006-636) o en microtubos (THERMO SCIENTIFIC, Ref. AB-0266), donde se añadió la mezcla de reacción y el ADN molde. Cada reacción se realizó en 30 μL de mezcla que contenía: tampón de PCR 1X [Tris HCl 75 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM], MgCl_2 2 mM, 0,2 mM de cada desoxinucleótido (dNTP), 0,5 μM de cada cebador, 0,9 U de *Taq* polimerasa y los 10-50 ng de ADN (1 μL del extracto de ADN obtenido con el protocolo del

Apartado III.6.1 ó 1 μ L de una dilución del ADN plasmídico (ver Apartados III.6.2.1 ó III.6.2.2) para conseguir los 10-50 ng necesarios.

Como polimerasa termoestable en las reacciones rutinarias donde no se requería una alta fidelidad, se usó la enzima BIOTOOLS DNA Polimerasa (*Taq*; Ref. 10,047), mientras que cuando se requería una amplificación del ADN de alta fidelidad se empleó la enzima BIOTOOLS *Pfu* DNA Polimerasa (*Pfu*; Ref. 10,511). En caso de necesitar más volumen de amplificación se incrementaron las cantidades de la mezcla proporcionalmente.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR SYSTEM 9600* (APPLIED BIOSYSTEMS). Los parámetros estándar del termociclador para la amplificación fueron: 10 minutos a 94°C, seguidos de 35-45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a una temperatura de 1 ó 2°C inferior a la menor temperatura de hibridación de los cebadores utilizados en cada mezcla de reacción [para garantizar la correcta unión de los mismos y evitar el mayor número de uniones inespecíficas durante el proceso (Innis y Gelfand, 1990)], y un tiempo de extensión a 72°C, siendo el tiempo de extensión de 1 minuto por cada 1000 pb de banda a amplificar (en el caso de utilizar *Pfu* se utilizaron 2 minutos por cada Kb). Para finalizar se mantuvo la temperatura a 72°C durante 10 minutos, para posteriormente rebajarla a 4°C y extraer del termociclador las muestras amplificadas para su observación. Durante todo el proceso hasta el mantenimiento a 4°C el bloque térmico superior se mantuvo a una temperatura de 103°C para evitar la condensación de las muestra. Los cebadores y sus secuencias respectivas utilizadas en esta tesis se detallan en Anexo, Tabla Suplementaria 1.

III.7.1.1. PCR diagnóstica

La PCR diagnostica se utilizó para amplificar fragmentos de ADN genómico de los mutantes de los tres genes estudiados de *Arabidopsis thaliana*, en los que potencialmente debía encontrarse el inserto de T-DNA en los alelos mutantes y aislar así líneas mutantes homocigotas junto con sus correspondientes

grupos control. Así pues, para la obtención de los mutantes homocigotos, se realizaron PCR diagnósticas utilizando un par de oligonucleotidos (LR y RP), que hibridan en el ADN del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado del T-DNA y un tercer oligonucleotido que hibrida en el T-DNA (BP; Figura III.1.11). Tras las distintas PCRs, los correspondientes productos se visualizaron en un gel de agarosa para la identificación y aislamiento de los mutantes homocigotos a través del análisis del patrón de bandas resultante. Este patrón estaba basado en la amplificación de 2 bandas de diferentes tamaños: una banda de tamaño menor del alelo mutante homocigoto y la otra del alelo silvestre (WT) y también la identificación de plantas heterocigotas por la presencia de ambas bandas (Figura III.11).

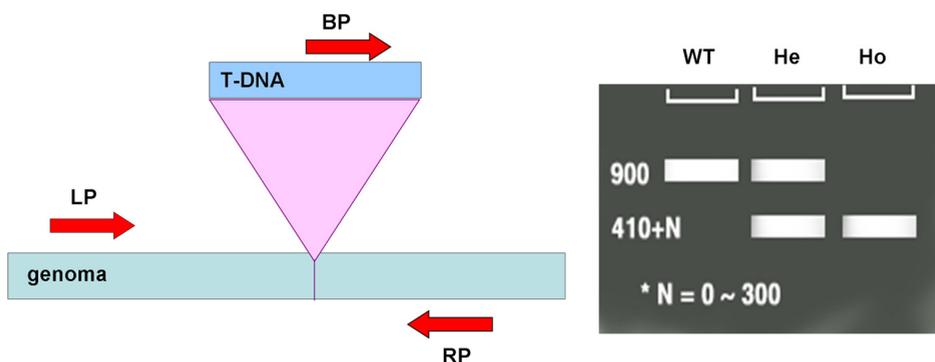


Figura III.11. Esquema de la posición de los cebadores y representación de las bandas esperadas tras la PCR en líneas silvestres (WT), heterocigotas (He) y homocigotas mutantes (Ho). LP, RP y BP representan los cebadores para el estudio genético por PCR. Extraído y modificado de la web <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

III.7.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó la técnica de la electroforesis para la visualización de los productos de la PCR y otros fragmentos de ADN. Los productos de amplificación del ADN se separaron en geles de 0,5X TBE (90 mM de ácido bórico, 90 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 2 mM de EDTA), 0,8% de agarosa D-1 de baja electroendósmosis (PRONADISA, Ref. 8016) y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio.

Las muestras se cargaron previa adición de un volumen de tampón de carga 6X [100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,0075% de azul de bromofenol, 60% de glicerol y 60 mM EDTA (pH 8)] por cada 5 volúmenes de muestra. Como marcador de tamaños de ADN se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 pb (BIOTOOLS, Ref. 31,006) ó 1 Kb (BIOTOOLS, Ref. 31,005), ambos preparados a 0,2 mg/mL, en función del tamaño de banda esperada. Para su preparación se utilizaron 5 µL de marcador (0,5 µg), 2 µL de tampón de carga 5X y 3 µL de agua destilada. En aquellos casos en los que fue requerida la cuantificación del producto de PCR separado por electroforesis, se utilizó el marcador lambda-*HindIII* (BIOTOOLS, Ref. 31,011) y por comparación de la intensidad de bandas se estimó su concentración. En este último caso, para su preparación se utilizó 1 µL de marcador (0,5 µg), 1 µL de tampón de carga 5X y 3 µL de agua destilada.

En aquellos casos en los que las bandas eran de un tamaño muy reducido se aumentó la cantidad de agarosa hasta un máximo de 2%, para permitir una correcta separación y visualización.

La electroforesis se realizó a voltaje constante (80 voltios) y finalmente las bandas de ADN se visualizaron iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda en un transiluminador UVItec UVIDoc-HD2/20.

III.7.3. Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores (oligonucleotidos) es un paso clave para el aislamiento de mutantes, estudio de la segregación, de la expresión y clonaje de ácidos nucleicos. Inicialmente, para la obtención de las secuencias de los cebadores utilizados (LR y RP) para PCR diagnóstica se utilizó el programa *T-DNA Primer Design* (signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html). Estas primeras secuencias, fueron posteriormente revisadas y modificadas (si fue necesario) utilizando el programa *Amplify 3.1*. Para el resto de amplificaciones los cebadores se diseñaron con los programas *Jellyfish* y *Amplify 3.1*.

Para el diseño de los cebadores utilizados para PCR diagnóstica, PCR cuantitativa en tiempo real y para el clonaje de regiones promotoras y cDNAs se siguieron los siguientes criterios: se seleccionaron inicialmente fragmentos de entre 20-28 nucleótidos con un contenido alto de G+C (alrededor del 50-60%). Las secuencias candidatas, fueron valoradas en función de sus parámetros de estabilidad y sus temperaturas de hibridación, procurando siempre que entre los cebadores de un mismo conjunto (directo-reverso) ambas temperaturas fueran lo más próximas posibles para evitar hibridaciones de baja especificidad. Asimismo, se procuró evitar secuencias de tres o más citosinas o guaninas en las regiones terminales y se eliminaron aquellas secuencias que formaron dímeros. Además de estos criterios para el caso de cebadores para qRT-PCR se siguieron las recomendaciones de Udvardi y col. (2008).

Para la elaboración de la secuencia final de los cebadores utilizados para el clonaje de promotores y cDNAs, se añadieron las secuencias de corte de las enzimas de restricción adecuadas para su posterior inclusión en el vector correspondiente.

Una vez diseñados los cebadores, también se realizó una comparación con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la página del TAIR para comprobar que no se unieran a otras regiones del genoma de *Arabidopsis*.

III.7.4. Purificación de los productos de PCR

Para la purificación del producto de PCR se utilizó el kit de ROCHE APPLIED SCIENCE *High Pure PCR Product Purification Kit* (Ref. 11732668001). El volumen del producto de PCR se ajustó a 100 μ L con H₂O mQ, se le añadieron 500 μ L del tampón de unión [3 M de guanidintiocinato, 10 mM de Tris-HCl, 5% de etanol (v/v), pH 6,6 (25°C)] y se mezcló por pipeteo para su homogenización. La mezcla se pipeteó en las columnas con filtro proporcionadas por el kit y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente eliminando posteriormente la solución filtrada. Tras a este punto, se procedió al lavado de la

membrana de la columna con dos adiciones del tampón de lavado [20 mM de NaCl, 2 mM de Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)] de 500 μ L y 200 μ L respectivamente, seguidas cada una de un paso de centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm y la posterior eliminación del filtrado. La elución final de la muestra se realizó a través de 50 μ L de tampón de elución [10 mM de Tris-HCl, pH 8,5 (25°C)] por centrifugación (13000 rpm, 1 minuto). El producto eluido se mantuvo a -20°C hasta su uso.

III.7.5. Extracción y purificación de bandas de ADN

Tras separar las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se cortaron del gel con un bisturí y el ADN contenido en las mismas se purificó siguiendo el protocolo especificado por el kit de MACHEREY-NAGEL *PCR clean-up Gel extraction, NucleoSpin® Extract II* (Ref. 740609.50), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis, se visualizó la banda bajo luz ultravioleta y se cortaron. El fragmento de gel se incluyó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se añadió el tampón NT. El volumen utilizado en este paso se calculó a razón de 200 μ L de tampón por cada 100 mg de gel de agarosa. La muestra se incubó a 50°C hasta que se disolvió el gel y posteriormente se cargó en una columna con su correspondiente tubo de colección servida por el kit. Acto seguido se centrifugó un minuto a 13000 rpm y se desechó el filtrado. A partir de este punto, los pasos siguientes tuvieron como objetivo lavar la membrana de sílice de la columna. Para tal fin, se pipetearon 700 μ L del tampón NT3 y la muestra se centrifugó otro minuto a 13000 rpm desechando nuevamente el filtrado. Este último paso se repitió nuevamente, pero en esta ocasión la centrifugación se prolongó durante un minuto más para eliminar cualquier resto de la solución. Finalmente, el ADN se eluyó añadiendo 50 μ L del tampón NE a la columna, incubando la muestra durante un minuto a temperatura ambiente. Como

último paso se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm y el ADN se guardó hasta ser utilizado a -20°C.

III.7.6. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 unidades de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

III.7.7. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1U de la enzima ligasa de INVITROGEN *T4 DNA Ligase* (Ref. 15224-041) por cada 10 µl de volumen de reacción.

Para la ligación de fragmentos, se utilizaron entre 10-20 ng de inserto manteniendo siempre una relación molar 1:3 (vector:inserto). La incubación se realizó durante un mínimo de 16 horas a 16°C.

III.7.8. Análisis y secuenciación de ADN

Los plásmidos obtenidos en la elaboración de las distintas construcciones genéticas fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de ADN y Proteínas del Servicio Central de Soporte para la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Los alineamientos y las comparaciones entre secuencias se realizaron a través de las aplicaciones GeneDoc (www.nrbsc.org/gfx/genedoc/) y BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

III.7.9. Localización del inserto de T-DNA

Para averiguar la localización exacta de los insertos de T-DNA en las líneas mutantes, se procedió a purificar el producto de PCR tal y como se describe en el Apartado III.7.4. Dichos productos normalmente eran las bandas obtenidas al

utilizar los cebadores RP con el cebador interno del T-DNA (Figura III.11), para cada gen y tipo de mutante. La muestra resultante de la purificación de la banda electroforética, se cuantificó y se secuenció en el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia. Conocida la secuencia nucleotídica, se comparó mediante BLAST con la secuencia completa del gen de interés, con la finalidad de obtener la localización exacta del inserto, así como su orientación dentro del mismo. Este procedimiento se repitió para los diferentes mutantes de los tres genes estudiados.

III.7.10. Análisis de la expresión génica

III.7.10.1. Reacción de síntesis de cDNA

Para realizar los análisis de expresión, así como para el clonaje del gen 3-*PGDH*, se partió de cDNA. La síntesis de cDNA se realizó mediante la utilización de dos kits. El primero fue el kit de ROCHE APPLIED SCIENCE *First Strand cDNA Synthesis kit* (Ref. 11483188011), siguiendo los pasos que se especifican a continuación.

En un tubo Eppendorf de 0,5 mL se añadió 1 µg de ARN en 8 µL de agua mQ, 1 µL de tampón DNasa y 1 µL de DNasa. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se procedió a una segunda incubación durante 10 minutos a 65°C para inactivar la DNasa. A continuación se preparó la mezcla de reacción [1X de tampón de reacción para sintetizar el cDNA (100 mM de Tris, 500 mM de KCl, pH 8,3), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTPs, 4 µg de cebador p(DT), 50 unidades de inhibidor RNasa, 20 unidades de AMV (retrotranscriptasa)] en 20 µL. A esta mezcla de reacción se le añadieron 5 µL de la muestra de ARN tratada, como se ha descrito anteriormente, y se procedió a su incubación en un termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C seguido de un paso de 5 minutos a 99°C y un paso final de 5 minutos a 4°C.

El segundo kit que se empleó fue el de FERMENTAS LIFE SCIENCES *Maxima® Universal First Strand cDNA Synthesis Kit* (Ref. K1641). En cada reacción se añadió el volumen necesario para contener 3 µg ARN, 2 µL de tampón,

1 μL de la enzima retrotranscriptasa, y el volumen de agua necesario hasta completar un volumen final de 20 μL . Esta reacción, se incubó en un termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C seguido de un paso final de 5 minutos a 85°C. Terminado el proceso se añadieron 20 μL de agua mQ a cada tubo de reacción y se guardaron a -80°C hasta su uso.

III.7.10.2. RT-PCR cuantitativa

Para cuantificar los niveles de ARN mensajeros de los genes de interés mediante qRT-PCR se utilizó el kit de TAKARA *SYBR® Premix Ex Taq™*, *Perfect Real Time* (Ref. RR041A).

En primer lugar, y para cada pareja de cebadores se preparó una mezcla de cebadores de 7,8 μL en agua destilada y 0,4 μL de una solución de cada cebador a 10 mM. Posteriormente, se preparó la mezcla de reacción con 10 μL de SYBR y 0,4 μL de fluoróforo por reacción. Una vez preparadas las dos mezclas, en cada pocillo de la placa de qRT-PCR se cargó 8,6 μL de la mezcla de cebadores y 10,4 μL de la mezcla de reacción. Cada reacción fue realizada por triplicado cargando siempre 1 μL de cDNA en un volumen total de 20 μl .

El análisis por RT-PCR cuantitativa fue llevado a cabo usando un GeneAmp® 5700 *Sequence Detection System* (APPLIED BIOSYSTEMS, Ref. PN 4304472), que detecta la fluorescencia emitida por elementos intercalados en la doble cadena de ADN.

Por otra parte, la especificidad de la amplificación del producto de PCR fue confirmada a través de la curva de disociación entre 60-95°C. La eficiencia de la reacción de PCR fue calculada a través del uso de diferentes patrones constitutivos de expresión de genes utilizados como control interno, los cuales fueron seleccionados de acuerdo con los principios metodológicos expuestos por Czechowski y col. (2005) en función de la eficiencia de los cebadores. La abundancia relativa del nivel de ARN mensajero fue calculada a través del método

comparativo por análisis de los diferentes parámetros Ct obtenidos de acuerdo con Pfaffl (2001).

III.7.11. Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para la obtención de plantas transgénicas

Para la generación de las construcciones genéticas, se siguieron los métodos estándar en biología molecular recogidos por Sambrook y Russell (2001). Las digestiones enzimáticas (Apartado III.7.6) requeridas para el clonaje de las distintas construcciones se especifican en cada caso. Para el análisis de los resultados de dichas digestiones, así como la posterior extracción y purificación de los fragmentos digeridos, se procedió conforme a lo especificado en los Apartados III.7.2 y III.7.5.

A continuación detallamos las estrategias utilizadas para la obtención de las distintas construcciones en función de su objetivo y las características de cada gen estudiado.

III.7.11.1. Fusión de promotores al gen delator de la β -glucuronidasa

Para el estudio de los patrones de expresión tisular mediante tinción histoquímica, se fusionaron los promotores de los genes *PGDH* (At1g14775), *3-PGDH* (At3g19480) y *EDA9* (At4g34200) al gen *GUS*, obteniéndose así las construcciones *pCAMBIA1303ProPGDH:GUS*, *pCAMBIA1303Pro3-PGDH:GUS* y *pBII21ProEDA9:GUS*, respectivamente. La estrategia molecular utilizada se detalla a continuación.

Para fusionar los promotores de las isoformas plastidiales de las enzimas fosfoglicerato deshidrogenasa, se amplificaron por PCR fragmentos de 1506, 1243 y 1514 pb utilizando como molde ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0, utilizando los cebadores At1g14775PromHind3F y At1g14775PromSpeIR para el promotor de *PGDH*, At3g19480PromHind3F y At3g19480PromSpeIR para el promotor de *3-PGDH*, y At4g34200PromHind3F y At4g34200PromBamR para

la región promotora de *EDA9*. Estos fragmentos corresponden a las regiones comprendidas entre el par de bases -1500 hasta +6, desde -1240 hasta +3, y desde -1509 hasta +5 de *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*, respectivamente. Los fragmentos de ADN amplificados, digeridos y purificados fueron introducidos mediante ligación en el vector pCAMBIA1303 entre los sitios de restricción *HindIII* y *SpeI* para los genes *PGDH* y *3-PGDH* y en el vector pBI121 entre *HindIII* y *BamHI* para *EDA9*. En los plásmidos resultantes se secuenciaron los fragmentos introducidos y sus zonas adyacentes para comprobar que no existían mutaciones y que los puntos de inserción eran los correctos.

III.7.11.2. Construcción de los vectores conteniendo los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9* fusionados al gen de la proteína GFP

Para la sobreexpresión en plantas silvestres o complementación de los mutantes por inserción de T-DNA de las enzimas objeto de esta tesis doctoral, se realizaron distintas construcciones que incluían las secuencias de cDNA de los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*. El cDNA correspondiente al gen *PGDH*, proporcionado por el ABRC (U13169) subclonado en el vector pUNI51, fue amplificado con los cebadores At1g17745GFP-F y At1g17745GFP-R2. El cDNA correspondiente al gen *3-PGDH* se amplificó con los cebadores At3g19480GFP-F y At3g19480GFP-R a partir de cDNA molde obtenido mediante la reacción de la transcriptasa reversa utilizando el kit de síntesis de cDNA (detalles especificados en el Apartado III.7.10.1) a partir de ARN total extraído de plantas silvestres de *Arabidopsis* (protocolo en el Apartado III.6.3). El cDNA correspondiente al gen *EDA9* fue proporcionado por el ABRC (U09809) subclonado en el vector pUNI51 y fue amplificado con los cebadores At4g34200GFP-F y At4g34200GFP-R. A los productos de PCRs resultantes utilizando *Pfu* (con 30 ciclos de amplificación) se les añadió 1 μL (5U/ μL) de *Taq* y se mantuvieron 10 minutos a 72°C (para la incorporación de desoxiadeninas en los extremos) y posteriormente se clonaron en el plásmido pCR8[®]/GW/TOPO[®] del kit de INVITROGEN *pCR8[®]/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit* (utilizando sus especificaciones pero con la mitad de volumen para

cada reactivo; Ref. K2500-20). Con las reacciones del clonaje se transformaron células competentes de *E. coli* y se comprobó mediante secuenciación la orientación de los cDNAs y la ausencia de mutaciones en las secuencias. Finalmente, el cDNA fue subclonado en los plásmidos pMDC43 y pMDC83 (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando la tecnología *Gateway*, la cual está basada en los sitios de recombinación *att*, usando la enzima recombinasa del kit de INVITROGEN *Gateway® LR Clonase® II enzyme mix* (Ref. 11791-100). Los plásmidos pMDC43 y pMDC83 son portadores de la proteína de fusión GFP que se dispone en fase de lectura con el cDNA introducido. En estos plásmidos se secuenciaron las regiones de recombinación para comprobar que las pautas de lectura no hubieran cambiado. En concreto, se utilizó el vector pMDC83 para el estudio de localización subcelular de las enzimas PGDH, 3-PGDH y EDA9 a través de la fusión Enzima-GFP en las construcciones *pMDC83Pro35S:PGDH* (*Pro35S:PGDH*), *pMDC83Pro35S:3-PGDH* (*Pro35S:3-PGDH*), y *pMDC83Pro35S:EDA9* (*Pro35S:EDA9*).

Para el gen *EDA9* se obtuvo también otra construcción utilizada en su complementación, estudio y caracterización. En ella el promotor del gen *EDA9* fue introducido en la construcción *Pro35S:EDA9* mediante la sustitución del promotor 35S para generar el plásmido *pMDC83ProEDA9:EDA9* (*ProEDA9:EDA9*). Para la obtención de esta construcción se utilizaron como puntos de partida las construcciones *Pro35S:EDA9* y *pBII21ProEDA9:GUS* obtenidas y descritas anteriormente.

En primer lugar, para la obtención de la construcción *ProEDA9:EDA9*, se eliminó, mediante digestión con las enzimas de restricción *PmeI* y *PacI*, el promotor 35S de la construcción *Pro35S:EDA9*. A continuación, y mediante el uso de las mismas enzimas, se aisló el fragmento correspondiente al promotor endógeno del gen *EDA9* (*ProEDA9*) a través de la digestión enzimática del fragmento amplificado por PCR a partir de la construcción *pBII21ProEDA9:GUS* (para incluir los sitios de corte). El promotor endógeno *ProEDA9* liberado se clonó

en el vector abierto *Pro35S:EDA9*, resultado de la digestión previa, generándose así la construcción *ProEDA9:EDA9*.

III.8. Obtención de células competentes y procedimientos de transformación

III.8.1. Células competentes de *Escherichia coli*

Para la propagación de plásmidos recombinantes y clonaje de las construcciones explicadas en el Apartado III.7.11 se utilizaron células competentes de *E. coli*, obtenidas a través del protocolo especificado por Inoue y col. (1990) con modificaciones. El procedimiento exacto se especifica a continuación.

Para la obtención de células competentes se utilizaron las dos cepas de *E. coli* especificadas en el Apartado III.3.1. Se partió de 400 μ L de cultivo saturado, que fue inoculado en 200 mL de medio SOB. Este cultivo se incubó entre 18-25°C hasta alcanzar un valor de absorbancia entre 0,5-0,7 a 660 nm. Alcanzado este punto, el matraz se enfrió en hielo durante 10 minutos, para posteriormente centrifugar las células durante 10 minutos a 5000 rpm a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante por decantación el sedimento celular se resuspendió agitando primero con el residuo del sobrenadante para continuar posteriormente la resuspensión con 10 mL de TB (tampón de transformación) frío [20 mM de ácido piperacinedietanisulfónico (PIPES) a pH 6.7 ajustado con KOH, 20 mM de Cl_2Ca , 210 mM de KCl y 50 mM de Cl_2Mn]. La mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo y se centrifugó en las mismas condiciones. Acto seguido, se repitió la operación resuspendiendo primero el sedimento con el residuo del sobrenadante y, posteriormente, con 4 mL de TB frío. El producto final se llevó a un volumen de 5 mL de TB frío. Finalmente se añadieron 375 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) poco a poco y en agitación suave continuada. Se dejó 10 minutos reposar en hielo y se

distribuyó en alícuotas de 100 μL en tubos Eppendorf estériles de 1,5 mL. Cada alícuota se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C .

Para evaluar la eficiencia de transformación de las células competentes preparadas con este método se transformaron varias alícuotas de 100 μL (entre 5-8) de células competentes con 5 μL (50 pg) del plásmido pUC19 siguiendo el procedimiento establecido por Hanahan (1983) y Tartof y Hobbs (1988), y se obtuvieron células competentes con una eficiencia de transformación superior a 1×10^8 colonias por microgramo de plásmido utilizado.

III.8.2. Protocolo de transformación de *Escherichia coli*

Las células competentes de *E. coli* se transformaron a través del procedimiento conocido como choque térmico. Para tal fin, se añadió un volumen de 1-10 μL del plásmido transformante (o de mezcla de ligación) a un tubo Eppendorf que contenía una alícuota de 100 μL de células competentes. Dichas células se sacaron del congelador de -80°C previamente, descongelándose directamente sobre hielo. Las células con el plásmido se dejaron reposar durante 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se realizó un choque térmico de 90 segundos a 42°C en un bloque térmico, e inmediatamente se colocó el tubo en el hielo durante dos minutos. Seguidamente, se agregó 1 mL de medio SOC y se incubó una hora a 37°C grados en agitación suave. Finalmente, se extendió el contenido de la transformación en 3 placas de medio LB con el antibiótico de selección adecuado en función del vector utilizado. En cada una de las tres placas se extendió un volumen diferente del cultivo (25, 200 y 500 μL) extendiendo el cultivo con bolas de vidrio estériles mediante agitación de la placa. Una cuarta placa con medio LB sin antibiótico se sembró con los 100 μL , para en caso de no obtener colonias saber que las células no estaban muertas. Las colonias resistentes a los antibióticos de selección resultaron visibles a las 8 ó 12h de la siembra según se habían utilizados las cepas TOP10 o DH5 α , respectivamente. La presencia del vector de transformación en dichas colonias fue verificada por PCR colonia, en el

que en vez de poner un μL de ADN se introducen directamente en la mezcla de PCR células de la colonia. Las colonias transformantes que resultaron positivas, se lanzaron en 5 mL de medio LB (junto con el antibiótico de selección del vector de transformación) y tras una noche de crecimiento a 37°C en agitación, se procedió a la extracción y secuenciación de los plásmidos siguiendo el protocolo descrito en los Apartados III.6.2 y III.7.8. También se recogieron 400 μL y se les adicionó glicerol estéril hasta una concentración del 15% para el almacenaje de la cepa con la construcción a -80°C para uso posteriores.

III.8.3. Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la obtención de células competentes de *A.tumefaciens* se generó un cultivo saturado en 2 mL de medio LB con gentamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A continuación se inoculó en 100 mL de medio LB, con los mismos antibióticos, 1 mL de cultivo saturado, y se incubó a 28°C con 250 rpm de agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 1. Las células de este cultivo se recogieron por centrifugación en frío (4°C) a 4000 rpm durante 10 minutos. El precipitado celular resultante se resuspendió en 2 mL de una solución estéril de CaCl_2 20 mM. La suspensión se dividió en alícuotas de 100 μL , que se congelaron rápidamente en N_2 líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

III.8.4. Protocolo de transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la introducción de las construcciones en la cepa de *A tumefaciens* GV3101 pSOUP se utilizó el método de congelación-descongelación de Hoslters y col. (1978) con modificaciones. Se descongeló una alícuota de 100 μL de células competentes y se añadió 1 μg de plásmido. La mezcla se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente se preincubó durante 5 minutos a 37°C . A continuación, se añadió 1 mL de medio LB con gentamicina y tetraciclina (concentraciones finales especificadas en Tabla III.2). La mezcla resultante se incubó a 28°C durante 4 h en agitación suave. Seguidamente se centrifugó a 4000

rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 μ L de medio LB con gentamicina y tetraciclina. Finalmente, la suspensión transformante se sembró en placas con medio LB conteniendo gentamicina, tetraciclina y el antibiótico de selección para bacterias del vector de transformación y una proporción de 1,5% de agar PRONADISA. Dichas placas se incubaron a 28°C en oscuridad. Las colonias resistentes a los antibióticos de selección resultaron visibles a los 2-3 días de la siembra. Las colonias transformantes se verificaron mediante PCR colonia como en el caso de *E. coli*. Las colonias que resultaron positivas se lanzaron en 5 mL de medio LB con gentamicina y tetraciclina junto con el antibiótico de selección del vector de transformación. Tras un día de crecimiento a 28°C en agitación constante, de los medios de cultivo, en condiciones de saturación, se recogieron 400 μ L y se le adicionó glicerol hasta una concentración del 15% para el almacenaje de la cepa con la construcción a -80°C hasta su uso para la transformación de *arabidopsis*.

III.9. Protocolo de transformación de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *arabidopsis* se transformaron mediante infección del botón floral con *A.tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Para la transformación se sembraron unas 20 plantas en macetas de 15 cm de diámetro y se cultivaron en invernadero hasta que los tallos florales alcanzaron una altura aproximada de 15 cm. Antes de proceder a su transformación, se eliminaron sus silicuas para aumentar el ratio de líneas transgénicas respecto a silvestres tras la siembra de sus semillas. Cuando el número de inflorescencias primarias era reducido, se procedió a su eliminación, posponiéndose la transformación siete días, ya que de ese modo se obtenía un número importante de botones florales en estado óptimo para la infección.

El primer paso del procedimiento de transformación consistió en agregar 1 mL de cultivo saturado de *A. tumefaciens*, con el vector pertinente, a 200 mL de

medio LB con tetraciclina (5 µg/mL), gentamicina (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL); la mezcla resultante se incubó en agitación constante (225 rpm) a 28°C durante 12-16 horas. Las células fueron recogidas por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C y resuspendidas posteriormente en 400 mL de la solución de transformación. Dicha solución está compuesta por 5% (p/v) de sacarosa, 10 mM de Cl₂Mg, 1 g/L de MES y 0,02% (v/v) del detergente Silwet® L-77 (Lehle Seeds). La transformación de las plantas de *Arabidopsis* se realizó por inmersión de los botones florales en esta solución de transformación con las bacterias. El tiempo de exposición por maceta fue de 2 minutos, transformándose entre 6 y 12 macetas por cada construcción, para asegurarnos de que obteníamos más de 50 líneas transgénicas independientes. Una vez pasado el tiempo de inmersión las macetas con las plantas fueron introducidas en una bolsa transparente, para mantener durante más tiempo las flores mojadas. Al día siguiente se les hicieron aberturas a las bolsas y tras otro día se eliminó la bolsa. Las macetas que habían sido regadas tras ser infectadas se dejaron de regar para que las plantas se secaran para la recolección de sus semillas.

III.10. Manipulación y obtención de líneas puras transgénicas T₃

Las semillas obtenidas de las plantas infiltradas con *Agrobacterium*, transformado con las construcciones anteriormente citadas, se sembraron en placas redondas conteniendo medio de cultivo sólido MS1/2 con sacarosa, los antibióticos adecuados para el T-DNA introducido y cefotaxima para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* (ver Apartado III.2.2). Tras un periodo de estratificación de 3 días a 4°C, las placas se transfirieron a una cámara de crecimiento durante 2 semanas. Las plantas que no poseen el gen de resistencia sufren un retraso en el crecimiento, con escaso desarrollo radicular y cotiledones que no adquieren la coloración verde característica, muriéndose finalmente. Los transformantes (T₁) resistentes se transplantaron a tierra y 40-45 días después se recogieron las semillas que se

sembraron de nuevo en placas con medio MS1/2 con sacarosa y suplementado con el antibiótico de selección, a fin de analizar la segregación en la generación T₂. La selección de las líneas con una sola integración del transgén se fundamenta en la elección de la descendencia (T₂) que se ajuste a una segregación 3 resistentes y una sensible, según las leyes mendelianas para un solo gen dominante constituyendo cada uno de los transformantes y su descendencia una línea.

Una vez elegidas las líneas con una inserción se pasaron entre 15-25 plántulas resistentes a tierra para obtener la siguiente generación T₃, y aislar de la misma forma individuos homocigotos para el transgén, que serían aquellos cuyas semillas fueran 100% resistentes al antibiótico de selección.

La diferencia en el número de plántulas sembradas (15 ó 25) obedece al siguiente criterio. En un marco teórico ideal, 1 plántula de cada 4 resultaría 100% resistente al antibiótico de selección; por ello para aquellas líneas transgénicas provenientes de líneas puras mutantes (aquellas que presentaron homocigotos no letales), se transplantaron 15 plántulas para garantizar la recuperación de un número no inferior a 3 plantas con una resistencia total al agente de selección. Por el contrario, aquellas líneas mutantes que no permitieron la obtención de líneas puras como es el caso de los mutantes del gen *EDA9*, y que por tanto, fueron transformadas plantas heterocigotas para la mutación de inserción de T-DNA, se transplantaron 25 plántulas, las cuales fueron analizadas por PCR en cada paso de selección para la recuperación del mayor número posible de plantas homocigotas para la inserción de T-DNA que a su vez presentaran una resistencia total al antibiótico de selección.

Aquellas líneas de las que se obtuvo una descendencia T₃ con el 100% de plantas resistentes al antibiótico, constituyeron las líneas homocigotas para el transgén y fueron seleccionadas para realizar estudios fenotípicos y moleculares.

III.11. Procedimientos utilizados para la caracterización fenotípica y fisiológica

III.11.1. Ensayos de germinación de polen

El medio utilizado para los ensayos de germinación del polen contenía 0,01% de H_3BO_3 , 5 mM de KCl, 5 mM de $CaCl_2$, 1 mM de $MgSO_4$, 10% de sacarosa y 1% de agarosa, pH 7,8 ajustado con NaOH (Boavida y McCormick, 2007).

Los granos de polen se espolvorearon sobre el medio de cultivo, frotando los estambres sobre el mismo. Previamente, se comprobó con lupa binocular que el polen tenía tonalidades doradas, ya que esa tonalidad es característica de flores frescas y jóvenes. A continuación, las placas se sellaron con cinta *Micropore* (referencia especificada en el Apartado III.2.2) y se taparon con papel de aluminio convencional, incubándose durante toda la noche en una cámara de crecimiento de cultivo *in vitro* a una temperatura de 22-25°C. Al día siguiente se observó la germinación mediante un microscopio óptico y se tomaron fotografías.

III.11.2. Estudio de la morfología de los granos de polen

Para la preparación de las muestras se procuró que el polen estuviera limpio y seco, que mantuviera la morfología original y que no tuviera cargas electrostáticas. Para ello, se utilizó como procedimiento de secado la técnica conocida como punto crítico, basada en que en ese punto de la interfase líquido-gas, el líquido pasa a gas sin una interfase debido a que las densidades líquido-gas son iguales en este punto. Esta técnica se aplicó con la finalidad de conservar la microestructura. Por otra parte, para que las muestras adquirieran características conductivas y se obtuviera una imagen clara en el microscopio electrónico de barrido, se adhirieron éstas a una cinta de carbón, la cual fue fijada a un soporte especializado con pasta de plata. Las muestras fueron finalmente recubiertas con oro-paladio, mediante una ionizadora, lo cual evita que la muestra se cargue con

energía estática y se polarice antes de la observación, con un microscopio de emisión de campo HITACHI S-4100.

III.11.3. Tinciones histológicas

III.11.3.1. Tinción Hoechst

La solución Hoechst es una sustancia fluorescente que se intercala entre los ácidos nucleicos y nos permite ver los núcleos al observar las muestras en el microscopio de fluorescencia. Para el análisis del polen se siguió el protocolo que se describe a continuación. Primero, se recogieron inflorescencias de plantas transgénicas homocigotas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* y plantas silvestres que tenían botones florales en diferentes etapas de desarrollo, y se clasificaron en 8 grupos diferentes según el diámetro del botón floral. Los botones florales del mismo grupo fueron diseccionados encima de un portaobjetos, se les añadió 150 μ l de la solución Hoechst (10 g/ml) para teñir el polen, se les colocó un cubreobjetos encima y se presionaron levemente para romper las anteras y liberar los granos de polen. Tras incubar 5 minutos a 4°C en oscuridad, las muestras se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E800, equipado con un módulo de epifluorescencia y una cámara digital NIKON DXM1200F con Nikon ACT-1 software.

III.11.3.2. Preparación Nomarski

Para estudios de microscopía de contraste de interferencia, las silicuas de las plantas heterocigotas *EDA9eda9.1* y plantas silvestre se diseccionaron longitudinalmente utilizando unas pinzas finas y un microscopio estereoscópico Nikon zoom SMZ 1500. Las silicuas utilizadas se agruparon según su estado de desarrollo [1, 4, 6, 10 y 15 días después de la polinización (DDP)]. Las semillas de silicuas individuales se clasificaron, se montaron en portaobjetos y se aclararon con 20 μ l de hidrato de cloral (8 g hidrato de cloral, 2 ml agua destilada y 1 ml de glicerol) a temperatura ambiente. En las semillas de los primeros estadios de desarrollo se usó una solución menos concentrada (6 g hidrato de cloral, 2 ml agua destilada y 1 ml de glicerol). Finalmente, se selló la preparación aplicando laca de

ñas por los cuatro extremos del cubre y se incubó un mínimo de 2 h antes de observarla en un microscopio compuesto Nikon ECLIPSE E800 con cámara digital NIKON DXM1200F equipado con óptica Nomarski y software Nikon ACT-1. Dependiendo de su estado de desarrollo, las semillas tardaron en aclararse entre 2 y 24 h.

Las fotografías de campo claro de embriones de silicuas de 15 DDP se obtuvieron mediante la disección en agua de las semillas. Los embriones liberados se observaron en un microscopio con un zoom estereoscópico Nikon SMZ 1500 equipado con una cámara digital DS-Fi1.

III.11.3.3. Microscopía electrónica de transmisión

Para la microscopía electrónica de transmisión, utilizada para observar las estructuras de la antera y el polen, se utilizaron botones florales ordenados según su desarrollo (Smyth y col., 1990). En estos análisis se utilizaron plantas silvestres y plantas homocigotas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*. Los botones florales fueron fijados con glutaraldehído al 2,5%, y posteriormente fijados en 1% de osmio. El tejido se deshidrató con lavados con etanol y fueron incluidos en resina LR-White. Las secciones ultrafinas (60 nm) se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL_1010 a 60 kV equipado con una cámara digital MegaView III y con un software de análisis.

III.11.4. Localización subcelular de la proteína de fusión GFP

Los ensayos de localización subcelular de las 3 isoformas, basados en la visualización de la fluorescencia de la proteína verde GFP, se llevaron a cabo mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio LEICA TCS-SP. Para su visualización, se realizaron preparaciones simples en fresco, únicamente con dos lavados de agua destilada. Estos análisis se realizaron en el Servicio de Microscopía de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Las plantas que sobreexpresan el gen de la proteína GFP bajo el promotor constitutivo 35S se usaron como controles (gentilmente

proporcionadas por el Prof. Julian Schroeder de la Universidad de California en San Diego, USA). Para cada línea (*Pro35S:PGDH*, *Pro35S:3-PGDH*, *Pro35S:EDA9*) se tomaron imágenes en diferentes órganos y con longitudes de onda que permitían visualizar la proteína GFP, las clorofilas y las imágenes transmitidas con luz blanca.

III.11.5. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad β -glucuronidasa

Para los ensayos de actividad de la enzima β -glucuronidasa, los órganos de las plantas a revelar se sumergieron en el tampón de reacción GUS [fosfato de sodio (100 mM), EDTA (10 mM), Tritón X-100 (0,1%), ferricianuro de potasio (0,5 mM), ferrocianuro de potasio (0,5 mM) y 2 mM X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) a pH 7.0] durante 8 horas a 37°C. El X-GlcA es utilizado por la β -glucuronidasa para crear un precipitado azulado (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) que permite localizar la expresión de la proteína. Posteriormente, los fragmentos de las plantas se destiñeron mediante lavados sucesivos con etanol al 70% (Jefferson y col., 1987). Una vez destiñidos las muestras se montaron en portaobjetos y tras poner el cubreobjetos se observaron con un microscopio que tenía incorporado una cámara digital LEICA DC350 con la que se tomaron las imágenes.

III.11.6. Determinación del peso fresco

Para la caracterización de las líneas mutantes simples y sobreexpresoras para los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9* se determinó el peso fresco. Se evaluó el peso fresco de la parte aérea y de las raíces por separado, usando una balanza OHAUS ANALYTICAL modelo *Standard AS60*. El tiempo transcurrido entre la escisión del sistema radicular y la pesada se acortó lo máximo posible para evitar pérdidas de agua que pudieran enmascarar el resultado final.

III.11.7. Determinación de metabolitos

Se utilizaron plántulas de 15 días de edad cultivadas en condiciones estándar de cultivo *in vitro* de líneas control, mutantes y líneas sobreexpresoras de los tres genes (*OexPGDH*, *OexEDA9* y *Oex3-PGDH*). Se muestrearon por separado la parte aérea y las raíces, que fueron utilizadas para determinar el contenido de metabolitos en extractos derivatizados en metanol por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) utilizando el protocolo descrito por Lisek y col. (2006).

III.12. Análisis bioinformáticos

Las proteínas de la familia PGDH fueron identificadas por búsqueda de homólogos a la proteína PGDH en la base de datos *Arabidopsis Information resource* (<http://www.arabidopsis.org/>). El porcentaje de identidad entre las diferentes enzimas PGDH fue obtenido por alineamiento de las secuencias aminoacídicas utilizando la aplicación *bl2seq* del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El alineamiento de secuencias fue realizado con el programa GENODOC. Para construir el árbol filogenético, las secuencias de aminoácidos se alinearon utilizando el programa *ClustalX* (Thompson y col., 1997) versión 1.83 y los análisis filogenéticos fueron llevados a cabo de acuerdo con el método de conjuntado de vecinos (*neighbor-joining*) (Saitou y Nei, 1987). El método de muestreo con reposición (*Bootstrapping*) fue realizado con 2000 réplicas para obtener valores estadísticos de cada nodo de las ramas, y la representación del árbol filogenético consensuado fue realizado con el programa *Tree View* (Page, 1996). La localización cloroplástica/plastidial putativa fue identificada en las secuencias de aminoácidos utilizando el servidor de predicción *ChloroP* (Emanuelsson y col., 1999). Los análisis teóricos de las secuencias promotoras de los genes estudiados fueron realizadas a través de la aplicación web *Promomer tool* de la base de datos *Bio-Array Resource for Plant*

Biology (bar.utoronto.ca/welcome.htm). Para la predicción in silico de los patrones de expresión tisular, considerando diferentes estadios de desarrollo, desde el embrión hasta planta adulta, se utilizó la base de datos *electronic Fluorescent Pictograph (eFP) Browser* (Schmid y col., 2005; Winter y col., 2007), disponible también en el enlace web <http://www.bar.utoronto>.

III.13. Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos en la caracterización genética y fenotípica se analizaron estadísticamente con un conjunto de parámetros englobados dentro del campo de la estadística descriptiva (media aritmética, desviación típica, y error típico de la media), que posteriormente fueron evaluados mediante contraste de hipótesis, ajustando la variable respuesta a un modelo lineal.

En relación con el contraste de hipótesis, se utilizaron los tests conocidos como Chi-cuadrado y *t-Student* (Zar, 1999; Sokal y Rohlf, 2012). Para el análisis de los experimentos genéticos y poder verificar si los datos obtenidos estaban de acuerdo con las proporciones mendelianas o, por el contrario, se desviaban de éstas, se utilizó la prueba estadística de contraste de hipótesis Chi-cuadrado. Como nivel de significación crítico, se utilizó la convención estadística de un valor de 0,05 de probabilidad, asumiendo que probabilidades superiores a este valor indican que las diferencias observadas no son suficientemente significativas como para rechazar la hipótesis nula, y por tanto aceptar que las proporciones observadas se ajustan a los valores esperados de segregación.

El estadístico *t-Student* se utilizó para la comparación de dos medias independientes de variables cuantitativas continuas; dicho estadístico, permite dilucidar si dos variables aleatorias normales (gaussianas), con la misma varianza, tienen medias diferentes o, por el contrario, no se observan diferencias significativas entre estos valores. Este test se utilizó para comparar las medias de los experimentos que enfrentaban al grupo control con los diferentes mutantes

estudiados y/o tratamientos. El nivel de significación fijado, fue como en el caso anterior, el de un de probabilidad de 0,05, asumiendo diferencias significativas entre las medias cuando los valores de significación fueron menores a este valor umbral.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Identificación y análisis *in silico* de los posibles genes de la familia PGDH en *arabidopsis*

IV.1.1. Árbol filogenético y alineamiento de las proteínas PGDH

En *Arabidopsis thaliana*, se había clonado un gen llamado *PGDH* (At1g17745), y se había caracterizado bioquímicamente la enzima que codifica, demostrándose su actividad 3-fosfoglicerato deshidrogena *in vitro* (Ho y col., 1999a). Una búsqueda de proteínas homólogas a PGDH en la base de datos del TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) permitió identificar otras dos proteínas candidatas. Los genes que codifican para estas dos proteínas estaban anotados como *3-PGDH* (At3g19480) y *EDA9* (At4g34200) (Figura IV.1). En su descripción en la base de datos se indica que podrían estar implicados en el proceso de biosíntesis de L-serina, aunque no hay información empírica sobre ello.

3-PGDH y EDA9 tienen un 78% de identidad de aminoácidos entre ellas y muestran, 74% y 77% de identidad de aminoácidos con PGDH, respectivamente. El árbol filogenético confirmó que EDA9 y 3-PGDH están más estrechamente relacionadas entre sí que con PGDH (Figura IV.1). Otras proteínas que presentan homología con PGDH, y que podrían tener actividad deshidrogenasa, muestran un porcentaje de identidad mucho menor con PGDH que EDA9 y 3-PGDH [por ejemplo la proteína codificada por At1g72190 con un 31% de identidad, descrita como hidroxipiruvato reductasa 2 (Timm y col., 2008)], lo que indicaría que *EDA9*, *3-PGDH* y *PGDH* podrían ser los únicos genes de la familia PGDH (Figura IV.1). Además de esto, PGDH es una enzima altamente conservada cuya estructura cristalina ha sido determinada en *Mycobacterium tuberculosis* y en humanos, conociéndose los residuos importantes para su función (Dey y col., 2008). De esta forma, los alineamientos de las secuencias aminoacídicas de las tres enzimas permite comprobar que muestran un 100% de identidad en todos los residuos que forman el posible sitio catalítico y en el dominio de unión al ligando (Figura IV.2).

Por todo lo indicado anteriormente denominamos a los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9* como familia PGDH. En esta tesis doctoral nos centraremos en la caracterización genética y funcional de los mismos.

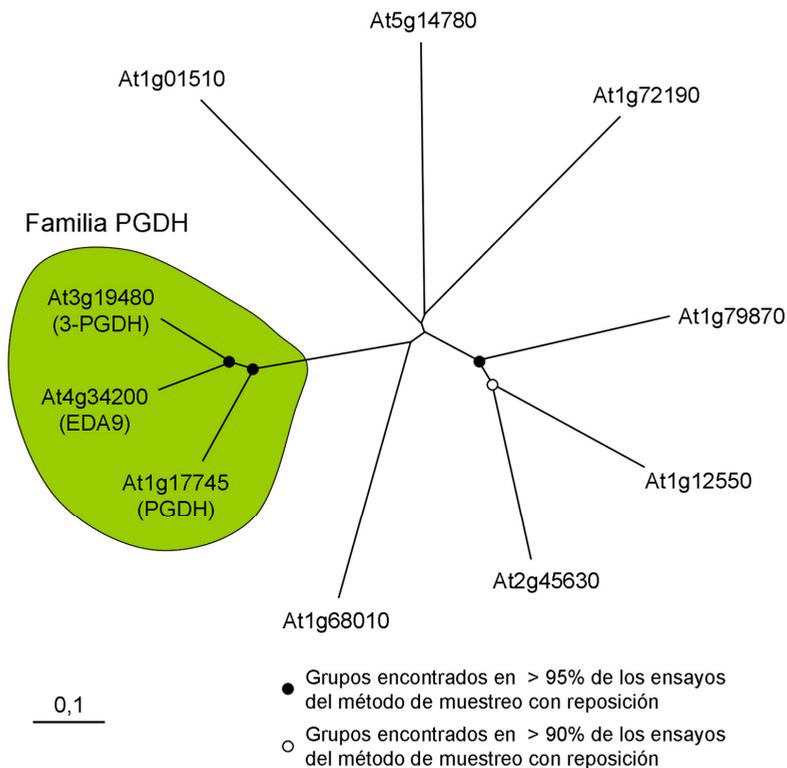


Figura IV.1. Árbol filogenético de las proteínas de la familia PGDH de *Arabidopsis* visualizado con TreeView. El árbol filogenético fue construido con las secuencias aminoácidas de aquellas proteínas con alta homología con PGDH (ver Apartado III.12). Los nodos del árbol con valores > 95% o > 90% en los ensayos, con el método de muestreo con reposición, se indican con puntos negros y blancos, respectivamente. La descripción en el TAIR de genes utilizados para la alineación es la siguiente: At1g72190, At2g45630 son 2-hidroxiácido deshidrogenasas; At1g68010, hidroxipiruvato reductasa 1; At1g79870, hidroxipiruvato reductasa 2; At1g12550, hidroxipiruvato reductasa 3; At5g14780, formiato deshidrogenasa; At1g01510, homólogo a las proteínas de unión al C-Terminal de humanos (CtBP). La familia PGDH se encuentra incluida en una silueta de color verde.

```

At4g34200 : MSATAAASSIAVATNSLRNVLSRSPLFSALSAFSRGNTLQRRLLVLG-----CSTDGS-----RPLLVAEKLIGAGKLEDVANVDCSSNM : 90
At3g19480 : WATSLNISSS-----IFSSSLVTTESSVF--IRSS-----RRILIVTSS-----RPLLVAEKLIGAGKLEDVANVDCSSDL : 75
At1g17745 : AFSSCSSVKAVN-----SRWTSS-----SFSSSRFAVLLFLHRWATSVKLTALSRALKTVEQTLTEDNRFSTVSDSEYNPTLPKRLWEKIGAGKLEDVANVDCSSDL : 111

At4g34200 : TPERLNILSLCDALIVRSCTKVEVFSSSRELKVGRAGVGIDNVLSATEECLIVNAPTANTVAAEHGIALLAMARNQAADASIKAGKLEDVANVDCSSNM : 207
At3g19480 : SLEELCTKLSLCDALIVRSGTKVEVFSSSRELKVGRAGVGIDNVLSATEECLIVNAPTANTVAAEHGIALLAMARNQAADASIKAGKLEDVANVDCSSNM : 192
At1g17745 : SPEELKKKVAESDALIVRSGTKVEVFEAAKELKVGRAGVGIDNVLSATEECLIVNAPTANTVAAEHGIALLAMARNQAADASIKAGKLEDVANVDCSSNM : 228

At4g34200 : FGKVGEEVARRAKELGRVLAHDPYAPADRARAELSVDLVSDELALAADFSLLMELPTELTRELKLINDETRAKIKGVRLVNVARSGVIDEALVARALDSGIVAQAALDVFTLEPPK : 324
At3g19480 : FGKVGEEVARRAKELGRVLAHDPYAPADRARAELSVDLVSDELALAADFSLLMELPTELTRELKLINDETRAKIKGVRLVNVARSGVIDEALVARALDSGIVAQAALDVFTLEPPK : 309
At1g17745 : FGKVGEEVARRAKELGRVLAHDPYAPADRARAELSVDLVSDELALAADFSLLMELPTELTRELKLINDETRAKIKGVRLVNVARSGVIDEALVARALDSGIVAQAALDVFTLEPPK : 345

At4g34200 : SKRVGEEVARRAKELGRVLAHDPYAPADRARAELSVDLVSDELALAADFSLLMELPTELTRELKLINDETRAKIKGVRLVNVARSGVIDEALVARALDSGIVAQAALDVFTLEPPK : 441
At3g19480 : SKRVGEEVARRAKELGRVLAHDPYAPADRARAELSVDLVSDELALAADFSLLMELPTELTRELKLINDETRAKIKGVRLVNVARSGVIDEALVARALDSGIVAQAALDVFTLEPPK : 425
At1g17745 : SKRVGEEVARRAKELGRVLAHDPYAPADRARAELSVDLVSDELALAADFSLLMELPTELTRELKLINDETRAKIKGVRLVNVARSGVIDEALVARALDSGIVAQAALDVFTLEPPK : 462

At4g34200 : LSDVYLNVNDEAKGRGLRISEERVLLGSPERELETILVOLSVESKASLSSEEVKVECKKEDEVPLAKGSEVDVHEGSILLCROVDOQGMIGTSLGESSNVN : 558
At3g19480 : LSSVFLNVNSDEAKGRGLRISEERVLLGSPERELETILVOLSVESKASLSSEEVKVECKKEDEVPLAKGSEVDVHEGSILLCROVDOQGMIGTSLGESSNVN : 543
At1g17745 : LSDSVLNVNSDEAKGRGLRISEERRVLLGSPEREVDSILVOLSVESNAGAVSPADISIECKVVEPLAKGSEVDVHEGSILLCROVDOQGMIGTSLGESSNVN : 579

At4g34200 : FMSVGRADERKAELIGVDDEERELKIGELVEEVFKL : 603
At3g19480 : FMSVGRADERKAELIGVDDEERELKIGELVEEVFKL : 598
At1g17745 : FMSVGRADERKAELIGVDDEERELKIGELVEEVFKL : 624
    
```

Figura IV.2. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la familia PGDH de *Arabidopsis thaliana* utilizando el programa GENEDOC. Los aminoácidos conservados que participan en el sitio catalítico se enmarcan con un rectángulo, y los aminoácidos que forman el dominio de unión a ligando están marcados con un asterisco.

IV.1.2. Patrón de expresión de los genes de la familia PGDH

Los análisis de expresión *in silico* del gen *PGDH* se realizaron utilizando la herramienta informática *eFP Browser* (Winter y col., 2007). Esta herramienta permitió estudiar la expresión del gen en diferentes órganos y tejidos de *Arabidopsis* y en varios estadios del desarrollo (Figura IV.3). En relación con los niveles de expresión en diferentes órganos y tejidos, se observó un patrón de expresión importante en los últimos estadios del desarrollo de la hoja (estadio senescente), en las flores, sobre todo a nivel de los sépalos (estadios de desarrollo 12 y 15), y en las raíces, tanto en las primeras fases del desarrollo de la plántula como en planta adulta. En tallos, *PGDH* mostró valores elevados de expresión en el segundo entrenudo así como en las hojas caulinares. También presenta una débil expresión durante el desarrollo del embrión (fase globular) y en las primeras etapas del desarrollo de las silicuas. El gen *PGDH* mostró valores bajos de expresión en las primeras etapas del desarrollo de las hojas (estadio 1), en el desarrollo de semillas (estadios 9 y 10), en semillas embebidas 24 h y en el polen maduro (Figura IV.3). Los valores absolutos de expresión aparecen recopilados en el Anexo, Tabla Suplementaria 2.

En relación con los niveles de expresión en diferentes órganos y tejidos del gen *3-PGDH*, se reveló un patrón de expresión importante en los cotiledones, en los primeros estadios del desarrollo de la hoja (estadios 1 a 8) y en la planta adulta (en toda la roseta y hojas caulinares). Este gen mostró una expresión mas moderada durante el desarrollo del embrión (fase globular) y en las primeras etapas del desarrollo de las silicuas. *3-PGDH* mostró valores muy bajos de expresión en las raíces durante las primeras fases del desarrollo (plántula) y en las últimas fases del crecimiento de la planta (estadio adulto) y en el desarrollo de las semillas desde el estadio 7 hasta el estadio 10 (Figura IV.4). Los valores absolutos de expresión aparecen recopilados en el Anexo, Tabla Suplementaria 3.

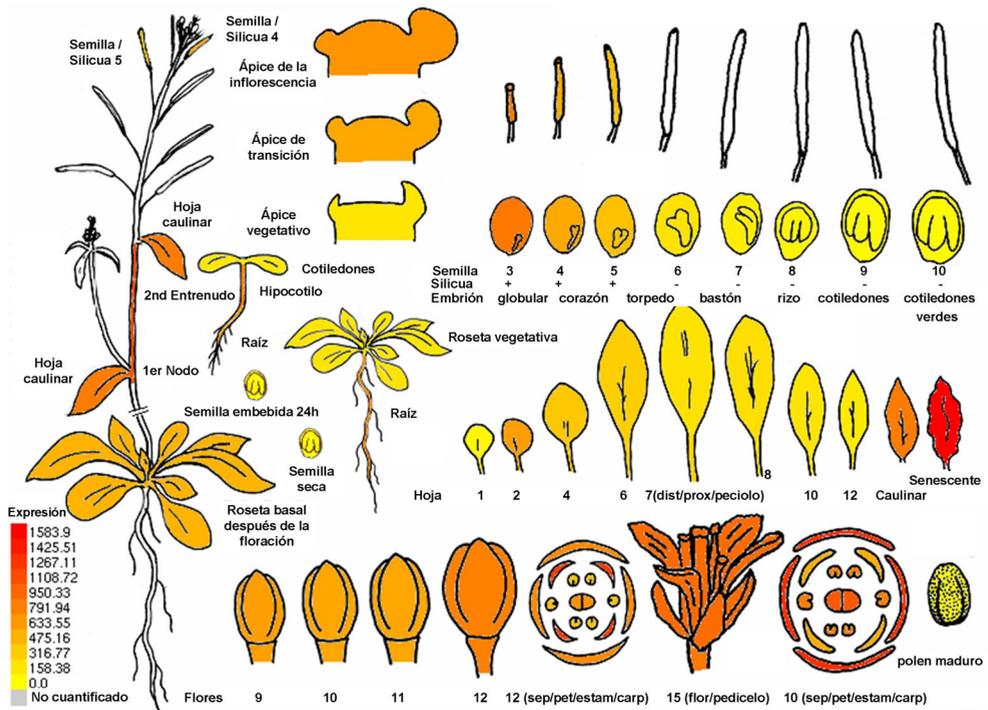


Figura IV.3. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular del gen *PGDH* (At1g17745) de *Arabidopsis* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión génica diseñado por Schmid y col. (2005) para el estudio de los diferentes estadios del desarrollo de *Arabidopsis*. Los valores absolutos se muestran en el Anexo, Tabla Suplementaria 2.

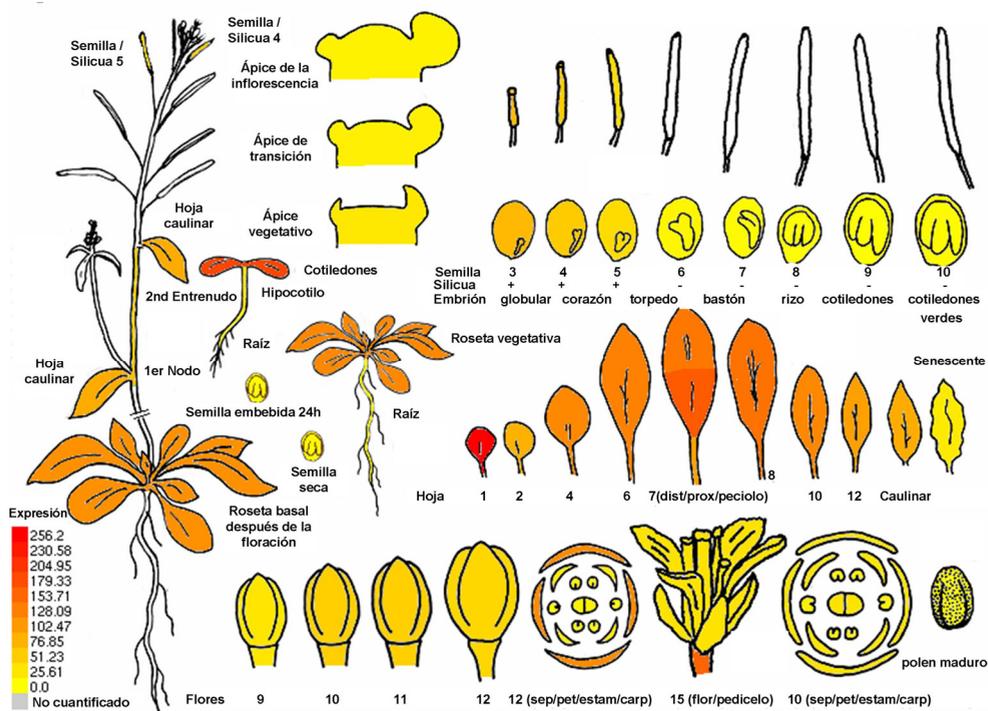


Figura IV.4. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular del gen *3-PGDH* (*At3g19480*) de *arabidopsis* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión génica diseñado por Schmid y col. (2005) para el estudio de los diferentes estadios del desarrollo de *arabidopsis*. Los valores absolutos se muestran en el Anexo, Tabla Suplementaria 3.

El gen *EDA9* mostró un patrón de expresión muy marcado en tallos (a nivel de los ápices vegetativos y de la zona transición), en los primeros estadios del desarrollo de la flor (estadios 9 a 12), en la semilla [las primeras etapas del desarrollo de las silicuas (estadio 4) y en el embrión (fase corazón-torpedo)]. En la raíces se expresa tanto en las primeras fases del desarrollo de la plántula como en planta adulta (Figura IV.5). *EDA9* mostró valores bajos de expresión en el desarrollo de las semillas desde el estadio 8 hasta el estadio 10, en las hojas

caulinares y en los últimos estadios de desarrollo de la flor, concretamente en el estadio 15 (estambres y pétalos). Los valores absolutos de expresión aparecen recopilados en el Anexo, Tabla Suplementaria 4.

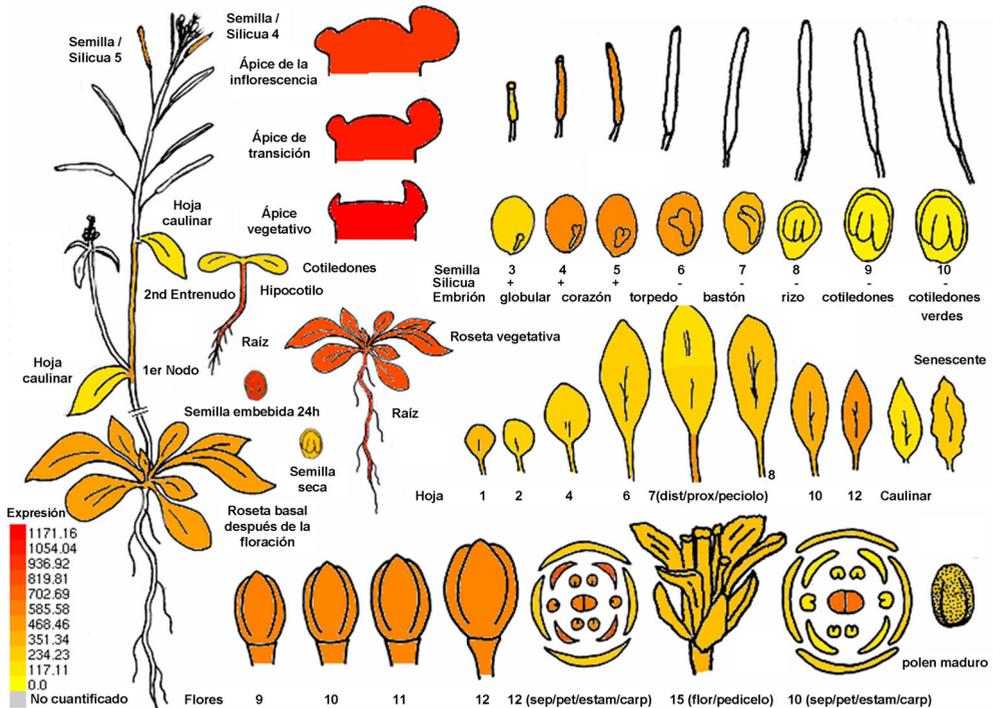


Figura IV.5. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular del gen *EDA9* (At4g34200) de *Arabidopsis* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión genética diseñado por Schmid y col. (2005) para el estudio de los diferentes estadios del desarrollo de *Arabidopsis*. Los valores absolutos se muestran en el Anexo, Tabla Suplementaria 4.

IV.1.3. Estudio de la región promotora de los genes de la familia PGDH

Con el fin de conocer los posibles elementos de regulación y expresión de los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*, se analizaron sus secuencias promotoras a través de la aplicación *Promomer tool* (detalles en el Apartado III.12).

Como se muestra en la Tabla IV.1, la región promotora del gen *PGDH* contiene regiones consenso que también están presentes en genes que controlan el

desarrollo de las anteras, como es el caso de los genes homeóticos florales *AGAMOUS*. También, contiene regiones que intervienen durante el desarrollo del polen. Por lo tanto, el gen *PGDH* posee información importante en su región promotora para la expresión de genes en las anteras.

En el promotor del gen *3-PGDH* se encuentran regiones consenso que también están presentes en los genes que controlan el desarrollo de las anteras (*AGAMOUS*; Tabla IV.1).

Finalmente, en la región promotora del gen *EDA9*, se encuentran nuevamente regiones consenso que están presentes en los genes que controlan el desarrollo de las anteras (*AGAMOUS*). La región promotora también contiene secuencias de respuesta al ácido abscísico (ABA) como son las secuencias homólogas a los elementos de respuesta al ABA (ABRE) en maíz (ABRECE3ZMRAB28), las secuencias del elemento de respuesta a ABA y a la desecación (ABADESI2), y las secuencias homólogas a los elementos presentes en los genes *rab 21* de trigo y arroz (ABREOSRAB21), todos ellos relacionados con la respuesta ABA (Tabla IV.1).

IV. 2. Análisis de los patrones de expresión de los genes de la familia PGDH

IV.2.1. Patrón de expresión tisular mediante la reacción histoquímica GUS

Para determinar el patrón de expresión tisular de las tres isoformas de la *PGDH*, se realizaron dos ensayos de expresión GUS. En el primero se estudió el patrón de reacción GUS en plántulas de 15 días en condiciones estándar (MS1/5, detalles en el Apartado III.2.2). En el segundo experimento se utilizaron plantas adultas de 30 días de edad, con el objetivo de dilucidar el patrón de expresión GUS en órganos florales y tejido vegetativo.

Tabla IV.1. Secuencias consenso significativamente enriquecidas en las regiones promotoras de los genes *PGDH* (At1g17745), *3-PGDH* (At3g19480) y *EDA9* (At4g34200). El análisis fue realizado a través de la aplicación informática *Promomer tool* (detalles en el Apartado III.12). Únicamente se muestran aquellas secuencias que proporcionaron valores significativos a través de la aplicación ($P < 0,05$).

Gen	Secuencia	Presente en:	
<i>PGDH</i>	ATGA	Secuencias de unión a <i>AGAGAMOUS</i> (<i>AG</i>) y <i>AG LIKE 1</i> (<i>AGLI</i>): secuencias consenso de unión para los productos de los genes homeóticos <i>AG</i> y <i>AGLI</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	
	AGGA	Secuencias de unión a <i>AG</i> y <i>AGLI</i> .	
	ATGC	Secuencias de unión a <i>AG</i> . A VOZATVPP: "Secuencias de unión a VOZ" encontradas en el promotor de <i>A. thaliana</i> del gen de la V-PPase (H^+ -pirofosfatasa vacuolar); Involucrados durante el desarrollo del polen.	
	TGCT	VOZATVPP y en HaDREB2 (que interactúa físicamente in Vitro con HaHSFA9).	
	GGAG	Secuencias de unión a <i>AGAMOUS LIKE 2</i> (<i>AGL2</i>) y a VOZATVPP.	
	CCAG	Secuencias de unión a <i>AGL2</i> .	
<i>3-PGDH</i>	CCTT	Secuencias de unión a <i>AG</i> , <i>AGLI</i> , <i>AGL2</i> y VOZATVPP.	
	TAGC	Secuencias de unión a <i>AG</i> , <i>AGLI</i> , <i>AGL2</i> y VOZATVPP.	
<i>3-PGDH</i> / <i>EDA9</i>	TACT	Secuencias de unión a <i>AG</i> , <i>AGLI</i> , <i>AGAMOUS LIKE 3</i> (<i>AGL3</i>) y a VOZATVPP.	
	CCTC	ABRECE3ZMRAB28: elemento de respuesta a ABA en maíz.	
	CAAA	Secuencias de unión a <i>AG</i> , <i>AGLI</i> , <i>AGL2</i> y <i>AGL3</i> .	
	TCAA	Secuencias de unión a <i>AGL2</i> .	
	TTCA	Secuencias de unión a <i>AG</i> y <i>AGLI</i> .	
	TCAC	Secuencias de unión a <i>AGL2</i> .	
	<i>EDA9</i>	CGCG	ABADESI2: elemento sintético (hex-3) relacionado con la respuesta a ABA y a la desecación.
		TGCG	ABREOSRAB21: "elemento de respuesta a ABA (ABRE)" de trigo y arroz presente en genes rab21. Secuencias de unión a <i>AG</i> y <i>AGLI</i> .
GCGG		Secuencias de unión a <i>AG</i> .	
GGGG		Secuencias de unión a <i>AG</i> y <i>AGLI</i> .	
	GCGC	ABRECE3ZMRAB28: elemento de respuesta a ABA en maíz.	

En relación con el gen *PGDH* los resultados de los experimentos con plántulas mostraron una fuerte expresión de forma generalizada en la parte aérea,

aunque no se apreció a nivel de los estomas. En las raíces la expresión se vio sobre todo a nivel de la vasculatura y en los ápices (Figura IV.6).

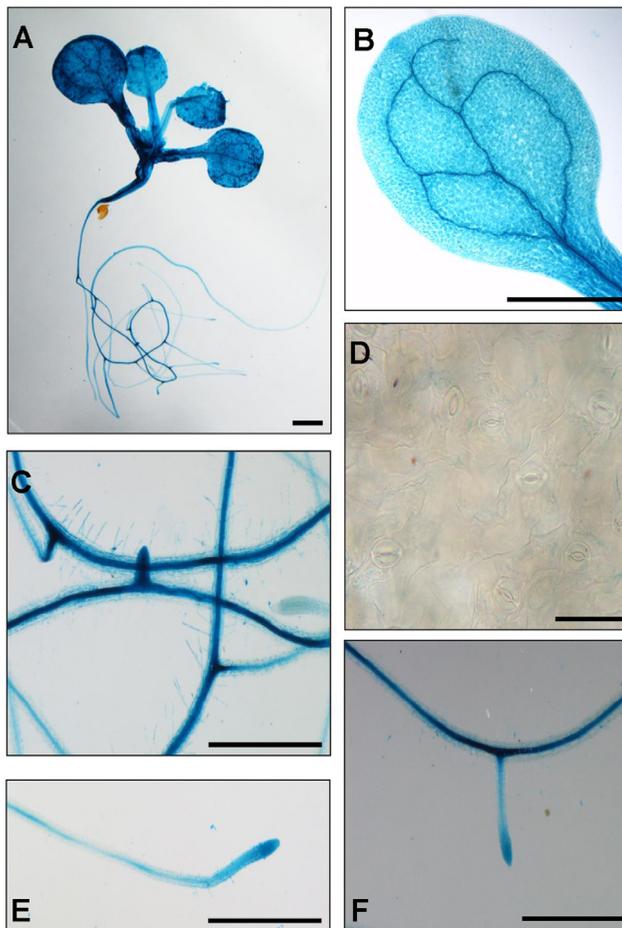


Figura IV.6. Análisis de expresión GUS bajo control del promotor del gen *PGDH* en diferentes tejidos y órganos de plántulas de *arabidopsis* de 15 días de edad. Patrón de expresión GUS bajo el control del promotor de *PGDH* (condiciones de reacción especificadas en el Apartado III.11.5) en plántulas de 15 días crecidas en condiciones estándar. Se recogen imágenes de plántula (A), cotiledon (B), raíces (C-E-F), y estomas (D). Escalas = 1 mm (A, B), 0,5 mm (C, E, F), 0,2 mm (D).

En planta adulta, la expresión GUS fue de nuevo generalizada en la parte aérea, sobre todo a nivel de las hojas. En las raíces la actividad GUS se centró

sobre todo en los haces vasculares. En las flores se observó un fuerte patrón de expresión en el estigma y en los filamentos de la antera. No se detectó expresión a nivel de los estomas, anteras y granos de polen (Figura IV.7). Estos resultados también confirmarían los principales patrones de expresión tisular observados *in silico* (eFP browser) (Figura IV.3 y Anexo Tabla Suplementaria 2).

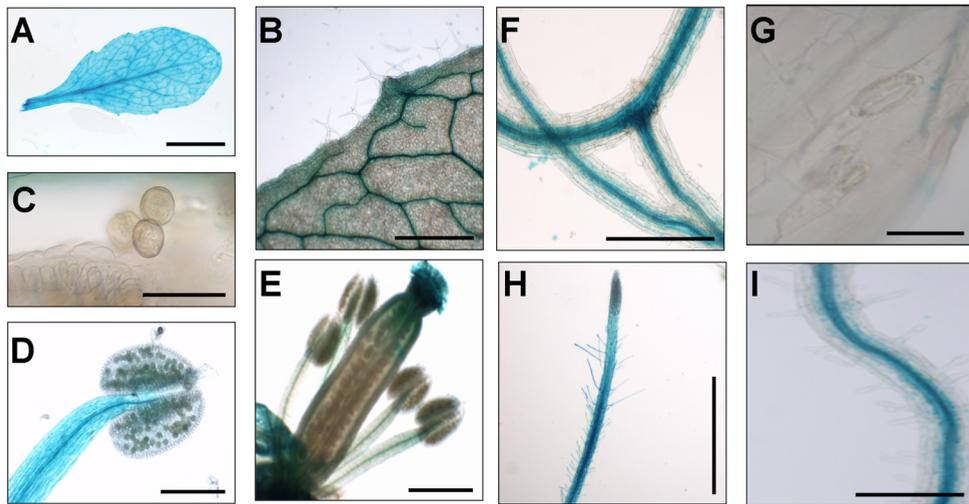


Figura IV.7. Análisis de expresión GUS bajo control del promotor del gen *PGDH* en diferentes tejidos y órganos de plantas adultas de 30 días de *Arabidopsis thaliana*. Se recogen imágenes de la vista general de la hoja (A y B), granos de polen (C), antera (D), estigma y estambres (E), raíces (F, H e I) y estomas (G). Escalas = 1 cm (A), 0,5 mm (B), 0,05 mm (C) y 0,2 mm (D, E, F, G, H, I).

El estudio del patrón de expresión del gen *3-PGDH* en plántulas mostró nuevamente una fuerte expresión, de forma generalizada, en la parte aérea sobre todo a nivel de cotiledones (y de forma intensa a nivel distal), aunque no se apreció a nivel de los estomas. En raíces, la expresión fue observada solamente en la zona de unión con la parte aérea, pero o no hubo, o fue prácticamente inexistente la expresión en el tejido vascular de las raíces (Figura IV.8). En planta adulta, al igual que con el gen *PGDH*, la expresión del gen *3-PGDH* fue intensa en la parte aérea

(sobre todo en los haces vasculares), en el estigma y en los haces vasculares del filamento de la antera. La expresión fue nula en los estomas, las anteras, los granos de polen y en las raíces (Figura IV.8). Estos resultados de expresión GUS, obtenidos a través de ensayos *in vitro*, concuerdan con los patrones de expresión observados *in silico* (Figura IV.4 y Anexo Tabla Suplementaria 3).

Los resultados de los experimentos GUS para determinar el patrón de expresión tisular del gen *EDA9* en plántulas (Figura IV.9), revelaron una fuerte expresión en ápices y en cotiledones (zona distal). También se observó una expresión preferencial en los estomas respecto a otras células epidérmicas. En raíces, la expresión fue intensa en la zona de unión con la parte aérea, en el tejido vascular, en la zona proximal de los meristemos y en la zona de la columela de la caliptra. En planta adulta, la expresión del gen fue intensa en los estomas, las anteras, los granos de polen y en el estigma. En cuanto a la expresión en las raíces se volvió a encontrar en los haces vasculares, en la zona de la columela de la caliptra y en meristemos (Figura IV.9). Estos resultados también confirmarían los principales patrones de expresión tisular observados *in silico* (eFP browser) (Figuras IV.5 y Anexo Tabla Suplementaria 4).

IV.2.2. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de los genes de la familia PGDH

Los análisis cuantitativos de expresión de los tres genes de la familia PGDH, se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa. Para ello se investigaron los niveles de expresión de los tres genes en plántulas de 15 días de edad (raíces y parte aérea; Figura IV.10A) y en plantas adultas de 30 días de edad (raíces, hojas, tallos, flores y silicuas; Figura IV.10B). Los resultados obtenidos en plántulas indican que *PGDH* y *EDA9* se expresan a nivel de la raíz mientras que *3-PGDH* se expresa principalmente en la parte aérea y prácticamente no se expresa a nivel de las raíces. En planta adulta, tomando como referencia el nivel de expresión del tallo, la expresión de los genes *PGDH* y *EDA9* fue mayor en las raíces y en las

silicuas, en comparación con los otros órganos estudiados, mientras que la expresión de *3-PGDH* fue mayor en las hojas y en las silicuas.

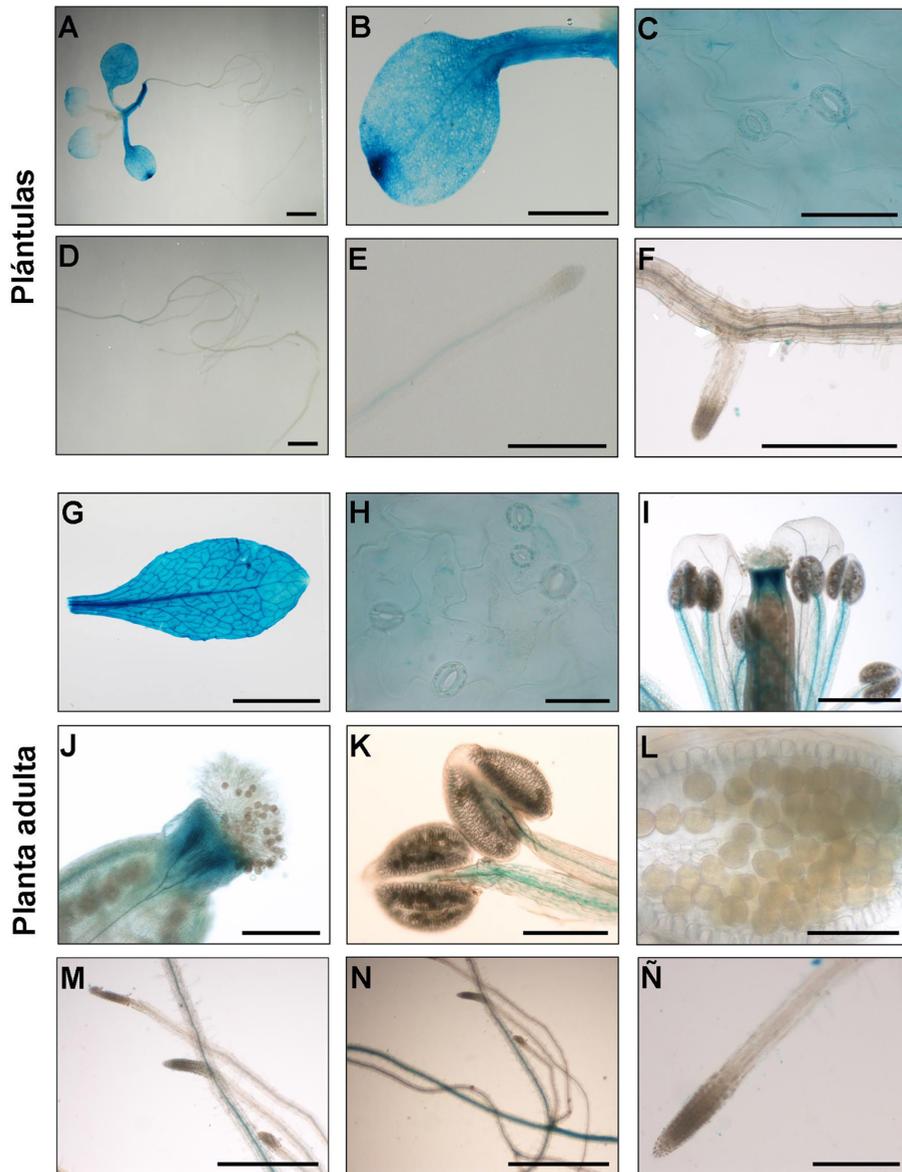


Figura IV.8. Análisis de expresión del gen *3-PGDH* en diferentes tejidos y órganos de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra el patrón GUS de expresión bajo el control del promotor del gen *3-PGDH* en plántulas de 15 días (A-F) crecidas *in vitro* y en plantas adultas de 30 días (G-Ñ) crecidas en el invernadero. Se recogen imágenes de plántula (A), cotiledon (B), estomas (C-H), raíces (D-E-F-M-N-Ñ), hoja adulta (G), flor (I), estigma (J), antera (K) y granos de polen (L). Escalas = 1 mm (A, B, D y I), 0,2 mm (C, H), 0,5 mm (E, F, J, K, M, N, Ñ), 1 cm (G) y 0,05 mm (L).

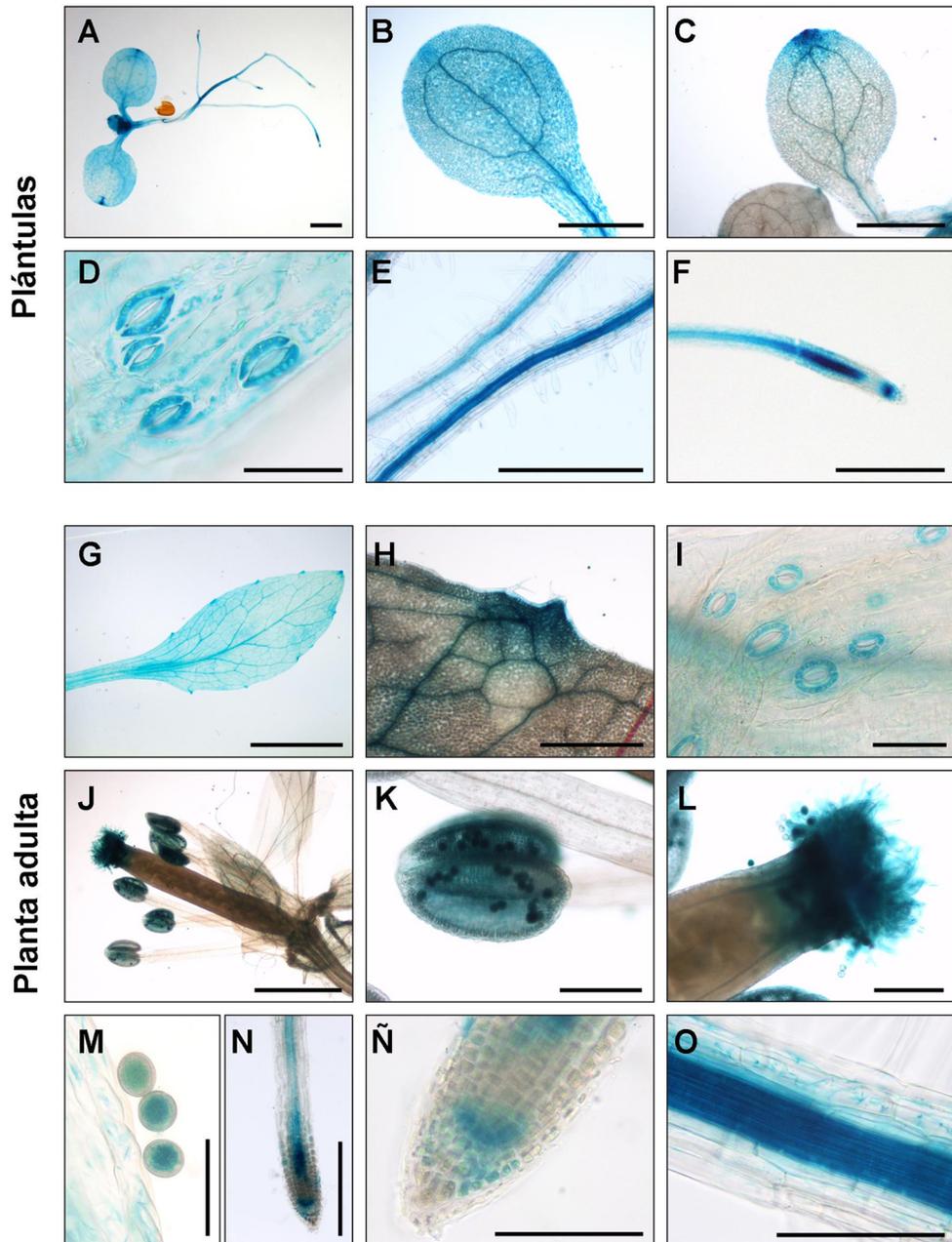


Figura IV.9. Análisis de expresión del gen *EDA9* en diferentes tejidos y órganos de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra el patrón de expresión GUS bajo el control del promotor *EDA9* en plántulas de 15 días (A-F) crecidas *in vitro* y en plantas adultas de 30 días (G-O) crecidas en el invernadero. Se recogen imágenes de plántula (A), cotiledones (B y C), estomas (D a I), raíces (E, F, N, Ñ, O), hoja adulta (G y H), flor (J), antera (K), estigma (L) y granos de polen (M). Escalas = 1 mm (A, B, C, E, J), 0,2 mm (D, I, Ñ, O), 0,5 mm (F, H, K, L, N), 1 cm (G) y 0,05 mm (M).

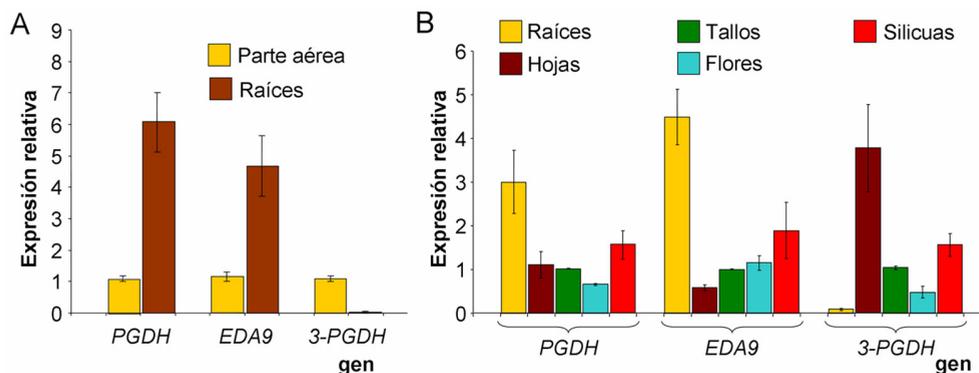


Figura IV.10. Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de los genes *PGDH*, *EDA9* y *3-PGDH* realizado sobre plántulas de 15 días cultivadas *in vitro* (A) y plantas adultas de 30 días de invernadero (B) de *Arabidopsis thaliana*. Los valores representados son la media \pm SE; $n = 3$ muestras biológicas independientes. Los valores de expresión en plántulas han sido normalizados utilizando la expresión de la parte aérea con valor 1, en el caso de planta adulta el valor 1 de referencia corresponde a los tallos.

Estos resultados corroboran los análisis histoquímicos basados en patrones de expresión GUS, que muestran que *PGDH* y *EDA9* tienen patrones de expresión tanto en parte aérea como en raíces, mientras que *3-PGDH* muestra expresión a nivel de la parte aérea pero no en las raíces (Figura IV.6 a IV.9).

IV.2.3. Patrón cuantitativo de expresión de los genes de la familia PGDH en diferentes condiciones experimentales

Para estudiar los factores que pudieran estar implicados en la regulación (inducción o represión) de la expresión de los genes de la familia PGDH, se ensayaron varias condiciones experimentales. Concretamente, se estudió la influencia de la serina, de la oscuridad, del cloruro de sodio (NaCl) y de las bajas temperaturas (4°C) sobre los niveles de expresión de los tres genes.

En un primer experimento, las plántulas se expusieron a un tratamiento que llamamos “tratamiento de duración larga” con serina o cloruro sódico (100 mM), en el que las plantulas estuvieron en estas condiciones desde la germinación hasta la recogida del material. Otro tratamiento implicaba la exposición de las plántulas a

diferentes periodos de oscuridad antes del momento de la toma de las muestras (8 ó 24 horas). Además, se realizó un tercer experimento que se llamó “tratamiento de duración corta” en el que plantas, que crecieron durante 15 días en medios de cultivo estándar conforme a lo especificado en el Apartado III.2.2, se trasplantaron a medios suplementados con 0.1 mM de serina ó 250 mM de NaCl, o se colocaron a 4°C durante 24 horas. En todos los casos, se evaluó de forma independiente el efecto de los distintos tratamientos sobre la parte aérea y las raíces (Figura IV.11B).

La exposición continua de las plántulas al aminoácido serina o a NaCl, indujo significativamente la expresión de los genes *PGDH* y *EDA9* en la parte aérea y en la raíz. Por el contrario, exposiciones más cortas a la serina (24 h) no afectaron a la expresión de *PGDH* y *EDA9*. En cuanto al tratamiento de duración corta con NaCl en las partes aéreas sí que hubo un incremento de expresión en ambos genes, pero en raíces solo se indujo en el gen *PGDH*. Los tratamientos de frío (4°C) durante 24 horas mostraron de nuevo un incremento significativo de la expresión tanto en parte aérea como en raíces, de en ambos genes. Respecto al gen *3-PGDH*, los tratamientos de larga o corta duración con serina no provocaron ningún cambio de expresión, cosa que sí hizo el tratamiento con NaCl, que produjo un incremento en condiciones largas y un descenso en tratamientos cortos. El tratamiento con 4°C durante 24 horas también produjo una disminución de la expresión en este gen (Figura IV.11).

En el tratamiento de 8 horas de oscuridad, las variaciones significativas en la expresión de los genes fueron dependientes del gen estudiado. Así, únicamente se observaron incrementos en el caso del gen *EDA9* y *3-PGDH* en parte aérea, mientras que la expresión de *PGDH* en la parte aérea o de *PGDH* y *EDA9* en las raíces no varió respecto a los valores observados en luz (Figura IV.11). En ningún caso, se observó reducción de la expresión génica en estas condiciones. Sin embargo, los tratamientos de oscuridad durante 24 horas redujeron significativamente la expresión de los tres genes en ambos órganos.

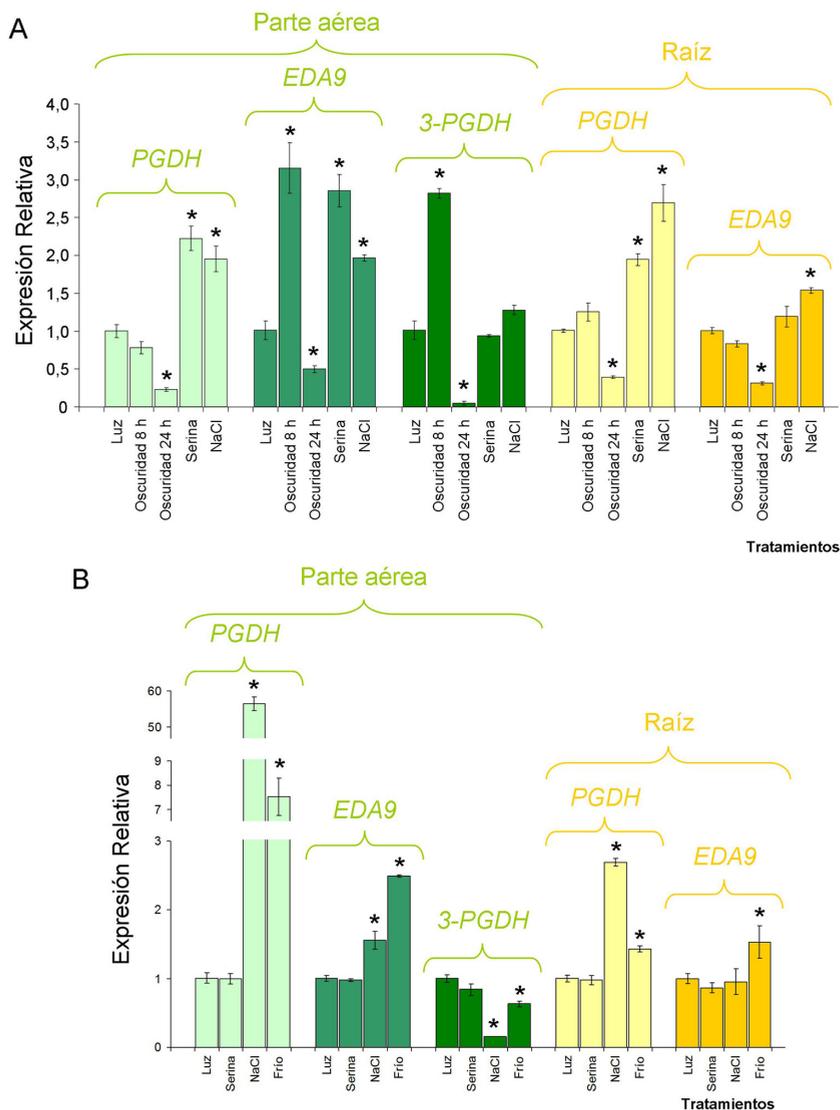


Figura IV.11. Efecto de diversos tratamientos de larga duración y de oscuridad (A) y corta duración (B) sobre la expresión de los 3 genes de la familia PGDH (*PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*), realizada por RT-PCR cuantitativa, en plantas de *Arabidopsis thaliana*. En los tratamientos de larga exposición, las plantas crecieron en medios suplementados con 0,1 mM de serina y 100 mM de NaCl (A). En los tratamientos de corta duración, las plantas se incubaron a 4°C, o permanecieron 24 h en presencia de 0,1 mM de serina o 250 mM de NaCl (B). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas biológicas independientes. *Significativamente diferente respecto al control ($P < 0,05$).

IV.3. Localización subcelular de las 3 enzimas de la familia PGDH

Según el servidor de predicción de péptidos señal *ChloroP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) las tres proteínas de la familia PGDH tienen una posible señal de localización plastidial en posición N-terminal, por lo que se estudió la localización celular de PGDH, 3-PGDH y EDA9 mediante fusiones con GFP. Estos experimentos se llevaron a cabo en plantas transgénicas T₃, obtenidas de la transformación de individuos silvestres con las construcciones *Pro35S:PGDH*, *Pro35S:3-PGDH* y *Pro35S:EDA9* que llevan fusionado el cDNA de la proteína fluorescente GFP en su extremo C-terminal. Para poner a punto las condiciones del microscopio se emplearon plantas que expresan solo la proteína GFP, bajo el control del promotor 35S.

Determinado el patrón de fluorescencia, la localización subcelular del control y las condiciones apropiadas para la localización de la GFP, se procedió primero al estudio de la localización subcelular de la proteína de fusión PGDH-GFP siguiendo el mismo procedimiento. Para ello, examinamos mediante microscopía confocal tanto las células del mesófilo como las del ápice radicular. Análisis previos mostraron una localización plastidial para la enzima PGDH (Ho y col., 1999a; Ho y Saito, 2001). Nuestros resultados de localización mostraron una total coincidencia entre la fluorescencia emitida por la GFP y la autofluorescencia de las clorofilas de los cloroplastos en células del mesófilo (datos no mostrados). En los análisis centrados en el tejido epidérmico, solo se observó fluorescencia y coincidencia entre la señal GFP y la señal emitida por los cloroplastos en las células oclusivas de los estomas, mostrando la imagen una ausencia total de emisión fluorescente en el resto del tejido epidérmico, dado que estas células no contienen plastos. Los estudios de fluorescencia en el ápice radicular, también mostraron un patrón en concordancia con la localización plastidial de la enzima PGDH (Figura IV.12).

Para los otros dos tipos de fusiones (3-PGDH-GFP y EDA9-GFP) los resultados de los análisis de localización celular fueron idénticos a los obtenidos para la fusión GFP con la proteína PGDH (Figura IV.12), por lo que estos resultados permiten atribuir una localización plastidial a las tres enzimas de la familia PGDH.

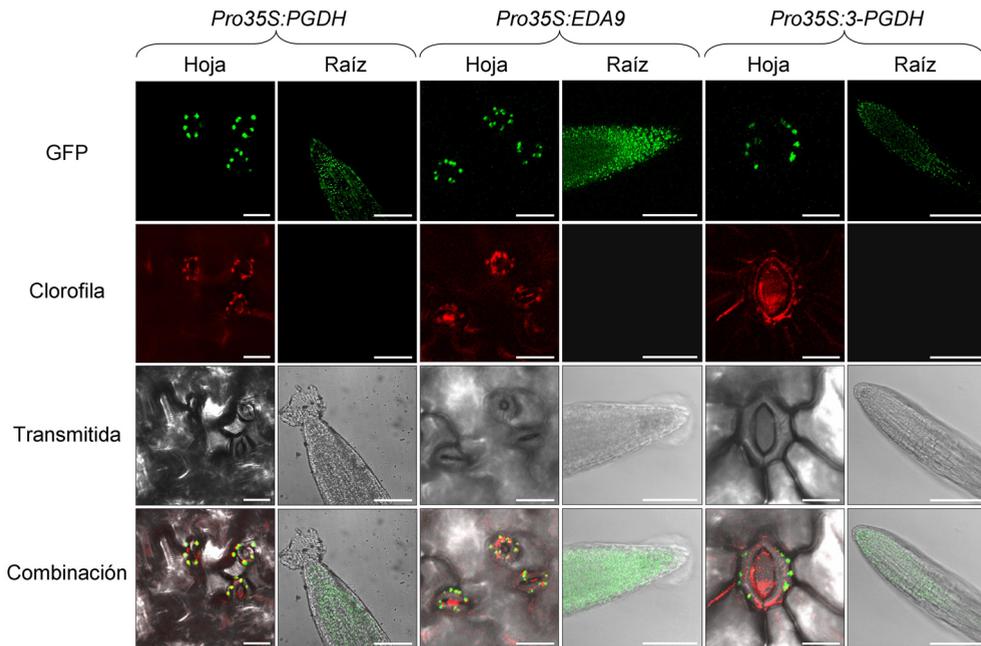


Figura IV.12. Localización subcelular de las fusiones PGDH-GFP , EDA9-GFP y 3-PGDH-GFP. El análisis de fluorescencia se realizó mediante microscopía confocal en células estomáticas (hojas) y del ápice radicular (raíces). De arriba a bajo se muestra la imagen generada por emisión de fluorescencia GFP, la autofluorescencia de las clorofilas de los cloroplastos, la imagen de campo claro (luz transmitida) y la combinación de las imágenes. Escalas = 20 μm (hojas), 100 μm (raíces).

IV.4. Caracterización funcional de los genes de la familia PGDH

IV.4.1. Estudio genético de mutantes para los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*

La caracterización funcional de los genes de la familia PGDH requirió de una búsqueda previa para identificar mutantes insercionales de pérdida de función.

Para ello se consultó la página web <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>, se pidieron al NASC las semillas, se obtuvieron las plantas y, con el ADN genómico de hojas, se realizó un genotipado por PCR para identificar los mutantes homocigotos. Este genotipado consistió en dos o tres reacciones de PCR, una de ellas con cebadores específicos para el gen flanqueante de dicha inserción (para identificar alelos no mutados), y dos reacciones con cada uno de los cebadores anteriores junto con un cebador interno del T-DNA (aunque en principio solo debería de funcionar una de ellas) que se utilizan para identificar los alelos mutantes (detalles en el Apartado III.7.1.1). El producto de PCR resultante de la amplificación realizada con uno de los cebadores flanqueantes de la inserción y el cebador correspondiente a la región de la inserción, previa visualización de la banda correspondiente en gel de agarosa y su purificación, se secuenció para la verificación y localización exacta de la zona de inserción. Del gen *PGDH* se identificaron dos mutantes, *pgdh1* (Salk_048256) y *pgdh2* (Salk_149747), que llevaban una inserción de T-DNA. La inserción de T-DNA se localizó en el primer intrón desde el ATG en el mutante *pgdh1* y en el cuarto exón en el mutante *pgdh2*. La localización exacta de cada inserción de T-DNA se presenta en la Figura IV.13 y Tabla IV.2.

De las semillas suministradas por el NASC, únicamente se identificaron por PCR individuos heterocigotos *PGDHpgdh1*, *PGDHpgdh2* y plantas silvestres singénicas para el gen *PGDH*, que fueron utilizadas como grupo control en experimentos posteriores. A partir de las plantas heterocigotas se obtuvieron líneas homocigotas puras (*pgdh1pgdh1* y *pgdh2pgdh2*) que mostraron un fenotipo visual similar a las plantas control.

Para el gen *3-PGDH* se siguió el mismo protocolo de búsqueda y obtención que en el caso anterior y pudimos identificar los mutantes *3-pgdh1* (SM_3_37584, obtenido por inserción de transposones) y *3-pgdh2* (GK_877F12). Como en el caso anterior, en la población inicial solamente se identificaron plantas silvestres y heterocigotas, que al segregar dieron líneas homocigotas. Tras secuenciar los

amplificados purificados de las bandas mutantes se determinó que ambas líneas presentaban la inserción del T-DNA o del transposon en el primer exón (Figura IV.13 y Tabla IV.2).

Finalmente, para el gen *EDA9* se identificaron dos alelos que nos permitirían obtener líneas puras, el *eda9.1* (GK_155B09) y el *eda9.2* (GK_867A04). De las semillas suministradas para el alelo *eda9.1* obtuvimos plantas silvestres singénicas y plantas heterocigotas (*EDA9eda9.1*), pero a partir de estas últimas no fue posible la identificación de líneas puras homocigotas (*eda9.1eda9.1*). En las semillas del otro mutante, pudimos encontrar tanto plantas silvestres singénicas como plantas heterocigotas (*EDA9eda9.2*) y homocigotas (*eda9.2eda9.2*; visualmente indistinguibles de las plantas control). La inserción del T-DNA se localizó en el cuarto exón desde el ATG para el alelo *eda9.1*, y en la zona 5'UTR para el mutante *eda9.2* (Figura IV.13 y Tabla IV.2).

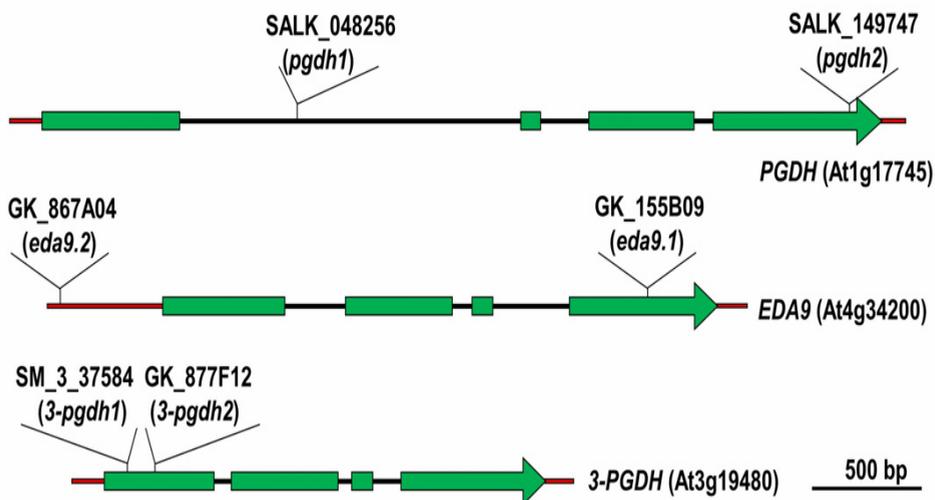


Figura. IV.13. Localización de la inserción de T-DNA de las líneas mutantes de la familia PGDH. Los exones aparecen representados como rectángulos de color verde, los intrones con líneas de color negro y las regiones UTR con líneas rojas. Para cada uno de los mutantes se indica el punto exacto de la inserción.

Tabla IV.2. Localización genómica de las líneas mutantes, de inserción de T-DNA o transposones, de la familia PGDH. La numeración de los nucleótidos comienza con la Adenina del ATG (codón de inicio).

Gen	Mutante	Localización según nuestra secuenciación	Localización según el TAIR	Nombre del alelo
At1g17745 (<i>PGDH</i>)	Salk_048256	+1156 pb (1 ^{er} intrón)	+1158 pb (1 ^{er} intrón)	<i>pgdh1</i>
	Salk_149747	+3668 pb (4 ^o exón)	+3664 pb (4 ^o exón)	<i>pgdh2</i>
At4g34200 (<i>EDA9</i>)	GK 155B09	+2210 pb (4 ^o exón)	+2329 pb (4 ^o exón)	<i>eda9.1</i>
	GK 867A04	-468 pb (5'UTR)	-150 pb (5'UTR)	<i>eda9.2</i>
At3g19480 (<i>3-PGDH</i>)	SM_3_37584	+105 pb (1 ^{er} exón)	+106 pb (1 ^{er} exón)	<i>3-pgdh1</i>
	GK 877F12	+229 pb (1 ^{er} exón)	+336 pb (1 ^{er} exón)	<i>3-pgdh2</i>

El análisis mediante RT-PCR cuantitativa reveló que los niveles de expresión del gen *PGDH* en los mutantes *pgdh1pgdh1* y *pgdh2pgdh2*, y de *3-PGDH* en *3-pgdh1 3-pgdh1* y *3-pgdh2 3-pgdh2* eran muy bajos o fueron imposibles de detectar. Por el contrario el nivel de expresión del gen *EDA9* en la única línea mutante homocigota que obtuvimos (*eda9.2eda9.2*), cuya inserción de T-DNA se encuentra a 468 nucleótidos antes del codón de inicio, fue similar a la del control (Figura IV.14).

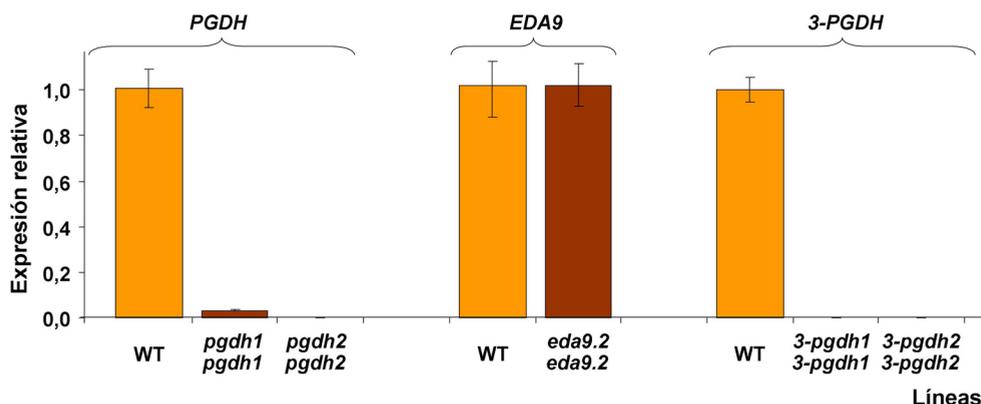


Figura IV.14. Análisis de expresión por RT-PCR cuantitativa de los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9* realizado en los mutantes *pgdh1pgdh1* y *pgdh2pgdh2*, *eda9.2eda9.2*, y *3-pgdh1 3-pgdh1* y *3-pgdh2 3-pgdh2*, respectivamente. Las plántulas utilizadas tenían 15 días de edad y fueron cultivadas en condiciones de crecimiento estándar en medio MS1/5. Se representa el valor medio y el error estándar de tres réplicas biológicas independientes.

IV.4.2. Estudio fenotípico de los mutantes para los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*

Una vez obtenidas las líneas puras para los diferentes mutantes, se procedió al estudio de sus fenotipos de crecimiento. A pesar de los bajos o nulos niveles de expresión génica de *PGDH* o *3-PGDH* en sus respectivos mutantes homocigotos, ninguno presentó diferencias en el peso fresco de la parte aérea o raíz de plantas cultivadas *in vitro* (Figura IV.15). El mutante *eda9.2eda9.2*, que por qRT-PCR habíamos demostrado que no tenía alterada la expresión del gen *EDA9* (y por tanto se podía considerar como un control), tampoco mostró ningún fenotipo en plantas cultivadas *in vitro* (Figura IV.15).

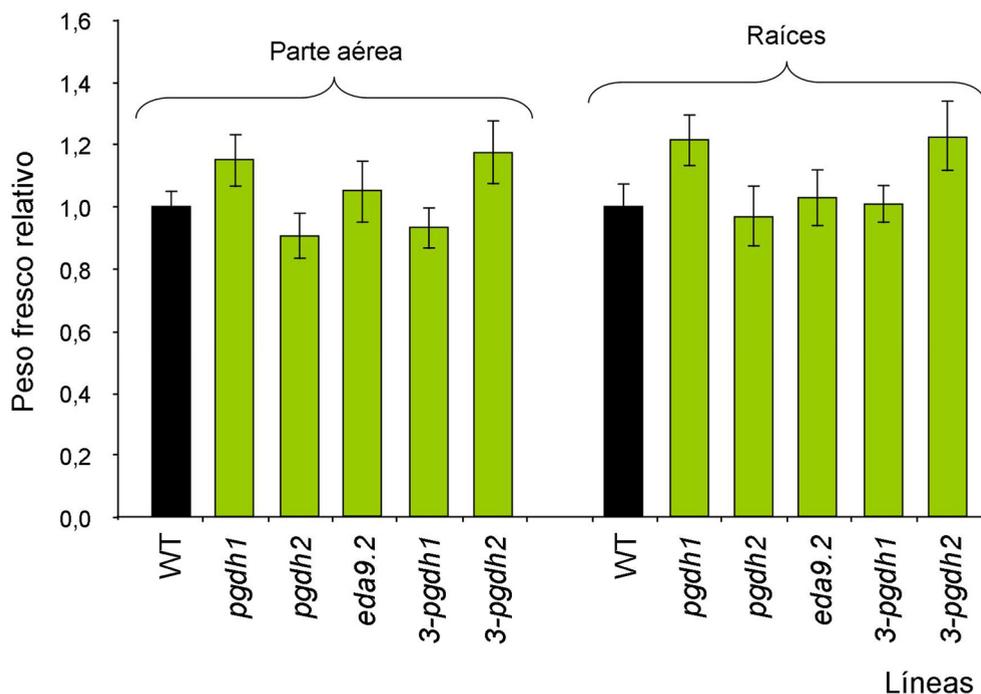


Figura IV.15. Peso fresco relativo (parte aérea y raíz) de plantas silvestres (WT, barras en negro) y líneas homocigotas mutantes de los genes de la familia PGDH (barras en color verde) crecidas en un medio MS1/5 durante 18 días. Para simplificar se indica solamente uno de los dos alelos. Se representa la media \pm SE, $n \geq 20$ repeticiones biológicas independientes. No hubo diferencias significativas respecto a los controles en ningún caso.

IV.4.3. Obtención de plantas transgénicas para los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*

Una vez transformadas las plantas silvestres de arábidopsis y obtenidas líneas homocigotas T₃ de una inserción para el transgén (construcciones con el promotor 35S), se realizaron análisis por RT-PCR cuantitativa, para comprobar si realmente tenían inducción del transgén y así poder elegir las tres líneas con mayor expresión para cada uno de los genes. En el caso de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH* se eligieron las líneas *OexPGDH-L1*, *-L2* y *-L5*, para las del gen *EDA9* se seleccionaron las líneas *OexEDA9-L1*, *-L2* y *-L3*, y para el gen *3-PGDH* se eligieron las líneas *Oex3-PGDH-L4*, *-L5* y *-L6* (Figura IV.16).

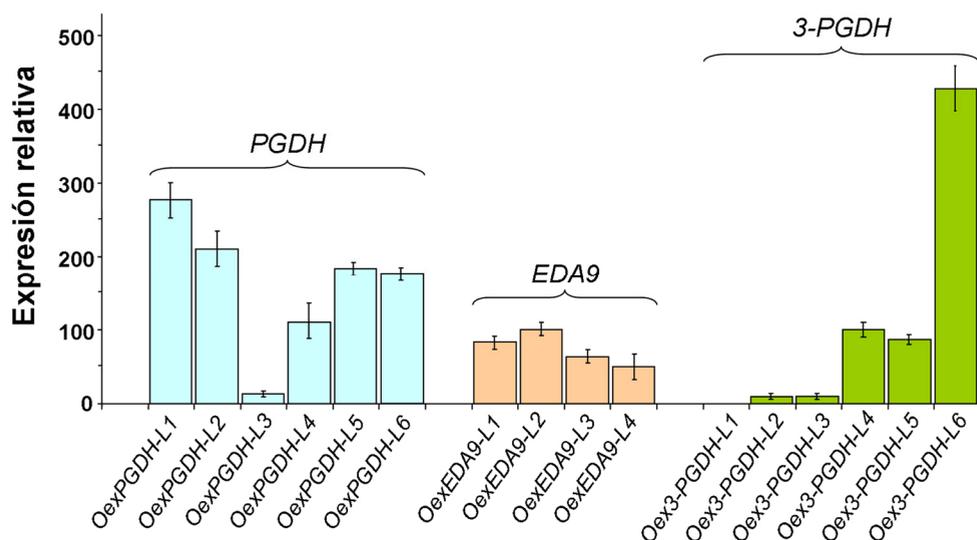


Figura IV.16. Análisis por RT-PCR cuantitativa de plantas silvestres y líneas sobreexpresoras de los genes *PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*. Plantas silvestres fueron transformadas con las construcciones *Pro35S:PGDH*, *Pro35S:3-PGDH* o *Pro35S:EDA9* para obtener las líneas transgénicas (detalles en el Apartado III.7.11.2). Para cada uno de los genes estudiados la normalización se hizo respecto al valor de plantas silvestres (tomado como 1, barras no mostradas). Para cada línea se representa el valor medio \pm SE; n = 3 réplicas biológicas independientes.

Todas las líneas transgénicas sobreexpresoras de los 3 genes de la familia PGDH, no mostraron ningún retraso o alteración significativa en el crecimiento

bajo las condiciones normales de cultivo *in vitro*, a excepción de las obtenidas para el gen *EDA9* que presentaron menor peso fresco cuando se compararon con las plantas control (Figura IV.17).

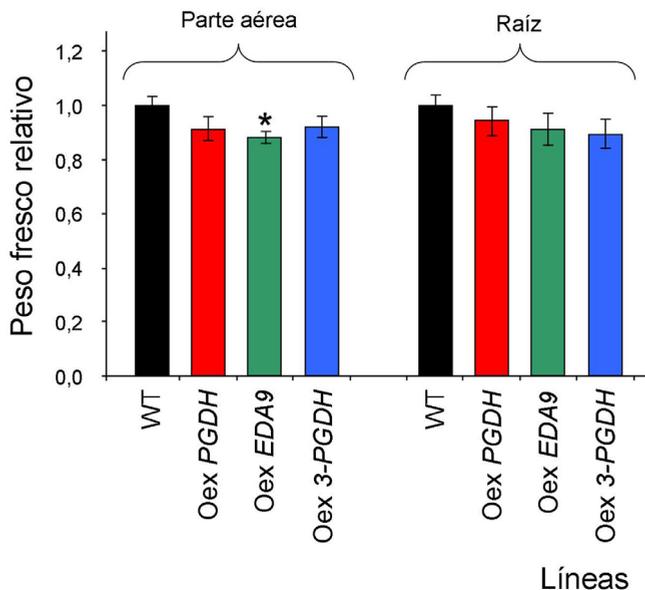


Figura IV.17. Peso fresco relativo (parte aérea y raíz) de plantas silvestres (WT) y plantas sobreexpresoras de los genes de la familia PGDH cultivadas en un medio MS1/5 durante 18 días. Para cada gen se realizaron mezclas homogéneas de semillas de las líneas seleccionadas. Los valores son la media \pm SE, $n \geq 20$ repeticiones biológicas independientes. * Significativamente diferente respecto al control ($P < 0,05$).

IV.4.4. Estudio genético del alelo *eda9.1*

Las semillas procedentes de las plantas *EDA9eda9.1*, fueron recogidas de forma independiente y sembradas nuevamente para su estudio. Tras los análisis de genotipación por PCR de la descendencia de plantas heterocigotas *EDA9eda9.1*, observamos que no se recuperaron individuos homocigotos *eda9.1eda9.1*. En total se analizaron 200 plantas, de las cuales se recuperaron 77 plantas silvestres (38,5%) para el gen *EDA9* (*EDA9EDA9*) y 123 individuos heterocigotos (*EDA9eda9.1*; 61,5%), lo que nos indicó que probablemente los individuos homocigotos *eda9.1eda9.1* no eran viables (Tabla IV.3). En términos estadísticos,

la segregación resultante fue significativamente diferente a la relación 1:2:1 esperada ($EDA9EDA9:EDA9eda9.1:eda9.1eda9.1$) correspondiente a una segregación mendeliana normal ($X^2 = 69,87$; $P < 0,001$). Por el contrario, la segregación observada no fue significativamente diferente de una relación 1:2 ($EDA9EDA9:EDA9eda9.1$), característica de un fenotipo letal para los individuos mutantes homocigotos $eda9.1eda9.1$ ($X^2 = 2,40$; $P > 0,05$). Los resultados de segregación, llevados a cabo por análisis de PCR, reflejaron, por lo tanto, una total concordancia con una segregación mendeliana letal para el mutante homocigoto (Tabla IV.3).

Para corroborar los resultados obtenidos mediante el genotipado de la segregación de individuos $EDA9eda9.1$, se realizó un análisis de segregación basado en la resistencia al antibiótico sulfadiazina (Figura IV.18), conferida por la inserción de T-DNA (detalles en el Apartado III.1). El análisis de la segregación de los alelos $eda9.1$, realizado sobre un total de 516 semillas provenientes de plantas $EDA9eda9.1$, detectó 338 plántulas resistentes a sulfadiazina y 178 plántulas sensibles a este antibiótico. Estos valores indican que el 65,5 % de la progenie fue resistente a sulfadiazina (Tabla IV.3). Este resultado no se ajusta a un valor de resistencia esperado del 75% para un fenotipo viable de los individuos homocigotos. Por el contrario los resultados obtenidos indican que la segregación observada no es significativamente diferente de una proporción 1:2, característica de un fenotipo letal para el individuo homocigoto ($X^2 = 0,31$; $P > 0,05$), y en cambio, si es significativamente diferente de una proporción esperada 1:3 (sensible:resistente), típica de una segregación mendeliana normal, que se ajusta a un fenotipo de resistencia ligada al alelo $eda9.1$ ($X^2 = 24,82$; $P < 0,001$) (Tabla IV.3). Estos datos, basados en la resistencia a sulfadiazina, al igual que los resultados previos por análisis de PCR, sugirieron un posible defecto letal para los individuos homocigotos, apoyando la idea sugerida por los resultados previos por PCR. En consecuencia, el alelo $eda9.1$ no presenta patrones de segregación mendeliana, transmitiéndose a través de individuos heterocigotos de generación en

generación. Por otra parte, la ausencia de fenotipos aparentes en los individuos heterocigotos *EDA9eda9.1* indica que el alelo *eda9.1* presenta un carácter recesivo.

Tabla IV.3. Estudio de la segregación del alelo mutante *eda9.1* en la progenie de plantas heterocigotas (*EDA9eda9.1*) transformadas y no transformadas, y homocigotas (*eda9.1eda9.1*) transformadas con una construcción portadora de *EDA9* bajo el control del promotor nativo del gen *EDA9* (*ProEDA9:EDA9*). Se estudió la segregación de plantas autofecundadas y de plantas fecundadas a través de cruces recíprocos con plantas silvestres (*EDA9EDA9*, WT).

Fecundación autógama	Progenie	Genotipo por PCR (%)		
		<i>EDA9EDA9</i>	<i>EDA9eda9.1</i>	<i>eda9.1eda9.1</i>
<i>EDA9eda9.1</i>	200	77 (38,5) ^a	123 (61,5) ^a	0 (0,0) ^a
<i>eda9.1eda9.1</i> <i>ProEDA9:EDA9</i>	94	0 (0,0)	0 (0,0)	94 (100)
Fecundación autógama	Progenie	Segregación por resistencia a sulfadiazina		Eficiencia de transmisión ^c
		Sulf ^S (%)	Sulf ^R (%)	
<i>EDA9 eda9.1</i>	516	178 (34,5) ^b	338 (65,5) ^b	
<i>eda9.1eda9.1</i> <i>ProEDA9:EDA9</i>	530	0 (0,0)	530 (100)	
Cruzamientos recíprocos	Progenie	Resistencia a sulfadiazina		Eficiencia de transmisión ^c
		Sulf ^S (%)	Sulf ^R (%)	
Receptor x dador				
WT x <i>EDA9eda9.1</i>	392	214(54,6) ^d	178 (45,4) ^d	83,1
<i>EDA9eda9.1</i> x WT	212	108 (50,94) ^e	104 (49,06) ^e	96,3

^a Significativamente diferente de la relación esperada 1:2:1 para una segregación mendeliana normal ($X^2 = 69,87$; $P < 0,001$); no significativamente diferente de una relación 1:2, que implicaría letalidad de los individuos homocigotos mutantes ($X^2 = 2,40$; $P > 0,05$). ^b Significativamente diferente de la relación esperada 1:3 para una segregación mendeliana normal considerando el fenotipo de tolerancia a sulfadiazina ($X^2 = 24,82$; $P < 0,001$); no significativamente diferente de una relación 1:2, que implicaría letalidad de los individuos homocigotos mutantes ($X^2 = 0,31$; $P > 0,05$). ^c Eficiencia de transmisión (%) = (mutante (resistente)/silvestre (sensible) x 100. ^d No significativamente diferente de una relación 1:1 para una misma eficiencia de transmisión ($X^2 = 3,31$; $P > 0,05$). ^e No significativamente diferente de una relación 1:1 para una misma eficiencia de transmisión ($X^2 = 0,08$; $P > 0,05$). Se abrevia sulfadiazina como Sulf; ^S sensible; ^R resistente.

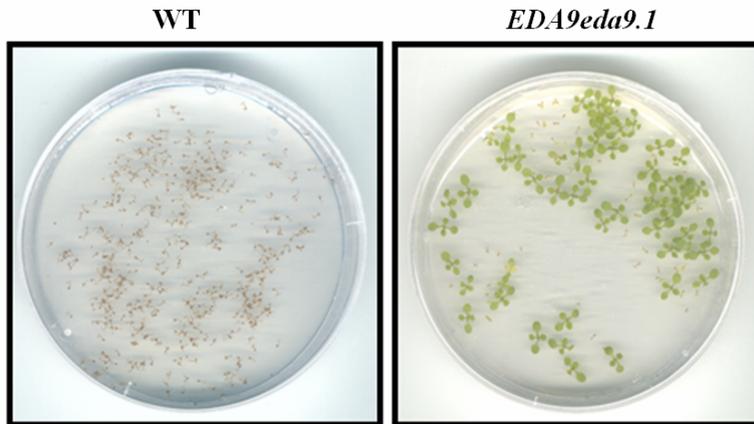


Figura IV.18. Análisis de la segregación y estudio de la transmisión del alelo *eda9.1* de la progenie de cruzamientos autógamos, a través de la resistencia a antibiótico (sulfadiazina) conferida por la inserción de T-DNA.

Tal y como se definió en Cascales-Miñana (2012), para determinar si la letalidad asociada al alelo *eda9.1* era debida a un defecto en los gametofitos (masculino, femenino, o en ambos) o a un defecto de letalidad en el embrión homocigoto, se realizaron cruces recíprocos entre plantas silvestres y plantas heterocigotas (*EDA9eda9.1*). En estos cruzamientos, únicamente pueden ocurrir tres resultados posibles en relación con la eficiencia de transmisión, que pueden seguirse por la resistencia a sulfadiazina exhibida en la progenie en la siguiente generación, tal y como se comenta a continuación.

1. Caso 1. Planta mutante heterocigota (*EDA9eda9.1*) como progenitor masculino (donante) y planta silvestre como progenitor femenino (receptor). En este caso, una progenie resultante de este cruce, la cual presente un 100% de sensibilidad a sulfadiazina, indicaría una inviabilidad del gametofito masculino portador del alelo mutante; si la segregación de la progenie del cruce recíproco produce una resistencia del 50% a dicho antibiótico la eficiencia de transmisión del gametofito masculino mutante es del 100%.

2. Caso 2. Planta mutante heterocigota (*EDA9eda9.1*) como progenitor femenino (receptor) y planta silvestre como progenitor masculino (donante). En este caso, una progenie resultante de este cruce, que presente un 100% de sensibilidad a sulfadiazina, indicaría una inviabilidad del gametofito femenino portador del alelo mutante; si la segregación de la progenie del cruce recíproco, produce una resistencia del 50% a dicho antibiótico, la eficiencia de transmisión del gametofito femenino mutante es del del 100%.
3. Caso 3. Tanto la descendencia proveniente de los cruzamientos realizados entre plantas *EDA9eda9.1* como pie masculino (donante) y plantas silvestres como progenitor femenino (receptor), y plantas *EDA9eda9.1* como progenitor femenino (receptor) y plantas silvestres como pie masculino (donante), exhibe una resistencia a sulfadiazina del 50%. Este caso representa una eficiencia de transmisión para ambos gametofitos del 100%, e indicaría que no existen defectos asociados a los mismos que afecten a la transmisión de los alelos. Este resultado representaría un caso de embrión letal para el individuo homocigoto mutante.

Los resultados del análisis de segregación por resistencia a sulfadiazina de los cruzamientos recíprocos realizados (Figura IV.19 y Tabla IV.3), de acuerdo con el caso 3, revelaron que cuando el progenitor masculino fue una planta heterocigota *EDA9eda9.1* (donante), se recuperaron 214 plantas sensibles a sulfadiazina (54,6%) y 178 plantas resistentes (45,4%). Con estos datos la desviación entre el valor observado y la proporción esperada, no es significativamente diferente de una ratio esperado 1:1 (resistente:sensible) para una eficiencia de transmisión normal ($X^2 = 3,31$; $P > 0,05$). Del mismo modo, cuando los individuos heterocigotos *EDA9eda9.1* actuaron como progenitor femenino (receptor), se recuperaron 108 plantas sensibles (50,94%) y 104 plantas resistentes (49,06%). En este caso los resultados tampoco fueron significativamente distintos para una eficiencia de transmisión normal ($X^2 = 0,08$; $P > 0,05$). Estos resultados indican que el alelo mutante *eda9.1* se transmite normalmente tanto en el gametofito masculino como

en le femenino con una eficiencia de transmisión de 83,1% y 96,3%, respectivamente, y evidencian un fenotipo de embrión letal ligado al alelo *eda9.1*. Por tanto, estos resultados indicaron que *EDA9* puede jugar un papel relevante en el desarrollo de arabis. Por ello nos concentramos en la caracterización funcional de este gen.

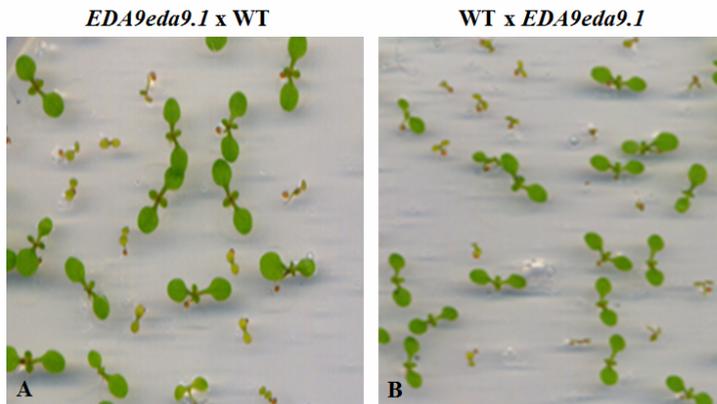


Figura IV.19. Fotografía de los experimentos de transmisión del alelo *eda9.1* en la progenie de cruzamientos recíprocos de plantas heterocigotas *EDA9eda9.1* con plantas silvestres (WT), a través de la resistencia a antibiótico (sulfadiazina) conferida por la inserción de T-DNA.

IV.4.5. Caracterización del fenotipo de letalidad de *eda9.1eda9.1*

Partiendo de los resultados obtenidos mediante evidencias genéticas, se estudió el posible efecto letal de los embriones *eda9.1eda9.1* a través de la caracterización de las semillas obtenidas de individuos *EDA9eda9.1*. Para ello, se procedió a la detección y cuantificación de posibles semillas homocigotas mutantes presentes en las silicuas (Figura IV.20). El estudio se basó en 50 silicuas *EDA9eda9.1* examinadas tras 15 y 22 días después de la polinización (15 y 22 DDP). Se observó una población de semillas anormales en silicuas 15 DDP que se distribuyó al azar a lo largo de la silicua (Figura IV.20). En esta etapa, las posibles semillas mutantes tenían una coloración más blanquecina respecto a las semillas silvestres o heterocigotas y comenzaban a desinflarse. Las posibles semillas

mutantes 22 DDP presentaban color marrón oscuro y estaban completamente desinfladas. Se procedió a contabilizar el número de semillas anormales y normales en silículas 22 DDP. De un total de 2631 semillas se observaron 537 semillas marrón oscuro y desinfladas, que serían mutantes homocigotas, frente a 2094 de color marrón y de forma normal que serían semillas silvestres o heterocigotas. El análisis de la segregación de estas semillas, mostró una relación de 1:4 (20,4% semillas mutantes: 79,6% de semillas normales; $X^2 = 0,28$; $P > 0,05$). A pesar de que no hubieron diferencias significativas en la eficiencia de transmisión de los alelos mutantes (Tabla IV.3), el porcentaje de semillas *eda9.1eda9.1* fue menor que lo esperado. Esto puede estar relacionado con la forma anormal y desinflada de las semillas mutantes, que hacía difícil identificar algunas de ellas en las silículas 22 DDP (al perderse o moverse al abrir la silícula), y como consecuencia no fueron incluidas en el análisis de la segregación.

Por lo tanto, los resultados basados en el estudio de la cuantificación de las semillas homocigotas abortadas presentes en las silículas de los individuos *EDA9eda9.1* apoyarían las evidencias obtenidas mediante los estudios de la segregación realizados por PCR y por resistencia a sulfadiazina, poniendo de manifiesto un efecto letal en los embriones homocigotos *eda9.1eda9.1*, y por tanto, un fenotipo de letalidad ligado al alelo *eda9.1*.

Para caracterizar la naturaleza de la letalidad del embrión de los mutantes homocigotos *eda9.1eda9.1* se realizó un análisis ontogénico del desarrollo del embrión utilizando semillas de plantas heterocigotas *EDA9eda9.1* (Figura IV.21). En el estadio de 1 DDP, todos los embriones examinados alcanzaron una etapa de desarrollo similar (estadio de octante, según Capron y col., 2009). Sin embargo, en el estadio de 4 DDP, algunos de los embriones mostraron un retraso en el desarrollo respecto otros embriones (estadio globular temprano frente a estadio torpedo-medio). Este retraso en el desarrollo de los embriones continuó en el estadio de 6 DDP (estadio corazón frente a estadio de cotiledón temprano) y se observó mucho mejor este retraso en el estadio de 10 DDP (estadio cotiledonar

temprano frente estadio cotiledonar tardío). En el estadio de 15 DDP, los embriones con retraso en su desarrollo eran albinos pudiendo clasificarse como cotiledones cortos (L1) según la base de datos SeedGenes (<http://www.seedgenes.org>). Los Análisis de genotipación por PCR revelaron que estos embriones abortados eran individuos *eda9.1eda9.1*.

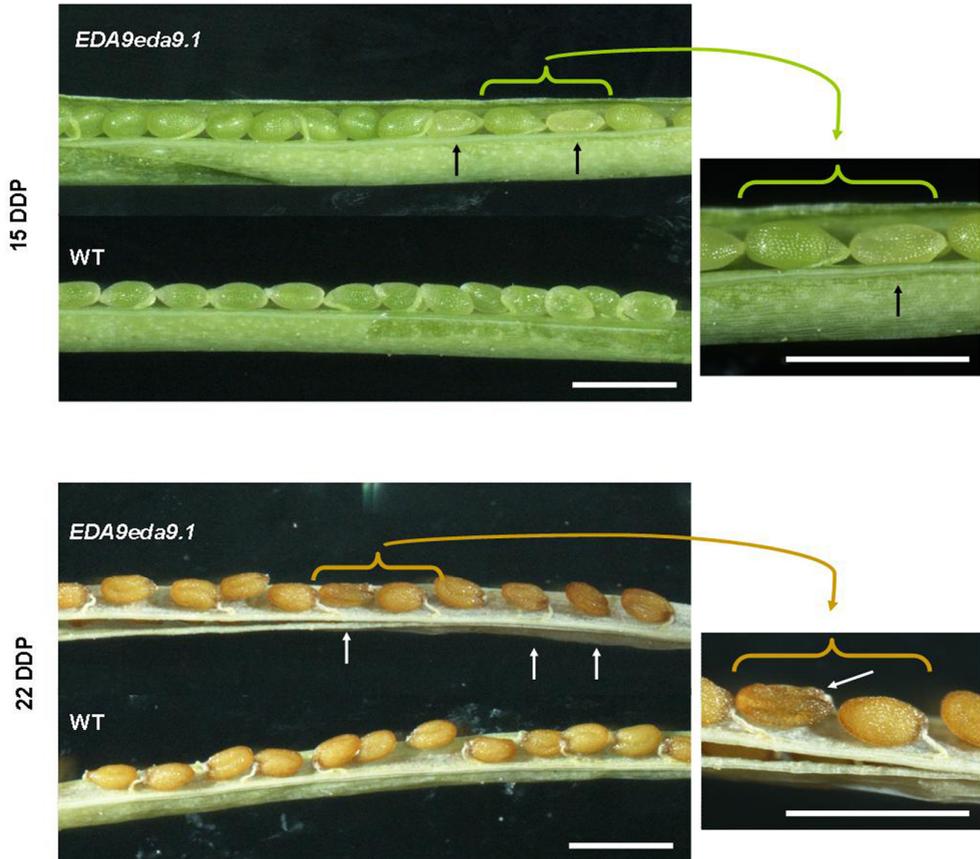


Figura IV.20. Silicuas de plantas silvestres y plantas heterocigotas *EDA9eda9.1* a los 15 y 22 días después de la polinización (DDP). Se observan semillas anormales dentro de las silicuas heterocigotas de 15 DDP y maduras (22 DDP). Las semillas de las silicuas de 22 DDP son más pequeñas en tamaño y más oscuras que las semillas normales y además tienen una forma arrugada y colapsada. Las flechas indican semillas homocigotas *eda9.1eda9.1*. Escala = 1 mm.

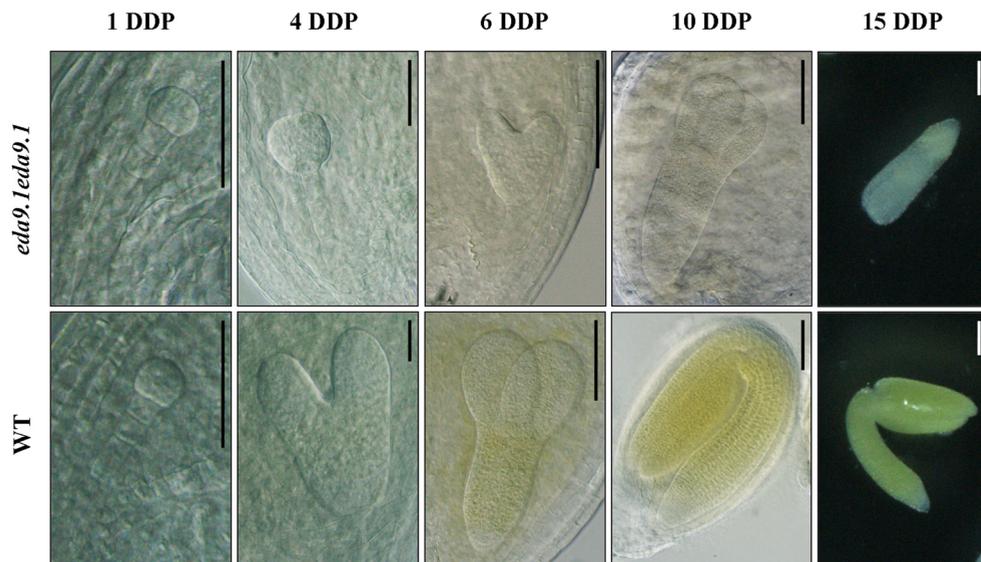


Figura IV.21. Análisis del desarrollo de embriones silvestres (WT) y homocigotos *eda9.1eda9.1*. Las micrografías muestran el desarrollo del embrión de semillas WT y homocigotas *eda9.1eda9.1*, recogidas de la misma silicua en las diferentes etapas y observadas con un microscopio de contraste de interferencia diferencial [1, 4, 6 y 10 días después de la polinización (DDP)] o con un microscopio binocular (15 DDP). Escala = 100 μ m.

IV.4.6 Análisis de complementación de *eda9.1eda9.1*

Para dilucidar si el fenotipo de embrión letal observado en los análisis de segregación estaba ligado al gen *EDA9*, se realizó una estrategia de complementación a través de la transformación de plantas heterocigotas *EDA9eda9.1* con la construcción *Pro35S:EDA9*, que expresa el cDNA del gen *EDA9* bajo el control del promotor *35S*. Como resultado de esta transformación se obtuvieron 4 líneas T₃ de inserción única del transgén, de las cuales se rescataron, por PCR, los tres genotipos posibles para el gen *EDA9* (*EDA9EDA9*, *EDA9eda9.1* y *eda9.1eda9.1*). Hay que destacar que la construcción *Pro35S:EDA9* logró rescatar individuos homocigotos *eda9.1eda9.1* de una población heterocigota. Sin embargo, estas plantas mostraron un fenotipo de esterilidad presentando silicuas cortas sin semillas (Figura IV.22A y B).

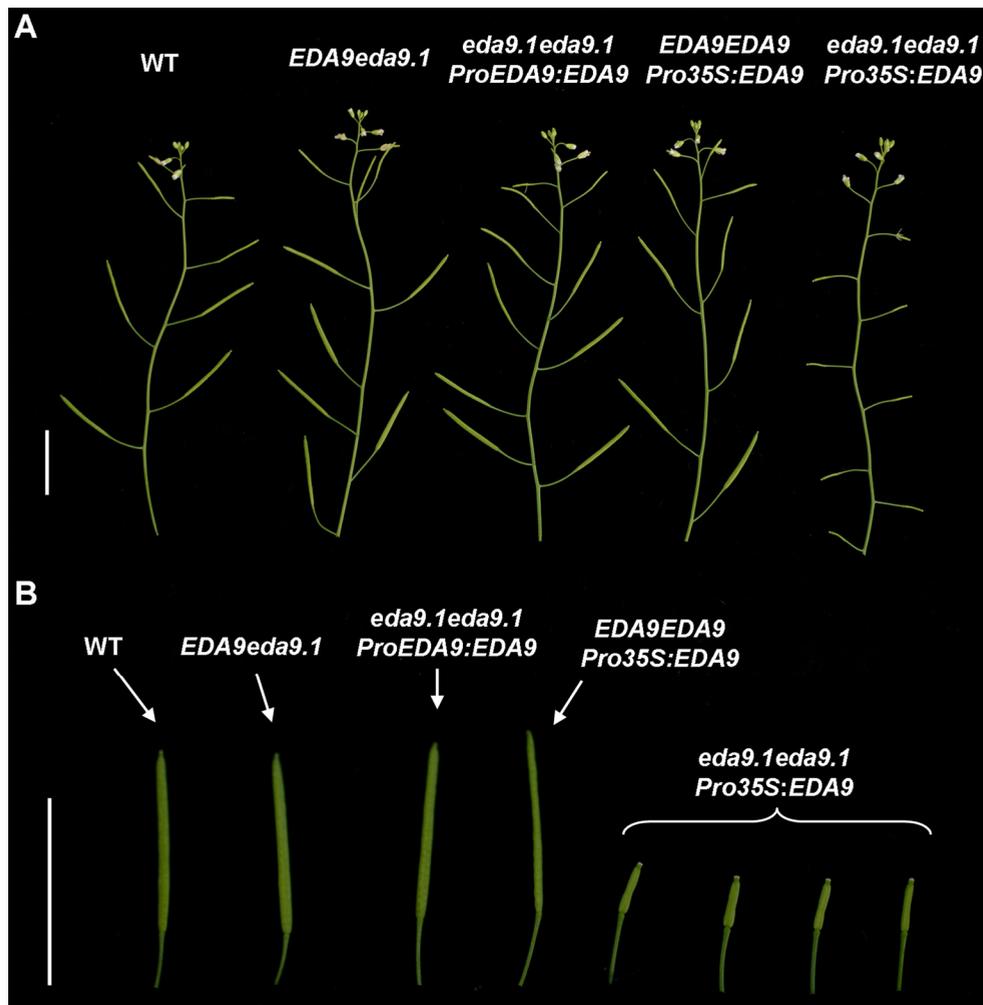


Figura IV.22. Morfología de inflorescencias fértiles y estériles (A) y de silicuas (B) de plantas silvestres (WT), heretocigotas (*EDA9eda9.1*), homocigotas *eda9.1eda9.1* transformadas con el cDNA del gen *EDA9* bajo el control de su propio promotor (*eda9.1eda9.1 ProEDA9:EDA9*), WT transformados con el cDNA del gen *EDA9* bajo el control del promotor 35S (*EDA9EDA9 Pro35S:EDA9*), y homocigotas *eda9.1eda9.1* transformados con la construcción anterior (*eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*). Escala = 1,5 cm.

Con el fin de corroborar la correlación fenotipo-genotipo de la mutación *eda9.1*, se realizó una segunda estrategia de complementación en la que se utilizó el promotor nativo *EDA9* (construcción *ProEDA9:EDA9*). Al igual que en el

experimento anterior, las plantas heterocigotas *EDA9eda9.1* se transformaron con la construcción *ProEDA9:EDA9* utilizando como vector *A. tumefaciens*. El resultado de esta transformación fue la obtención de líneas T₃ de inserción única para el transgén. De estas líneas transgénicas, también se obtuvieron, por PCR, plantas *EDA9EDA9*, *EDA9eda9.1* y *eda9.1eda9.1*, pero a diferencia del caso anterior (*Pro35S:EDA9*), los individuos *eda9.1eda9.1 ProEDA9:EDA9*, fueron fértiles e indistinguibles de las plantas silvestres, obteniéndose así una complementación completa del homocigoto *eda9.1eda9.1*.

Las dos estrategias de complementación utilizadas anteriormente, basadas en la expresión del cDNA del gen *EDA9* bajo el control del promotor *35S* o de su propio promotor, permitió el rescate de individuos homocigotos. Por ello, estos resultados nos aportan nuevas evidencias que permiten afirmar que la mutación del gen *EDA9* está asociada con letalidad del embrión.

Las imágenes del microscopio confocal de las líneas homocigotas complementadas con el promotor nativo del gen *EDA9* (dado que tienen GFP en C-terminal) demostraron que *EDA9* se expresa en el embrión y en la semilla, apoyando su esencialidad para estos procesos de desarrollo (Figura IV.23). Los estudios de microscopía confocal también confirmaron la expresión de *EDA9* en las células estomáticas, en el ápice caulinar y en el ápice radicular (Figura IV.24).

IV.4.7. Caracterización del fenotipo de esterilidad de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*

Los análisis de complementación, basados en la expresión del cDNA del gen *EDA9* bajo el control del promotor *35S*, pusieron de manifiesto que los individuos homocigotos *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* presentaron un fenotipo de esterilidad, caracterizado por silicuas cortas sin semillas (Figura IV.22). Tanto las plantas *EDA9EDA9 Pro35S:EDA9* obtenidas por transformación de plantas silvestres, como las obtenidas de la segregación de plantas heterocigotas transformadas con la misma construcción mostraron que no existía efecto de

sobreexpresión de *EDA9* que pudiera generar plantas estériles. Por otro lado, la mayoría de las líneas transgénicas *eda9.1eda9.1 ProEDA9:EDA9* fueron fértiles y visualmente indistinguibles de las plantas silvestres. La esterilidad de los individuos homocigotos *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* podría estar asociada a la falta de expresión del promotor *35S* en el tapete de la antera de arabidopsis (Grienenberger y col., 2009; Skiryecz y col., 2007). Esta idea estaría apoyado por los estudios de expresión de *EDA9* que mostraron que este gen se expresa durante el desarrollo de la antera, sobre todo en el tapete (fundamentalmente en el estadio 9; Figura IV.23).

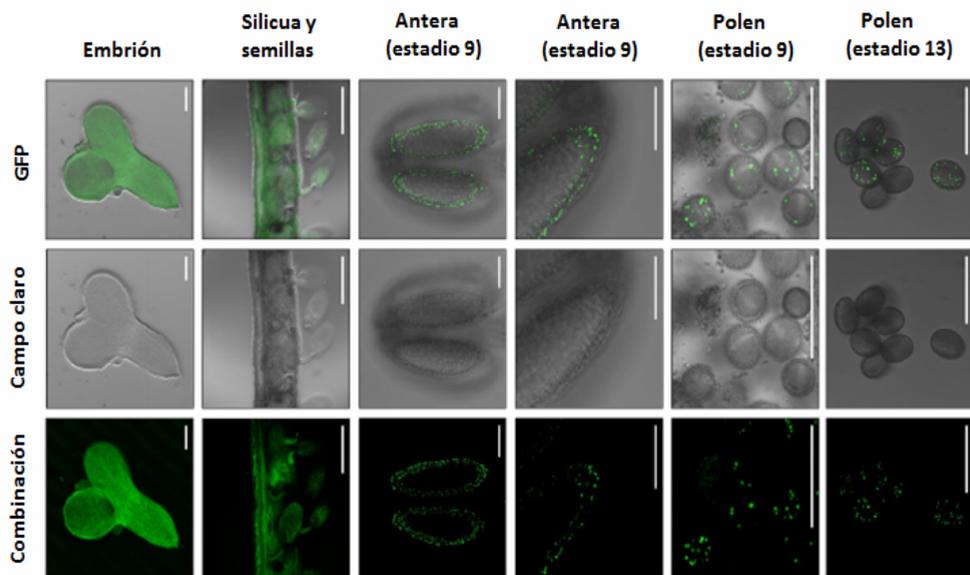


Figura IV.23. Análisis de fluorescencia realizado mediante microscopía confocal en plantas homocigotas *eda9.1eda9.1* de 30 días de edad complementadas con una construcción que lleva la fusión de la proteína EDA9-GFP bajo del control del promotor endógeno de *EDA9*. De arriba a bajo se muestra la imagen de la señal de fluorescencia (GFP), la imagen en campo claro (transmitida) y la combinación de ambas imágenes. Escala = 50 μm , para las imágenes de los embriones, anteras y polen. Escala = 500 μm para las imágenes de silicuas y semillas.

Para investigar las causas de la disfunción de la fertilidad observada en las líneas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*, se visualizaron los granos de polen en estas

plantas mediante microscopía electrónica de barrido. Pudimos constatar la presencia de un fenotipo de polen con forma anómala y reducida en estas plantas, en comparación con la morfología observada en plantas silvestres (Figura IV.25). Sin embargo, las plantas heterocigotas *EDA9eda9.1*, las silvestres sobreexpresoras (*EDA9EDA9 Pro35S:EDA9*), así como las homocigotas *eda9.1eda9.1* y *EDA9EDA9*, que expresaban el cDNA del gen *EDA9* bajo el control de su propio promotor, no mostraron ningún carácter diferencial en la morfología del polen en relación con las plantas silvestres. Finalmente, los ensayos de germinación de polen *in vitro* realizados con las mismas líneas ensayadas previamente, mostraron que, de todas las líneas utilizadas, únicamente el polen procedente de líneas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* fue incapaz de germinar (Figura IV.25).

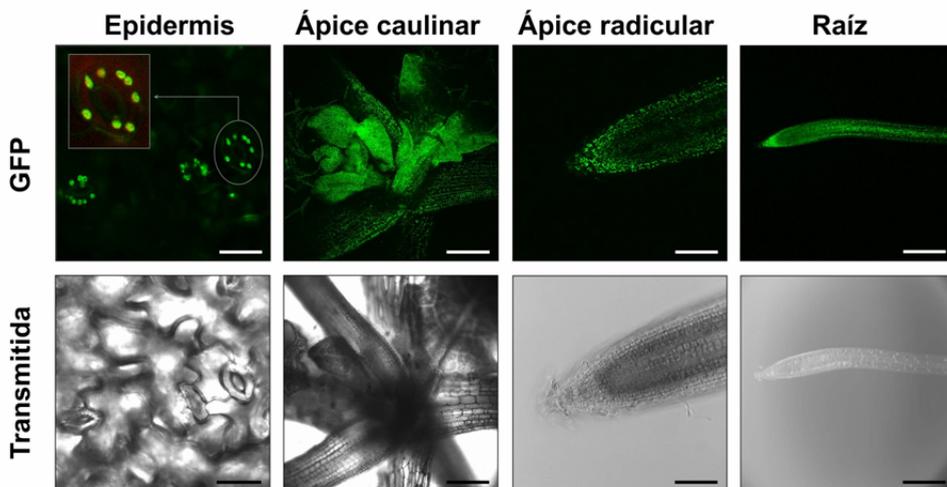


Figura IV.24. Análisis de fluorescencia realizado mediante microscopía confocal en plantas homocigotas *eda9.1eda9.1* de 15 días de edad complementadas con una construcción que lleva la fusión de la proteína EDA9-GFP bajo del control del promotor endógeno de *EDA9*. Las plantas crecieron en medio estándar MS1/5 durante 15 días. De arriba a bajo se muestra la imagen de la señal de fluorescencia (GFP) y la imagen en campo claro (transmitida). Escala = 50µm.

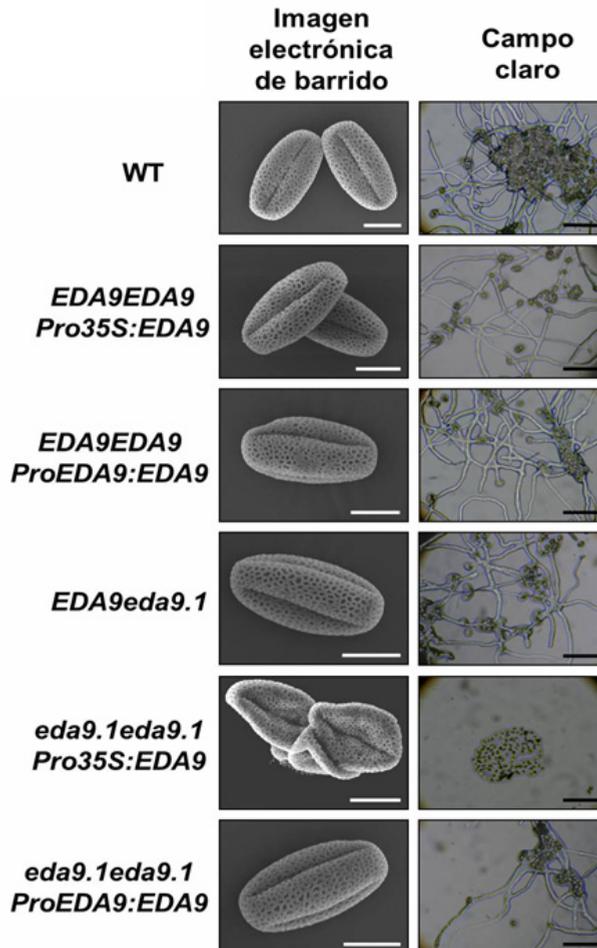


Figura IV.25. Análisis de la morfología (izquierda) y ensayo de germinación (derecha) de polen de plantas silvestres (WT), *EDA9EDA9 Pro35S:EDA9*, *EDA9EDA9 ProEDA9:EDA9*, *EDA9eda9.1*, *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* y *eda9.1eda9.1 ProEDA9:EDA9*. Las barras de tamaño de las fotografías de la derecha representan 200 μm y las de la izquierda 10 μm .

Para completar la caracterización del fenotipo de esterilidad masculina, se realizó un estudio ontogénico de las anteras y de los granos de polen en las líneas homocigotas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*. Para ese propósito, se clasificaron los botones florales desde los estadios 8 hasta el 13 (según Smyth y col., 1990), y se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (Figura IV. 26). En las

anteras de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* se formaron tétradas de microsporas [estadio 7 de acuerdo con Sanders y col. (1999)] que progresaron en su desarrollo hasta liberarse (estadio 8). Estos momentos iniciales del desarrollo de las microsporas fueron similares en *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* y en plantas silvestres. Sin embargo, a partir de ese momento las microsporas de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* sufrieron un retraso en su desarrollo, en comparación con las de plantas silvestres, lo que condujo a un proceso de degeneración después del estadio de microspora polarizada (desde el estadio 9 en adelante).

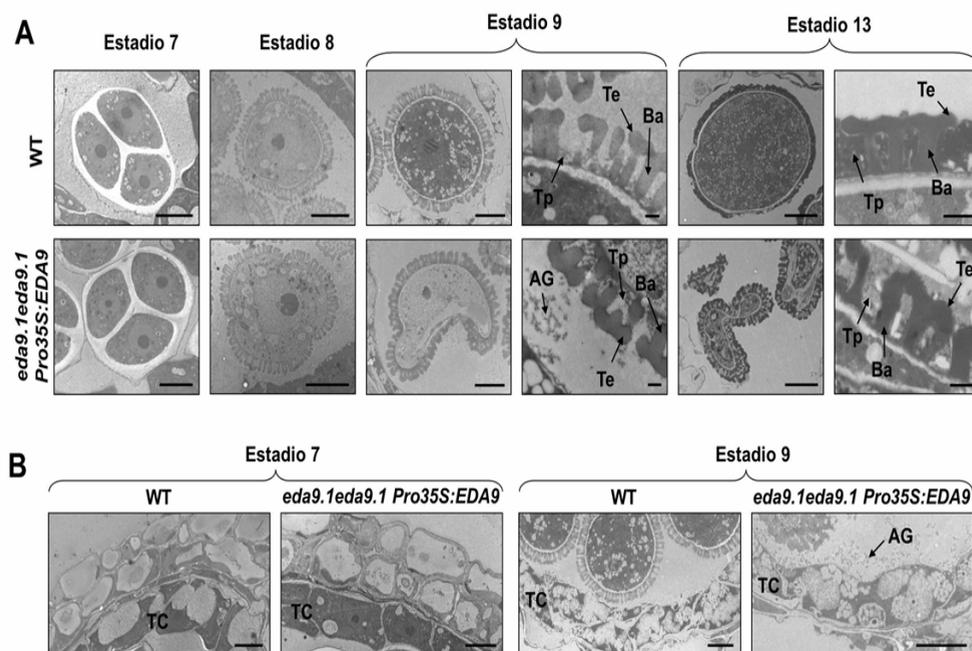


Figura IV.26. Análisis histológico de las anteras de plantas silvestres (WT) y plantas homocigotas *eda9.1eda9.1* transformadas con la construcción *Pro35S:EDA9* por microscopía electrónica de transmisión. A) Análisis del desarrollo del polen de los estadios 7 a 13, de acuerdo con Sanders y col., (1999). AG, compuestos agregados, Ba, báculo; Tp, trifina, Te, tectum. Escala = 5 μm para todas las imágenes excepto primeros planos de los estadios 9 y 13 donde la escala = 0,5 μm . B) Micrografías pertenecientes a secciones transversales de las anteras (estadios 7 y 9 según Sanders y col., 1999). AG, compuestos agregados; TC, células del tapete. Escala = 5 μm .

Al final del proceso de maduración de las microsporas (estadio 13), la mayoría de los granos de polen de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* mostraron unos

protoplasmas parcialmente reducidos o completamente colapsados. El báculo y el tectum de la capa de exina, que es la capa típica de la pared del grano de polen, están presentes en el polen de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*. Sin embargo, los intersticios de la exina no se rellenan completamente con trifina, como se observa en el desarrollo de los granos de polen de plantas silvestres (Figura IV.26A).

Para confirmar cuál es exactamente la etapa del desarrollo del gametofito afectada por la mutación *eda9.1*, se realizaron experimentos de tinción con Hoechst del núcleo de las microsporas de plantas homocigotas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* y silvestres en diferentes estadios de desarrollo (Figura IV.27). Para este experimento, se seleccionaron las microsporas con formas más próximas a las silvestres durante las últimas etapas de desarrollo, ya que la mayoría de ellas estaban bastante malformadas. Hasta el estadio de microspora polarizada la tinción del núcleo en *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* y plantas control indicó que su desarrollo era similar. A partir de este momento, el desarrollo de las microsporas se fue retrasando en *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* y no se pudo encontrar polen bicelular o tritelular (Figura IV.27). Estos resultados indican que las microsporas de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* no sufrieron la doble mitosis necesaria para llegar a la etapa de polen maduro. Estos datos son concordantes con la microscopía electrónica de barrido, que reveló que los granos de polen maduros de las líneas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* mostraron formas colapsadas y reducidas y no fueron capaces de germinar cuando se cultivaron *in vitro* (Figura IV.25).

El análisis del desarrollo de la antera indicó que la capa de las células del tapete, necesarias para el desarrollo adecuado del polen, se formaba en las anteras de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*, no observándose ninguna alteración morfológica drástica en esta capa celular (Figura IV.26B). Sin embargo, se observó claramente en el estadio 9 una acumulación de agregados en los lóculos de la antera de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*. Es importante tener en cuenta que los granos de polen en las anteras *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* inician el proceso de la degeneración en esta etapa del desarrollo (Figura IV.26). En los lóculos de las anteras de plantas

silvestres no se identificó esta acumulación en el estadio 9. La acumulación de agregados observada en los lóculos de la antera de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* en el estadio 9 (Figura IV.26B) se correlaciona temporalmente con la expresión de *EDA9* en el tapete y en el grano de polen (Figura IV.23). Estos resultados confirmarían, por tanto, que la expresión de *EDA9* es necesaria para el desarrollo del polen maduro.

IV.4.8. Caracterización metabólica de las líneas mutantes y sobreexpresoras de los 3 genes de la familia PGDH

De una manera similar a los mutantes de la familia PGDH (Figura IV.15), las líneas silvestres que sobreexpresan los tres genes de la familia PGDH no mostraron ninguna alteración drástica en el patrón de crecimiento cuando se cultivaron *in vitro*, aunque algunos de ellos (*OexEDA9*) presentaron una reducción significativa en el crecimiento (Figura IV.17). Sin embargo, el análisis metabólico, reveló un perfil metabólico claramente alterado tanto en las líneas mutantes como en las sobreexpresoras cuando se compararon con los valores de las plantas silvestres (Tabla IV.4).

El perfil metabólico de *pgdh1pgdh1* y *3-pgdh1 3-pgdh1* no fue idéntico, lo que indica que PGDH y 3-PGDH realizan diferentes funciones metabólicas en la planta. Así, en las partes aéreas de ambos mutantes, algunos metabolitos cambiaron en la misma dirección en comparación con los controles (tomando como 1 el valor de las plantas silvestres para cada metabolito). Por ejemplo, el metabolito ornitina aumentó en las partes aéreas de los dos mutantes en comparación con las plantas silvestres (1,37 para *pgdh1pgdh1* y 1,29 para *3-pgdh1 3-pgdh1*). También se observó una disminución en los metabolitos glicina (0,66 y 0,81), prolina (0,45 y 0,85), ácido glicérico (0,71 y 0,55), fructosa (0,84 y 0,68), glucosa (0,84 y 0,90), galactinol (0,47 y 0,59), y rafinosa (0,39 y 0,51) respecto a plantas silvestres para *pgdh1pgdh1* y *3-pgdh1 3-pgdh1*, respectivamente. Sin embargo, otros metabolitos sólo cambiaron significativamente en uno de los mutantes (asparagina, metionina,

ácido cítrico y ácido succínico) o lo hicieron en sentido contrario (valina, ácido malónico) (Tabla IV.4).

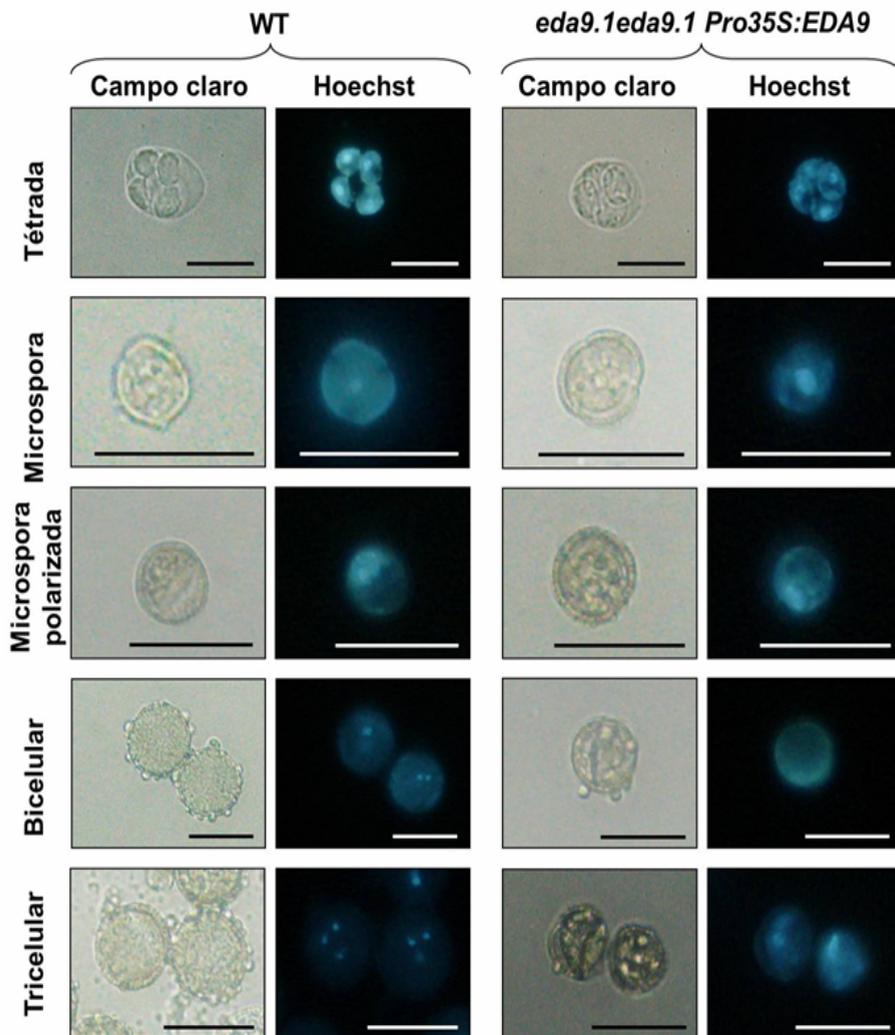


Figura IV.27. Análisis del desarrollo del polen de plantas silvestres (WT) y plantas homocigotas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* mediante la tinción (Hoechst) del núcleo de las microsporas. De arriba a abajo se muestran las imágenes desde el estadio de tétrada hasta el estadio tricelular y de izquierda a derecha se muestran las imágenes en campo claro y con la tinción Hoechst. Escala = 25 μm.

En las raíces de los mutantes se pudo observar un comportamiento similar de algunos metabolitos (prolina, ácido cítrico, ácido málico, galactinol, rafinosa)

pero de nuevo otros cambiaron en sentido contrario (isoleucina, lisina, valina) (Tabla IV.4).

El producto directo de la PGDH, el 3-PHP, no se pudo determinar ya que los intermediarios fosforilados son difíciles de detectar mediante la técnica utilizada en esta tesis. Sin embargo, la serina, el producto final de la ruta RFBS, sí que pudo determinarse. El contenido en este aminoácido se redujo significativamente tanto en la parte aérea como en las raíces de *pgdh1pgdh1* pero no se redujo en las raíces de *3-pgdh1 3-pgdh1*, e incluso aumentó en la parte aérea de este mutante.

La metabolómica de las plantas sobreexpresoras de los tres genes de la familia PGDH mostró un aumento en el contenido de serina en partes aérea y raíz. El aumento en el contenido de serina fue mayor en las raíces que en las partes aéreas de las líneas sobreexpresoras de *PGDH* y *EDA9* respecto a las plantas silvestres, mientras que en el caso de las líneas sobreexpresoras del gen *3-PGDH* los aumentos fueron similares en parte aérea o raíz. El mayor aumento del contenido en serina en comparación con el control se observó en el siguiente orden: raíces *OexPGDH* (4,19) > raíces *OexEDA9* (2,75) > parte aérea *OexPGDH* (2,07) > parte aérea *OexEDA9* (1,66) > parte aérea *Oex3-PGDH* (1,45) > raíces *Oex3-PGDH* (1,41) (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Valores relativos de metabolitos en parte aérea y raíces de plantas silvestres (WT), mutantes (*pgdh1* y *3-pgdh1* *3-pgdh1*) o plantas sobreexpresas (*Oex-PGDH*, *Oex-EDA9*, *Oex3-PGDH*). Los datos son valores relativos normalizados respecto a los valores medios del WT. Los valores de los mutantes y del WT representan la media \pm SE de 7 determinaciones. Para las plantas sobreexpresas los datos representan la media \pm SE de 14 a 21 determinaciones independientes correspondientes a muestras de tres (*Oex-PGDH*, *Oex3-PGDH*) o dos (*Oex-EDA9*) líneas transgénicas independientes. Los valores en **negrita** son significativamente diferentes respecto al WT con un $P < 0.05$.

	Raíces						Parte aérea												
	<i>3-pgdh1</i>			WT			<i>Oex-PGDH</i>			<i>Oex-EDA9</i>			<i>Oex3-PGDH</i>			WT			
	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	
Aminoácidos																			
Alanina, D, L	1,04 \pm 0,03	1,31 \pm 0,03	1 \pm 0,03	0,90 \pm 0,04	1,02 \pm 0,04	1 \pm 0,06	0,68 \pm 0,06	1,38 \pm 0,24	0,95 \pm 0,09	1 \pm 0,17	0,73 \pm 0,02	1,10 \pm 0,02	0,77 \pm 0,01	1 \pm 0,04					
Alanina, β	1,17 \pm 0,05	1,55 \pm 0,03	1 \pm 0,06	0,81 \pm 0,02	0,91 \pm 0,01	1 \pm 0,04	0,67 \pm 0,02	1,14 \pm 0,05	0,80 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,98 \pm 0,01	1,38 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	1 \pm 0,06					
Arginina	1,38 \pm 0,05	1,19 \pm 0,04	1 \pm 0,09	0,95 \pm 0,04	1,01 \pm 0,03	1 \pm 0,09	0,69 \pm 0,06	1,12 \pm 0,09	0,84 \pm 0,03	1 \pm 0,04	0,69 \pm 0,02	1,20 \pm 0,03	0,58 \pm 0,02	1 \pm 0,07					
Asparagina	2,04 \pm 0,24	1,25 \pm 0,13	1 \pm 0,14	1,15 \pm 0,12	0,99 \pm 0,10	1 \pm 0,11	0,66 \pm 0,15	1,01 \pm 0,33	0,91 \pm 0,24	1 \pm 0,44	0,98 \pm 0,12	1,83 \pm 0,17	0,73 \pm 0,14	1 \pm 0,05					
Acido aspártico	0,85 \pm 0,02	1,17 \pm 0,01	1 \pm 0,04	0,77 \pm 0,02	0,90 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,86 \pm 0,03	1,32 \pm 0,07	0,11 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,22 \pm 0,02	1,63 \pm 0,04	1,04 \pm 0,00	1 \pm 0,05					
Glutamina	1,23 \pm 0,19	0,89 \pm 0,13	1 \pm 0,12	0,56 \pm 0,08	0,88 \pm 0,07	1 \pm 0,12	0,75 \pm 0,18	1,04 \pm 0,22	0,70 \pm 0,11	1 \pm 0,27	0,63 \pm 0,02	1,42 \pm 0,04	0,64 \pm 0,04	1 \pm 0,04					
Glicina	0,66 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03	1 \pm 0,06	0,78 \pm 0,03	0,87 \pm 0,03	1 \pm 0,06	0,97 \pm 0,02	1,05 \pm 0,04	1,17 \pm 0,08	1 \pm 0,05	1,73 \pm 0,05	1,25 \pm 0,09	0,83 \pm 0,03	1 \pm 0,12					
Isoleucina	0,82 \pm 0,02	1,07 \pm 0,03	1 \pm 0,03	1,33 \pm 0,04	0,72 \pm 0,02	1 \pm 0,02	0,77 \pm 0,03	1,11 \pm 0,18	0,81 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,95 \pm 0,02	1,11 \pm 0,03	0,81 \pm 0,02	1 \pm 0,05					
Lisina	1,35 \pm 0,06	1,15 \pm 0,03	1 \pm 0,08	1,20 \pm 0,02	0,79 \pm 0,03	1 \pm 0,03	0,81 \pm 0,05	1,02 \pm 0,07	0,75 \pm 0,03	1 \pm 0,04	0,97 \pm 0,02	1,19 \pm 0,06	0,66 \pm 0,02	1 \pm 0,04					
Metionina	0,98 \pm 0,03	1,33 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,17 \pm 0,04	1,33 \pm 0,02	1,15 \pm 0,03	1 \pm 0,02	1,44 \pm 0,03	1,36 \pm 0,03	1,00 \pm 0,02	1 \pm 0,03					
Ornitina	1,37 \pm 0,06	1,29 \pm 0,04	1 \pm 0,05	1,26 \pm 0,13	0,70 \pm 0,06	1 \pm 0,10	0,64 \pm 0,03	1,16 \pm 0,06	0,82 \pm 0,04	1 \pm 0,07	0,68 \pm 0,08	0,91 \pm 0,19	0,56 \pm 0,04	1 \pm 0,24					
Fenilalanina	1,09 \pm 0,03	1,06 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,09 \pm 0,02	0,87 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,91 \pm 0,03	1,01 \pm 0,09	0,84 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,08 \pm 0,02	1,35 \pm 0,05	0,92 \pm 0,01	1 \pm 0,05					
Prolina	0,45 \pm 0,01	0,85 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,35 \pm 0,01	0,74 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,80 \pm 0,04	1,28 \pm 0,09	1,18 \pm 0,09	1 \pm 0,09	0,77 \pm 0,02	1,31 \pm 0,02	0,76 \pm 0,01	1 \pm 0,02					
Serina	0,82 \pm 0,02	1,33 \pm 0,01	1 \pm 0,03	0,62 \pm 0,02	0,97 \pm 0,03	1 \pm 0,05	2,07 \pm 0,07	1,66 \pm 0,08	1,45 \pm 0,05	1 \pm 0,04	4,19 \pm 0,12	2,75 \pm 0,07	1,41 \pm 0,01	1 \pm 0,07					
Treonina	0,93 \pm 0,02	1,14 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03	0,80 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,09 \pm 0,03	1,30 \pm 0,06	1,05 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,28 \pm 0,02	1,45 \pm 0,03	0,80 \pm 0,01	1 \pm 0,01					
Triptofano	0,85 \pm 0,04	1,05 \pm 0,03	1 \pm 0,04	-	-	-	0,90 \pm 0,03	1,31 \pm 0,06	0,97 \pm 0,02	1 \pm 0,05	-	-	-	-					
Tirosina	1,00 \pm 0,11	1,01 \pm 0,06	1 \pm 0,11	1,09 \pm 0,02	0,79 \pm 0,04	1 \pm 0,04	0,95 \pm 0,15	0,90 \pm 0,09	0,74 \pm 0,06	1 \pm 0,16	0,91 \pm 0,03	1,24 \pm 0,10	0,64 \pm 0,03	1 \pm 0,10					
Valina	0,82 \pm 0,02	1,11 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,17 \pm 0,03	0,78 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,98 \pm 0,03	1,26 \pm 0,18	0,96 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,98 \pm 0,01	1,21 \pm 0,03	0,88 \pm 0,01	1 \pm 0,03					
Ácidos orgánicos																			
Ácido adipico	1,01 \pm 0,24	1,29 \pm 0,36	1 \pm 0,09	0,93 \pm 0,07	1,00 \pm 0,14	1 \pm 0,05	1,37 \pm 0,21	1,19 \pm 0,16	0,96 \pm 0,07	1 \pm 0,15	1,28 \pm 0,31	1,13 \pm 0,04	1,04 \pm 0,04	1 \pm 0,07					
Ácido 4-hidroxi-benzotico	0,94 \pm 0,07	0,92 \pm 0,05	1 \pm 0,06	0,87 \pm 0,02	0,95 \pm 0,01	1 \pm 0,05	1,38 \pm 0,15	2,38 \pm 0,51	1,66 \pm 0,32	1 \pm 0,09	0,63 \pm 0,01	1,25 \pm 0,14	1,50 \pm 0,04	1 \pm 0,09					
Ácido butírico	1,08 \pm 0,03	1,28 \pm 0,04	1 \pm 0,05	0,89 \pm 0,03	1,02 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,07 \pm 0,06	1,33 \pm 0,15	0,61 \pm 0,03	1 \pm 0,05	0,68 \pm 0,02	1,18 \pm 0,04	0,87 \pm 0,04	1 \pm 0,02					
Ácido cítrico	0,72 \pm 0,05	0,98 \pm 0,03	1 \pm 0,05	0,49 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,67 \pm 0,03	0,78 \pm 0,07	0,55 \pm 0,02	1 \pm 0,05	0,85 \pm 0,02	0,86 \pm 0,02	0,66 \pm 0,01	1 \pm 0,06					
Dimeros del ácido Dihidroascorbico	0,83 \pm 0,07	1,07 \pm 0,07	1 \pm 0,07	0,86 \pm 0,07	0,87 \pm 0,05	1 \pm 0,06	0,74 \pm 0,06	0,97 \pm 0,07	0,78 \pm 0,03	1 \pm 0,10	1,63 \pm 0,19	1,42 \pm 0,16	0,81 \pm 0,11	1 \pm 0,23					
Ácido fumarico	0,95 \pm 0,02	0,89 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,71 \pm 0,02	0,97 \pm 0,05	1 \pm 0,02	0,57 \pm 0,03	0,75 \pm 0,03	0,51 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,97 \pm 0,08	0,97 \pm 0,03	0,80 \pm 0,03	1 \pm 0,05					
Ácido glicérico	0,71 \pm 0,03	0,55 \pm 0,01	1 \pm 0,03	1,00 \pm 0,03	0,51 \pm 0,01	1 \pm 0,05	0,52 \pm 0,02	0,72 \pm 0,02	0,46 \pm 0,01	1 \pm 0,03	0,49 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	1 \pm 0,09					
Ácido glicólico	0,85 \pm 0,05	0,97 \pm 0,05	1 \pm 0,03	1,04 \pm 0,04	1,05 \pm 0,04	1 \pm 0,05	0,89 \pm 0,04	1,01 \pm 0,09	0,87 \pm 0,05	1 \pm 0,07	1,39 \pm 0,11	1,26 \pm 0,02	1,13 \pm 0,03	1 \pm 0,04					
Ácido isocítrico	1,64 \pm 0,08	1,03 \pm 0,07	1 \pm 0,13	0,69 \pm 0,03	1,01 \pm 0,05	1 \pm 0,12	0,76 \pm 0,19	1,05 \pm 0,23	0,71 \pm 0,11	1 \pm 0,27	0,57 \pm 0,02	1,46 \pm 0,04	0,57 \pm 0,03	1 \pm 0,06					
Ácido málico	0,54 \pm 0,02	0,98 \pm 0,02	1 \pm 0,02	0,70 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,87 \pm 0,03	0,89 \pm 0,05	0,70 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,01 \pm 0,01	1,02 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	1 \pm 0,12					
Ácido malónico	0,67 \pm 0,02	1,26 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,75 \pm 0,04	1,05 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,81 \pm 0,02	1,03 \pm 0,04	0,89 \pm 0,03	1 \pm 0,05	0,86 \pm 0,01	1,26 \pm 0,02	0,79 \pm 0,01	1 \pm 0,07					
Ácido piroglutamico	0,96 \pm 0,02	1,00 \pm 0,01	1 \pm 0,03	0,85 \pm 0,06	0,89 \pm 0,04	1 \pm 0,05	1,06 \pm 0,05	1,39 \pm 0,09	1,04 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,05 \pm 0,03	1,08 \pm 0,03	0,77 \pm 0,01	1 \pm 0,05					
Ácido pirúvico	1,02 \pm 0,05	1,09 \pm 0,03	1 \pm 0,05	0,89 \pm 0,02	0,98 \pm 0,03	1 \pm 0,03	1,74 \pm 0,08	1,81 \pm 0,13	1,24 \pm 0,03	1 \pm 0,06	1,05 \pm 0,01	1,23 \pm 0,02	0,77 \pm 0,01	1 \pm 0,15					
Ácido succinico	1,00 \pm 0,02	1,32 \pm 0,02	1 \pm 0,06	0,65 \pm 0,02	0,96 \pm 0,02	1 \pm 0,03													

Tabla IV.4. Continuación

	Parte aérea			Raíces			Raíces							
	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	<i>pgdh1</i>	<i>3-pgdh1</i>	WT	Oex-PGDH	Oex-ED49	Oex-3-PGDH	WT				
Azúcares y polialcoholes														
Eritritol	1,16 ± 0,03	0,93 ± 0,02	1 ± 0,02	0,91 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1 ± 0,03	1,14 ± 0,05	1,36 ± 0,11	1,30 ± 0,03	1 ± 0,04	1,47 ± 0,02	1,65 ± 0,02	1,34 ± 0,01	1 ± 0,03
Fructosa	0,84 ± 0,03	0,68 ± 0,02	1 ± 0,03	1,15 ± 0,04	1,03 ± 0,02	1 ± 0,07	1,12 ± 0,04	1,27 ± 0,06	1,29 ± 0,06	1 ± 0,04	0,34 ± 0,00	0,92 ± 0,01	0,42 ± 0,02	1 ± 0,11
Fructosa-6-fosfato	0,77 ± 0,07	1,33 ± 0,07	1 ± 0,04	1,04 ± 0,06	1,04 ± 0,02	1 ± 0,05	0,95 ± 0,05	1,29 ± 0,07	1,41 ± 0,04	1 ± 0,07	1,67 ± 0,05	1,48 ± 0,05	1,16 ± 0,05	1 ± 0,11
Fucosa	1,01 ± 0,02	0,89 ± 0,01	1 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,94 ± 0,02	1 ± 0,05	0,85 ± 0,02	1,05 ± 0,08	0,88 ± 0,02	1 ± 0,03	0,87 ± 0,01	1,26 ± 0,02	0,77 ± 0,01	1 ± 0,07
Galactinol	0,47 ± 0,02	0,59 ± 0,01	1 ± 0,07	0,67 ± 0,01	0,58 ± 0,01	1 ± 0,05	0,53 ± 0,04	1,11 ± 0,11	0,46 ± 0,02	1 ± 0,04	0,61 ± 0,01	1,59 ± 0,02	0,86 ± 0,01	1 ± 0,06
Glucosheptosa	1,10 ± 0,04	1,05 ± 0,03	1 ± 0,06	0,87 ± 0,06	0,84 ± 0,07	1 ± 0,04								
Glucosa	0,84 ± 0,02	0,90 ± 0,02	1 ± 0,03	0,94 ± 0,09	0,92 ± 0,04	1 ± 0,06	0,60 ± 0,02	0,73 ± 0,04	0,87 ± 0,03	1 ± 0,04	1,48 ± 0,06	1,65 ± 0,06	0,87 ± 0,06	1 ± 0,08
Inositol	0,63 ± 0,02	0,96 ± 0,02	1 ± 0,05	0,63 ± 0,01	0,90 ± 0,02	1 ± 0,06	0,77 ± 0,03	1,12 ± 0,04	0,86 ± 0,02	1 ± 0,04	1,02 ± 0,01	1,28 ± 0,02	0,89 ± 0,01	1 ± 0,06
Inositol-1- fosfato				0,91 ± 0,08	1,18 ± 0,08	1 ± 0,06	0,38 ± 0,01	0,65 ± 0,05	0,44 ± 0,02	1 ± 0,04	0,45 ± 0,01	1,17 ± 0,02	0,37 ± 0,01	1 ± 0,05
Manosa	0,83 ± 0,08	0,75 ± 0,03	1 ± 0,06	0,79 ± 0,02	0,93 ± 0,07	1 ± 0,12	0,93 ± 0,03	1,23 ± 0,05	1,09 ± 0,04	1 ± 0,08	0,56 ± 0,01	1,07 ± 0,01	0,61 ± 0,01	1 ± 0,08
Rafinosa	0,29 ± 0,03	0,51 ± 0,02	1 ± 0,07	0,58 ± 0,02	0,67 ± 0,02	1 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,88 ± 0,10	0,49 ± 0,03	1 ± 0,04	0,55 ± 0,01	1,12 ± 0,02	0,69 ± 0,01	1 ± 0,07
Ramnosa	1,03 ± 0,02	0,96 ± 0,01	1 ± 0,02	0,89 ± 0,02	0,93 ± 0,02	1 ± 0,05	0,90 ± 0,02	1,16 ± 0,07	0,92 ± 0,02	1 ± 0,04	0,98 ± 0,01	1,37 ± 0,02	0,87 ± 0,01	1 ± 0,06
Ribulosa-5- fosfato	1,01 ± 0,04	1,12 ± 0,05	1 ± 0,06	0,81 ± 0,08	1,14 ± 0,04	1 ± 0,07	0,55 ± 0,02	0,95 ± 0,04	0,88 ± 0,03	1 ± 0,04	1,34 ± 0,02	1,52 ± 0,02	1,14 ± 0,01	1 ± 0,02
Sacarosa	0,96 ± 0,02	1,04 ± 0,01	1 ± 0,02	0,97 ± 0,09	0,89 ± 0,04	1 ± 0,05	0,89 ± 0,02	1,09 ± 0,04	0,95 ± 0,02	1 ± 0,05	0,81 ± 0,02	1,08 ± 0,03	0,87 ± 0,02	1 ± 0,07
Trehalosa	0,91 ± 0,04	1,13 ± 0,03	1 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,99 ± 0,04	1 ± 0,04	1,42 ± 0,08	1,73 ± 0,13	1,36 ± 0,06	1 ± 0,08	0,96 ± 0,11	1,27 ± 0,03	0,64 ± 0,01	1 ± 0,16
Xilosa	0,99 ± 0,02	0,77 ± 0,01	1 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,91 ± 0,02	1 ± 0,10	0,79 ± 0,03	0,93 ± 0,05	0,85 ± 0,02	1 ± 0,05	0,51 ± 0,01	1,12 ± 0,01	0,46 ± 0,01	1 ± 0,10
Otros														
Glicerol	1,34 ± 0,51	1,10 ± 0,29	1 ± 0,21	0,85 ± 0,13	1,12 ± 0,14	1 ± 0,17	0,89 ± 0,05	0,94 ± 0,09	0,86 ± 0,05	1 ± 0,11	0,66 ± 0,10	0,70 ± 0,05	0,73 ± 0,05	1 ± 0,14
Ácido fosfórico	0,44 ± 0,05	1,27 ± 0,03	1 ± 0,13	0,98 ± 0,03	1,18 ± 0,06	1 ± 0,02	1,33 ± 0,05	0,94 ± 0,10	1,37 ± 0,05	1 ± 0,08	1,22 ± 0,04	1,10 ± 0,11	1,41 ± 0,02	1 ± 0,17
Putrescina	1,43 ± 0,08	0,91 ± 0,03	1 ± 0,07	0,79 ± 0,06	0,68 ± 0,04	1 ± 0,07	0,67 ± 0,05	0,72 ± 0,08	0,91 ± 0,07	1 ± 0,17	1,57 ± 0,07	1,62 ± 0,08	0,93 ± 0,07	1 ± 0,06
Uracilo	0,80 ± 0,05	1,10 ± 0,06	1 ± 0,04	0,86 ± 0,02	0,85 ± 0,01	1 ± 0,03	1,08 ± 0,05	1,15 ± 0,16	0,74 ± 0,05	1 ± 0,06	1,04 ± 0,03	1,07 ± 0,05	1,21 ± 0,08	1 ± 0,05
Urea	0,93 ± 0,03	1,23 ± 0,04	1 ± 0,03	1,07 ± 0,11	0,74 ± 0,05	1 ± 0,05	0,83 ± 0,04	0,97 ± 0,15	0,78 ± 0,04	1 ± 0,07	1,20 ± 0,11	1,01 ± 0,10	0,85 ± 0,02	1 ± 0,14

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. Ruta fosforilativa de biosíntesis de serina: nuevos datos sobre la regulación génica y los patrones de expresión de los genes de la familia PGDH

La biosíntesis de serina es un buen ejemplo de la complejidad del metabolismo primario de las plantas. Se han descrito tres rutas diferentes de biosíntesis de serina (Kleczkowski y Givan, 1988; Ros y col., 2013), la ruta del glicolato o fotorrespiratoria, la ruta del glicerato y la RFBS. La producción de serina a través de la ruta de glicolato o fotorrespiratoria se consideraba cuantitativamente la más importante, al menos en células fotosintéticas (Tolbert, 1980; Douce y col., 2001). No obstante, experimentos llevados a cabo entre los años 1970-90, utilizando altas concentraciones de CO₂ e inhibidores de la fotorrespiración, proporcionaron evidencias de que las rutas no fotorrespiratorias podrían desempeñar un papel importante en el suministro de serina en las plantas (Johnson y Hatch, 1969, Snyder y Tolbert, 1974; Platt y col., 1977; Servaites y Ogren, 1977; Morot-Gaudry, 1980). Sin embargo, no se habían aportado evidencias genéticas para las funciones fisiológicas de estas rutas, hasta muy recientemente cuando se caracterizó la última enzima de la RFBS (PSP; Cascales-Miñana y col., 2013).

Siguiendo la misma línea de investigación iniciada por nuestro grupo, el objeto de estudio de esta tesis doctoral ha sido la caracterización molecular y funcional de la primera enzima de la RFBS de *Arabidopsis*, mediante una estrategia de ganancia y pérdida de función. Hemos identificado tres genes, que codifican para posibles enzimas PGDH, que podrían ser los únicos genes de la familia PGDH. Una de las enzimas de la familia, la PGDH, ya había sido caracterizada bioquímicamente (Ho y col., 1999b). Sin embargo, no hay evidencias de la actividad de las otras dos, EDA9 y 3-PGDH. Estas dos isoformas conservan el 100% de identidad de los residuos aminoacídicos que forman el sitio catalítico y el

sitio de unión al ligando en la isoforma PGDH por lo que asumimos que tienen actividad PGDH. Esta hipótesis vendría respaldada por el aumento significativo de los niveles de serina, el producto final de la RFBS, en las líneas que sobreexpresan *EDA9* y *3-PGDH*. De hecho, la serina fue el aminoácido que más aumentó en ambas líneas. Por último, los mutantes *psp1.1psp1.1* mostraron los mismos fenotipos de esterilidad masculina y embrión letal (Cascales-Miñana y col., 2013) que los mutantes *eda9.1eda9.1*, lo que corroboraría que ambas enzimas participan en la misma ruta.

La familia PGDH mostró un patrón de expresión muy concreto y específico a nivel de órganos y tejidos. *PGDH* y *EDA9* se expresaron preferentemente en las raíces, lo que apoyaría la idea de que la RBFS juega un papel importante en el suministro de serina en órganos no fotosintéticos (Figura IV.10). Ho y colaboradores (1998 y 1999b) mostraron que el gen *PGDH* se expresó tanto en la parte aérea como en las raíces, aunque de forma mayoritaria en estas últimas y sobre todo cuando están en presencia de luz al igual que ocurría con la expresión de los genes *PSAT* y *PSP* (Figura I.12, Ho y col., 1999a). Nuestros resultados mostraron que la expresión de *PGDH* no fue mayor en presencia de luz que tras 8 horas de oscuridad ni en parte aérea ni en raíces. Del mismo modo, la expresión de *EDA9* tras un tratamiento de 8 horas de oscuridad no fue menor que en presencia de luz ni en raíces ni en partes aéreas. Al contrario, *EDA9*, y también *3-PGDH*, se indujeron por los tratamientos de 8 horas de oscuridad en la parte aérea. Las diferencias de expresión observadas entre los experimentos de Ho y colaboradores (1999a) y los nuestros podrían deberse a la duración de los tiempos de exposición, ya que estos autores sometieron a las plantas a periodos oscuridad de 7 días. En este sentido, pudimos observar que los tratamientos de oscuridad durante 24 horas reprimieron la expresión de los tres genes de la familia PGDH en raíces y partes aéreas. Estos efectos contrarios sobre la expresión génica observados después de diferentes tiempos de exposición a la oscuridad podrían estar relacionados con el estado energético de las células (Figura IV.11A). Las

condiciones de oscuridad de larga duración implican un suministro de energía reducido, proveniente de la actividad fotosintética, para las células. Así, un nivel energético bajo de la célula podría activar otros mecanismos implicados en la represión de los genes de la familia PGDH y enmascarar la inducción observada en los periodos de oscuridad. Sólo en periodos de oscuridad de menor duración, que se ajustan más con condiciones naturales, podríamos observar la inducción. Por tanto, nuestros resultados indican que algunos de los genes de la familia PGDH, concretamente *EDA9* y *3-PGDH*, se inducirían en los periodos fisiológicos de oscuridad, sobre todo en órganos fotosintéticos. Estos resultados apoyarían la idea de que la RFBS podría ser relevante también en órganos fotosintéticos, especialmente en la oscuridad, cuando la vía de flujo de carbono a partir de glicolato hacia serina deja de funcionar (Kleczkowski y Givan 1988; Ho y Saito 2001). Por último, se ha propuesto que en los tejidos verdes, la ruta RFBS es probablemente de poca importancia en comparación con la vía de glicolato durante las horas de luz, cuando se lleva a cabo la fotorrespiración (Ho y Saito, 2001). Sin embargo, la expresión específica de *3-PGDH* en las partes aéreas, apoya el papel de la ruta RFBS en los órganos fotosintéticos, incluso durante el período de luz (Figura IV.10). Esta función puede estar más relacionada con determinados tipos de células (no fotosintéticas) en estos órganos fotosintéticos.

Los tratamientos con serina durante 24 horas, que es el producto de la actividad de la ruta RFBS, no reprimieron la expresión de ninguno de los tres genes de la familia PGDH. Además, tratamientos prolongados produjeron una inducción de la expresión de *PGDH* y *EDA9*, sobre todo en la parte aérea. Estos resultados inesperados no tienen una explicación simple si se tiene solamente en cuenta el efecto de la serina sobre la RFBS puesto que cabría esperar lo contrario. No obstante, es posible que se deban de tener en cuenta otros parámetros que incluyan la homeostasis metabólica a nivel celular. En este sentido postulamos que la serina podría tener un papel central en la regulación transcripcional del metabolismo primario como ya ha sido demostrado para la fotorrespiración (Timm y col., 2013).

Si nuestra hipótesis es cierta, el papel de la serina en las regulación de las redes transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales debería ser estudiado con detalle.

Los experimentos de expresión génica realizados, indicaron que existe una importante regulación transcripcional de los genes de la familia PGDH, no sólo a nivel de órganos y tejidos, sino también a nivel de condiciones ambientales (transiciones luz-oscuridad). Este fuerte control transcripcional no se observó con el gen *PSP*, que se expresa de manera similar en todos los órganos estudiados (Cascales-Miñana y col., 2013). Por lo tanto, la presencia de los tres genes con diferentes patrones de expresión, sugiere que el primer paso de la ruta RFBS podría ser el cuello de botella en la regulación de esta vía a nivel transcripcional.

Esta tesis doctoral también aporta nuevos datos sobre el patrón de expresión tisular de los genes de la familia PGDH, a través de una batería de ensayos histoquímicos GUS realizados tanto en plántula como en planta adulta. Los resultados de los ensayos GUS han mostrado un patrón de expresión característico para el gen *PGDH* en los cotiledones, en los haces vasculares de las raíces y en flores, donde se observó una importante expresión en el estigma y en los filamentos de la antera (Figura IV.6, IV.7). El gen *3-PGDH*, se expresa fundamentalmente en los cotiledones (la zona distal) y en la zona de unión entre la raíz y la parte aérea, pero no hubo expresión en las raíces, También la expresión fue característica en el estigma y en los haces vasculares del filamento de la antera (Figura IV.8). Por último, en estadio de plántula, el gen *EDA9* mostró una fuerte expresión en ápices, en estomas, en los cotiledones (zona distal) y en raíces, donde la expresión fue intensa en el cilindro central, en la zona de la columela de la caliptra y en el meristemo. En plantas adultas, *EDA9* mostró una fuerte expresión en los estomas, en las anteras, en los granos de polen y en el estigma (Figura IV.9). También se observó un patrón de expresión característico en las raíces, a lo largo de su vasculatura y meristemo. El análisis de la región promotora de los genes de la familia PGDH mediante la aplicación informática *Promomer tool* mostró que la

región promotora del genes de la familia PGDH contiene regiones consenso que están presentes en genes que controlan el desarrollo de las anteras, como es el caso de los genes homeóticos florales *AGAMOUS*. También contienen regiones consenso presentes en genes que intervienen durante el desarrollo del polen. Además, la aplicación *Arabidopsis* eFP Browser (Winter y col., 2007) reveló también un patrón de expresión muy marcado de los genes de la familia PGDH, especialmente *EDA9*, en los primeros estadios del desarrollo de la antera, de la semilla y del embrión (fase globular), sugiriendo un papel importante de la enzima *EDA9* durante las fases iniciales del desarrollo de *Arabidopsis* (Figura IV.5 y Anexo Tabla Suplementaria 4).

Finalmente, en la región promotora del gen *EDA9*, también se observó la presencia de regiones consenso de elementos implicados en la respuesta a ABA en el maíz, como el elemento ABRE (ABRECE3ZMRAB28) y el elemento ABADESI2 de respuesta al ABA y a la desecación (Tabla IV.1). Además, en el promotor de *EDA9* se encontraron elementos presentes en los genes *rab 21* de trigo y arroz (ABREOSRAB21), todos ellos también relacionados con la respuesta al ABA. En este sentido, es interesante destacar la expresión de *EDA9* en las células estomáticas. Nuestro grupo, había demostrado previamente que los dobles mutantes *gapcp1 gapcp2* presentan un fenotipo de insensibilidad a ABA, tanto a nivel de germinación como de regulación de la apertura estomática (Muñoz-Bertomeu y col., 2011a). Puesto que las GAPCp suministran los sustratos para la RFBS, es posible que los fenotipos de insensibilidad a ABA en los estomas de mutantes *gapcp1 gapcp2* estén relacionados con la falta de actividad de la RFBS. No obstante esta hipótesis tendrá que ser demostrada, estudiando la respuesta de mutantes *eda9.1eda9.1* a dicha hormona.

V.2. Implicación del gen *EDA9* en el desarrollo de las anteras y del embrión de *arabidopsis*

El estudio de los mutantes de los tres genes de la familia PGDH mostró que la falta de expresión de *PGDH* y *3-PGDH* no producía diferencias significativas en el crecimiento de las plantas en condiciones estandar (Figura IV.15). Sin embargo, los mutantes *eda9.1eda9.1* son inviables. Este resultado indica que el gen esencial en la familia PGDH es *EDA9*, y que los genes *PGDH* y *3-PGDH* pueden tener otros efectos de compensación y/o funciones específicas no esenciales bajo las condiciones normales de crecimiento.

Los mutantes homocigotos *eda9.1eda9.1* presentaron un fenotipo de embrión letal, indicando que la actividad de *EDA9* es esencial para el desarrollo del embrión. En concreto, los mutantes mostraron un retraso en el desarrollo del embrión a partir de la etapa globular que finalmente llevó a su aborto. Según las bases de datos de *microarrays*, *EDA9* se expresa en los embriones a partir de la etapa globular y es en el estadio de transición globular a corazón cuando ocurren los primarios pasos de diferenciación del proplastidio (Devic, 2008). El retraso en el desarrollo del embrión mutante *eda9.1eda9.1* está probablemente relacionado con el establecimiento de la RFBS en los plastos de los embriones en el estadio globular, como ya habían comentado Cascales-Miñana y colaboradores (2013). Estos resultados corroboran que la falta de la actividad de la ruta RFBS, por inactivación de *EDA9* durante el desarrollo embrionario, al igual que sucedía con la enzima PSP1, hace que se vaya retrasando el desarrollo del embrión conduciendo finalmente al aborto de éste.

Los análisis de complementación realizados a través de las construcciones *Pro35S:EDA9* y *ProEDA9:EDA9*, que expresan el cDNA del gen *EDA9* bajo el control del promotor *35S* y el propio promotor del gen *EDA9*, respectivamente, recuperaron, en ambos casos, individuos homocigotos *eda9.1eda9.1* (Figura IV.22, Tabla IV.3), confirmando la implicación de *EDA9* en el desarrollo del embrión

indicada por los estudios de segregación de semillas y por el análisis ontogénico del desarrollo del embrión. Sin embargo, los individuos *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*, aislados de plantas *EDA9eda9.1 Pro35S:EDA9*, presentaron un fenotipo de esterilidad, ya que no desarrollaron silicuas fértiles con semillas (Figura IV.22). En este sentido, nuestros resultados mostraron que las anteras *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* presentaban granos de polen inviábiles con morfologías aberrantes (Figuras IV.25 y IV.26). Por el contrario, los individuos *eda9.1eda9.1 ProEDA9:EDA9* fueron fenotípicamente indistinguibles de las plantas silvestres, formando silicuas normales con semillas (Figura IV.22). Estos resultados sugerían la existencia de un fenotipo de esterilidad masculina ligado al alelo *eda9.1* similar al observado en las plantas *psp1.1psp1.1* complementadas con la construcción *Pro35S:PSP1* (Cascales-Miñana y col., 2013). El desarrollo de las microsporas en líneas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* se detuvo en el estadio de microspora polarizada. Según las bases de datos de *microarrays*, la expresión de *EDA9* en los estadios de microspora polarizada y bicelular se correlacionaría temporalmente con las alteraciones observadas en el desarrollo del polen de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* durante la maduración. Sin embargo, los cruces recíprocos revelaron que el alelo mutante masculino *eda9.1* no tiene ninguna diferencia significativa en la eficiencia de la transmisión en comparación con el alelo silvestre, lo que indica que no hay defectos en los gametofitos masculinos cuando los gametos son producidos por las anteras heterocigotas. Estos resultados sugieren que la deficiencia de *EDA9* no sólo podría afectar el desarrollo de microsporas, sino también a la de otros tipos celulares de la antera que son importantes para el desarrollo del polen.

Así pues, nuestros resultados sugerían que los individuos *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* también podrían tener afectado el tapete de la antera, como se observó en *psp1.1psp1.1 Pro35S:PSP1*, dado que las construcciones portadoras del promotor 35S no expresan su producto génico en esta capa celular en *arabidopsis* (Skiryycz y col., 2007; Grienberger y col., 2009; Muñoz-Bertomeu y col., 2010b;

Cascales-Miñana y col., 2013). Así, la construcción *Pro35S:EDA9* permite estudiar el fenotipo de *eda9.1eda9.1* en esta capa monoestratificada de células de las anteras, la cual es crucial para que el polen alcance su viabilidad (Dong y col., 2005; Yang y col., 2007). Mediante microscopía electrónica de transmisión, se observó que el tapete de plantas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* se forma y no presenta diferencias drásticas con respecto al de las plantas silvestres (Figura IV.26B) como las que sí se observaron en las plantas *psp1.1psp1.1 Pro35S:PSP1* (Cascales-Miñana y col., 2013).

Se ha encontrado que varios genes que controlan el desarrollo del tapete afectan la viabilidad y/o el desarrollo del polen (Colcombet y col., 2005; Yang y col., 2007). Las células del tapete y de las microsporas se desarrollan en comunicación continua. Así, las células tapetales juegan un papel importante en la formación de la pared del polen durante la microgametogénesis, secretando compuestos en el lóculo para la maduración de las microsporas. Pudimos observar que la trifina derivada del tapete (Dickinson y Lewis, 1973) no rellena los intersticios de la exina en el polen de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*. Asimismo, se pudo ver una acumulación de agregados densos a los electrones en el lóculo de la antera de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9* en estadios críticos del desarrollo del polen (estadio 9). La composición de estos agregados en el lóculo de la antera no se conoce, pero la naturaleza fibro-granular proteica de los depósitos de trifina, liberados por las células del tapete, podría ser una buena candidata. Estos depósitos no se detectaron en los controles silvestres en las mismas etapas de desarrollo observadas en las anteras de *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*, lo que podría indicar que los componentes liberados por el tapete no se incorporan adecuadamente en la pared del polen de plantas *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*, bien porque hay un desfase temporal entre el desarrollo de los dos tipos celulares o por un problema en el propio componente, que conduce a un suministro inadecuado de los productos del tapete a la pared del polen. Dado que hemos encontrado una correlación temporal entre la expresión de *EDA9* en el tapete y las alteraciones en el desarrollo de las

microsporas en *eda9.1eda9.1 Pro35S:EDA9*, proponemos que la ausencia de la actividad EDA9 es de alguna manera, capaz de afectar al desarrollo tanto de las microsporas como de las células del tapete que, a su vez, afecta a la maduración del polen. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el papel esencial de EDA9 en el tapete para el desarrollo adecuado del polen.

Los mutantes *eda9.1eda9.1* mostraron el mismo fenotipo de defectos en el embrión y en el polen que los mutantes del gen *PSP1* (Cascales-Miñana y col., 2013), lo que corrobora el papel esencial de la ruta RFBS en estos eventos de desarrollo. El patrón de expresión de *EDA9* es similar al de *PSP1*; ambos genes se expresan en el embrión, en los meristemos, en las anteras y en el polen. Nuestros resultados sugieren que el papel esencial de estos genes puede estar relacionado con sus expresiones en tipos celulares muy específicos, donde el único suministro de serina se originaría a partir de la ruta RFSB. Si ello es así, otras vías biosintéticas de serina, tales como la ruta del glicerato o la actividad de las reacciones acopladas GDC:SHMT, tendrían poca relevancia biológica en el tapete, en las microsporas o en las células de los embriones. Como la serina se transporta por el floema (Riens y col., 1991; Hunt y col., 2010), la serina sintetizada en las células fotosintéticas a través de la ruta fotorrespiratoria, podría ser suministrada fácilmente a las células no fotosintéticas. Si nuestra hipótesis es correcta, algunos tipos celulares podrían estar desprovistos de los transportadores de serina o no estar convenientemente conectados al sistema vascular; incluso una combinación de ambos factores podría estar involucrada.

El análisis metabolómico demostró que los niveles de serina fueron significativamente superiores en las plantas sobreexpresoras de los tres genes de la familia PGDH en comparación con los controles, lo que indica que las tres enzimas de dicha familia podrían participar en la biosíntesis de este aminoácido. Las líneas *OexPGDH* y *OexEDA9* mostraron un mayor nivel de serina en las raíces que en las partes aéreas. Dado que el promotor utilizado para sobreexpresar estos genes fue el

35S, estos resultados indicarían un mecanismo de regulación post-transcripcional/traducciona controlando la actividad de las enzimas codificadas.

La sobreexpresión del gen *PGDH* provocó los mayores incrementos en serina, tanto en las partes aéreas como en raíces, en comparación con la sobreexpresión de *3-PGDH* y *EDA9*. Sin embargo, *PGDH* no es el gen crucial para el desarrollo del embrión y la viabilidad de los granos de polen. Estos resultados apoyarían que la función esencial de *EDA9* está relacionada con su expresión en tipos específicos de células. La función de *3-PGDH* parece ser de menor importancia en nuestras condiciones experimentales porque el mutante *3-pgdh1 3-pgdh1* no mostró una reducción de los niveles de serina y las plantas sobreexpresoras de gen *3-PGDH* fueron las menos eficientes en la biosíntesis del aminoácido. Sin embargo, el gen *3-PGDH* podría tener una función en condiciones específicas, como en las células fotosintéticas durante la noche. Este resultado estaría apoyado por su alto nivel de expresión en la parte aérea y su inducción bajo las exposiciones a oscuridad. También es interesante señalar que los niveles de serina no se redujeron, sino que aumentaron en las partes aéreas de los mutantes *3-pgdh1 3-pgdh1*. Este aumento puede estar relacionado con la activación de la ruta del glicolato por un mecanismo desconocido.

Un objetivo que sería importante abordar en el estudio de las interacciones entre metabolismo y desarrollo sería la identificación de las dianas metabólicas que se traducen en cambios en el desarrollo. En los seres humanos se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *PGDH* altera el metabolismo de la glucosa, afecta a la morfología celular, a la proliferación celular y a la oncogénesis (Bachelor y col., 2011; Locasale y col., 2011; Pollari y col., 2011; Possemato y col., 2011.; Ying y col., 2012). Nuestros resultados indican que *EDA9* desempeña una función esencial en las células no fotosintéticas que se dividen activamente, tales como las células de los embriones y de las anteras. Por lo tanto, la serina o sus derivados podrían ser la conexión entre el metabolismo primario y el control de la progresión del ciclo

celular en tipos celulares específicos. Esto podría estar relacionado con el papel de la serina en la regulación transcripcional (Timm y col., 2013).

Este trabajo demuestra que la RFBS desempeña una función esencial en el metabolismo de la planta y su desarrollo, probablemente debido a que proporciona serina a tipos celulares específicos en los que el suministro del aminoácido se originaría solamente a partir de fuentes intracelulares. No obstante, se requiere más investigación en el futuro para, por ejemplo, destacar la función específica de la RFBS en los tejidos fotosintéticos en atmósferas con concentraciones elevadas de CO₂, en los que la contribución de la ruta del glicolato en el suministro de serina a las plantas sería, a priori, mínima.

V.3 Interés biotecnológico de las vías de biosíntesis de serina

Como se ha comentado anteriormente, existe cierta evidencia que sugiere que la serina puede estar implicada en las respuestas de las plantas a diversos estreses ambientales (Kleczkowski y Givan, 1988). Por ejemplo, se ha comprobado que se acumula serina en las plantas cultivadas en condiciones de baja temperatura y de salinidad elevada (Ho y Saito 2001; Waditee y col., 2007). En un intento de mejorar la tolerancia de las plantas al estrés salino y térmico (en concreto al frío), Waditee y colaboradores (2007) diseñaron una estrategia para aumentar el contenido de betaína en *arabidopsis*. Específicamente, transfirieron la enzima PGDH de la cianobacteria *Aphanothece halophytica* a plantas de *arabidopsis* en las que previamente se había inducido la ruta de síntesis de betaína vía la metilación de la glicina. Estos autores asumían que una mayor actividad de la enzima PGDH aumentaría la disponibilidad del precursor serina para la síntesis de glicina y por tanto de betaína (por la vía de metilación de la glicina). Se demostró que la sobreexpresión de PGDH no sólo incrementaba la tolerancia a la sal y al frío en las plantas con la ruta sintética de betaína sino también en plantas silvestres. El mecanismo molecular por el que PGDH aumentaría la tolerancia de las plantas a

estos tipos de estreses aún hoy sigue sin estar claro, aunque estos autores sugirieron que la propia serina podría estar directa o indirectamente involucrada en dichos mecanismos. Nuestros resultados sobre la expresión de los genes de la familia PGDH revelaron que los genes *PGDH* y *EDA9*, se inducen significativamente, tanto en las partes aéreas como en las raíces, en tratamientos con NaCl de larga duración (Figura IV.11A). En un tratamiento de corta duración (250 mM NaCl durante 24 horas) el gen *PGDH* se indujo en la parte aérea y en raíces, mientras que el gen *EDA9* únicamente se indujo en la parte aérea (Figura IV.11B). Estos resultados proporcionan las primeras evidencias de la posible implicación de la familia PGDH en la respuesta a este tipo de estreses en plantas. En este sentido, la serina sintetizada a través de la vía fosforilativa podría afectar a la transducción de la señal del ABA, que juega un papel central en la respuesta de las plantas al frío y la salinidad. El hecho de que los dobles mutantes de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa plastidial, que tienen la ruta fosforilativa bloqueada, sean insensibles a ABA podría apoyar esta idea (Muñoz-Bertomeu y col., 2011a, y 2011b). No obstante, se necesitarán más experimentos que corroboren nuestros resultados.

Por otra parte, el continuo aumento de la concentración atmosférica de CO₂, como resultado de la actividad antropogénica, podría afectar negativamente a la ruta del glicolato durante el día, ya que la actividad de esta ruta es dependiente de la concentración de CO₂ atmosférico. Desconocemos cómo estas condiciones ambientales afectarán al suministro de serina en las plantas y, por lo tanto no se sabe cuál podría ser el papel de la ruta fosforilativa en las nuevas condiciones ambientales del futuro. En este sentido, se destaca que la contribución de la ruta fosforilativa para proporcionar serina en las plantas C4, donde la fotorrespiración es muy limitada, podría ser más importante que en las plantas C3. Además, las interacciones de la vía del glicolato con las vías no fotorrespiratorias en plantas C4 podrían ser completamente diferentes de las que ocurren en las plantas C3. Aunque el conocimiento actual sobre este tema es limitado y no nos permite aventurar

ninguna hipótesis con rotundidad, podemos suponer que podrían haber redes de regulación capaces de coordinar las tres rutas de biosíntesis de serina, las cuales pueden diferir en grupos distintos de plantas. Hasta la fecha, todas estas redes reguladoras siguen siendo desconocidas. Por lo tanto, es importante conocer la contribución real de las diferentes rutas biosintéticas de serina con el fin de entender cómo están coordinadas e integradas a nivel de toda la planta y cómo podrían interactuar en los procesos de metabolismo y desarrollo.

La manipulación de las vías de biosíntesis de serina también podría tener un impacto en el valor nutricional de los alimentos. La serina es un precursor de otros aminoácidos, tales como metionina y cisteína, que suelen ser los aminoácidos esenciales más limitados en las plantas de cultivo (Ufaz y Galili, 2008). Este es un problema para la alimentación animal, cuya dieta tiene que ser suplementada con 0,1% de L-metionina, repercutiendo en el coste de la alimentación. Por lo tanto, podría ser muy interesante investigar la importancia biotecnológica de las diferentes rutas de biosíntesis de serina para mejorar la calidad nutricional de los cultivos.

A través de la aplicación de las nuevas herramientas genómicas, transcriptómicas y metabolómicas en líneas con ganancia y/o pérdida de función, será factible el estudio de las rutas biosintéticas de serina y de su interconexión, lo que ayudaría a modelar el metabolismo de la planta y, por tanto, mejorar su productividad y también la calidad de los alimentos.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1) Se han identificado y caracterizado molecularmente tres genes que codifican para posibles enzimas de la familia PGDH (*PGDH*, *3-PGDH* y *EDA9*) Estos genes muestran un patrón de expresión diferente y específico a nivel de órganos, tejidos y células, sugiriendo que no son funcionalmente redundantes. *PGDH* y *EDA9* se expresan tanto en la parte aérea como en las raíces, mientras que *3-PGDH* se expresa sólo en la parte aérea. *EDA9*, también se expresa en los primeros estadios del desarrollo del tapete de la antera, del polen y del embrión, sugiriendo un papel importante de la enzima *EDA9* durante procesos específicos de desarrollo de arabisidopsis.
- 2) Los mutantes de los tres genes de la familia PGDH muestran fenotipos diferentes. Mientras que los mutantes simples de *PGDH* y *3-PGDH* son viables y no tienen fenotipo aparente en condiciones normales de crecimiento, los mutantes homocigotos *eda9.1eda9.1* del gen *EDA9* son inviables. Este resultado indica que el gen esencial en esta familia es *EDA9*, mientras que los otros dos (*PGDH* y *3-PGDH*) pueden tener efectos de compensación y/o funciones específicas no esenciales bajo condiciones normales de crecimiento.
- 3) Los estudios genéticos han demostrado que el gen *EDA9* es esencial para la viabilidad y el desarrollo del embrión. Concretamente, la ausencia de expresión de *EDA9* produce un fenotipo de embrión letal por un retraso en su desarrollo a partir de la fase globular, que finalmente conduce a su aborto.
- 4) Se ha demostrado además que la ausencia de expresión de *EDA9* afecta al desarrollo correcto de las microsporas y, probablemente al de las células del tapete de la antera, lo que provoca finalmente alteraciones en la maduración y viabilidad del polen.

- 5) Las plantas homocigotas *eda9.1eda9.1* muestran los mismos fenotipos de letalidad del embrión y de inviabilidad del polen que los mutantes *psp1.1psp1.1*, lo que corrobora el papel esencial de la RFBS en estos procesos de desarrollo. Se postula que el papel esencial de estos dos genes puede estar relacionado con su expresión en tipos celulares muy específicos, en los que los únicos suministros de serina procederían de la RFBS intracelular. Nuestros resultados sugieren que el aporte, vía floema, de serina suministrada por las otras dos rutas biosintéticas (glicerato y glicolato), tiene menor relevancia biológica en el tapete, las microsporas y el embrión.
- 6) El perfil metabólico de los mutantes *pgdh1pgdh1* y *3-pgdh1 3-pgdh1* no fue idéntico, lo que confirmaría que PGDH y 3-PGDH no son funcionalmente redundantes. Los niveles de serina en las líneas sobreexpresoras de los tres genes son significativamente superiores a los de las plantas control, lo que indica que las tres enzimas de la familia PGDH podrían participar en la biosíntesis de este aminoácido. El nivel de serina en las raíces es superior al de las partes aéreas en las líneas *OexEDA9* y *oexPGDH*. Dado que *PGDH* y *EDA9* se expresaron bajo el control del promotor *35S*, se deduce que existe un mecanismo de regulación postranscripcional/traduccional controlando la actividad de estas enzimas.
- 7) Los resultados obtenidos en esta tesis han puesto de manifiesto la función esencial de la RFBS en el metabolismo y el desarrollo de las plantas. Aunque se da por supuesta la existencia de interconexiones entre metabolismo y desarrollo, se desconocen cuáles son los mecanismos que conectan ambos procesos. Nuestros resultados indican que *EDA9* desempeña una función esencial en las células no fotosintéticas que se dividen activamente, tales como las células de los embriones y de las anteras. Por lo tanto, la RFBS y/o la serina podrían constituir una conexión crucial entre el metabolismo primario y el control de la progresión del ciclo celular en algunos tipos celulares específicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelly JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C, Venter JC (1992) Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* 355: 632-634.
- Adams MD, Kelly JM, Goacayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252:1651-1656.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Jkim C, Chen HM, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide Insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Al-Shehbaz IA (1984) The tribes of Cruciferae (Brassicaceae) in the south eastern United States. *Jornal of the Arnold Arboretum* 65: 343-373.
- Ávalos A, Pérez-Urria E (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2: 119-145.
- Azcón-Bieto J, Talón M (2008) *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Azpiroz-Leehan R, Feldman KA (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genetics* 13: 152-156.
- Bachelor MA, Lu Y, Owens DM (2011) L-3-Phosphoserine phosphatase (PSPH) regulates cutaneous squamous cell carcinoma proliferation independent of L-serine biosynthesis. *Journal of Dermatological Science*, 63, 164-172.

- Baulcombe DC (1996) RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 32(1-2):79-88.
- Beckmann K, Dzuibany C, Biehler K, Fock H, Hell R, Migge A, Becker TW (1997) Photosynthesis and fluorescence quenching, and the mRNA levels of plastidic glutamine synthetase or of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase (SHMT) in the leaves of the wild-type and of the SHMT-deficient *stm* mutant of *Arabidopsis thaliana* in relation to the rate of photorespiration. *Planta* 202:379-386.
- Benson, DA, Boguski M, Lipman DJ, Ostell J (1994) GenBank. *Nucleic Acids Research* 22: 3441-3444.
- Berná G, Robles P, Micol JL (1999) A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 152: 729-742.
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.
- Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1525.
- Boavida LC, McCormick S (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 52: 570-582.
- Bowman JL (1994) *Arabidopsis. An atlas of morphology and development*. Springer-Verlag. Singapur.
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM (1988) *Arabidopsis thaliana*: a review. *Plant Molecular Cell Biology* 5: 57-87.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorchach F (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis :

- A model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* 13: 1499-1510.
- Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, Aubourg S, Samson F, Chauvin S, Bechtold N, Cruaud C, De Rose R, Pelletier G, Lepiniec L, Caboche M, Lechamy A (2002) T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of preinsertion sites. *EMBO Reports* 12: 1152-1157.
- Bryan JK (1988) Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. En *The biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*. Mifflin BJ, Lea PJ (eds.). New York Academic Press, New York. pág. 175-176
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T (2009) Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *Arabidopsis Book* 7: e0126.
- Cascales-Miñana B (2012) Implicación de la gliceraldehido3-fosfato deshidrogenasa y de la 3-fosfoserina fosfatasa en el metabolismo y desarrollo de *Arabidopsis*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Cascales-Miñana B, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Anoman AD, Pertusa J, Alaiz M, Osorio S, Fernie AR, Segura J, Ros R (2013) The phosphorylated pathway of serine biosynthesis is essential both for male gametophyte and embryo development and for root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 2084-2101.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application incloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 11:287-293.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735-743.
- Colcombet J, Boisson-Dernier A, Ros-Palau R, Vera CE, Schroder JI (2005) *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2

- are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* 17: 3350-3361.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plant. *Plant physiology* 133: 462-469.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 5-17.
- Davidson EH (1994) Molecular biology of embryonic development: how far have we come in the last ten years?. *Bioessays* 16: 603-615.
- Devic M (2008) The importance of being essential: *EMBRYO-DEFECTIVE* genes in Arabidopsis. *Comptes Rendus Biologies* 331: 726-736.
- Dey S, Burton RL, Grant GA, Sacchettini JC (2008). Structural analysis of substrate and effector binding in *Mycobacterium tuberculosis* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemistry* 47: 8271-8282.
- Dickinson HG, Lewis FRS (1973) The formation of the tryphine coating the pollen grains of *Raphanus*, and its properties relating to the self-incompatibility system. *Proceedings of the Royal Society B* 184: 149-165.
- Dong XY, Hong ZL, Sivaramakrishnan M, Mahfouz M, Verma DPS (2005) Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. *Plant Journal* 42: 315-328.
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* 6: 167-176.

- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978-984.
- Emmert DB, Stoehr PJ, Stoesser G, Cameron GN (1994) The European Bioinformatics Institute (EBI) databases. *Nucleic Acids Research* 22: 3445-3449.
- Estelle M, Somerville CR (1986) The mutants of *Arabidopsis*. *Trends in Genetics* 2: 89-93.
- Feldmann KA, Marks D (1987) Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Molecular genetics and genomics* 208: 1-9.
- Furni A, Koncz C, Salamini F, Bartels D (1997) High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *Embo Journal* 16: 3599-3608.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 1: 151-158.
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant Journal* 58: 246-259
- Griffing B, Scholl RL (1991) Qualitative and quantitative genetic studies of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 129: 605-609.
- Hall AE, Fiebig A, Preuss D (2002) Beyond the *Arabidopsis* genome: opportunities for comparative genomics. *Plant Physiology* 129: 1439-1447.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.

- Handford J, Davies DD (1958) Formation of phosphoserine from 3-phosphoglycerate in higher plants. *Nature* 182: 532-533.
- Hess JL, Tolbert NE (1966) Glycolate, glycine, serine, and glycerate formation during photosynthesis by tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry* 241: 5705-5711.
- Ho CL, Noji M, Saito K (1999a) Plastidic pathway of serine biosynthesis. Molecular cloning and expression of 3-phosphoserine phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 11007-11012.
- Ho CL, Noji M, Saito M, Saito K (1999b) Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*. Crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in nonphotosynthetic tissues. *Journal of Biological Chemistry* 274: 397-402.
- Ho CL, Noji M, Saito M, Yamazaki M, Saito K (1998) Molecular characterization of plastidic phosphoserine aminotransferase in serine biosynthesis from *Arabidopsis*. *Plant Journal* 16: 443-452.
- Ho CL, Saito K (2001) Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 20: 243-259.
- Holsters M, Dewaele D, Depicker A, Messens E, Vanmontagu M, Schell J (1978) Transfection and Transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* 163: 181-187.
- Hood LE, Hunkapiller MW, Smith LM (1987) Automated DNA sequencing and analysis of human genome. *Genomics* 1: 201-212.
- Hope IA (1994) *Caenorhabditis elegans*, the Nematode Worm. En *Embryos*. Bard J (ed.). Wolfe Publishing, Singapur. pág. 55-75.
- Hunkapiller T, Kaiser RJ, Koop BF, Hood L (1991) Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* 254: 59-67.
- Hunt E, Gattolin S, Newbury HJ, Bale JS, Tseng HM, Barrett DA, Pritchard J (2010) A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid

- content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *Journal of Experimental Botany* 61: 55-64.
- Innan H, Terauchi R, Miyashita NT (1997) Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146:1441-1452.
- Innis MA , Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In Innis MA , Gelfand DH, Sninsky J and White TJ [eds.], PCR Protocols, 3-12. Academic Press, New York.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ireland RJ, Hiltz DA (1995) In Amino Acids and their Derivates in Higher plants, Wallsgrove RM (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pág.111-118.
- Iturrioz GM (2004) Guía completa de aminoácidos y proteínas. Solgar España.
- Jander G, Norris S R, Rounsley S D, Bush D F, Levin I M, Last R L (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiology* 129: 440-450.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Johnson HS, Hatch MD (1969) The C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis Identification of intermediates and products and quantitative evidence for the route of carbon flow. *Biochemical Journal* 114: 127-134.
- Kalhan SC, Hanson RW (2012) Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 19786-19791.
- Kamińska Z, Maleszewski S (1992) Glycolic Acid Pathway in Photosynthetic Carbon Metabolism of Bean Leaves at Various Oxygen Concentration *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 108: 201-206.

- Kempin SA, Liljegren SJ, Block LM, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lam E (1997) Targeted disruption in Arabidopsis. *Nature* 389: 802-803.
- Keys AJ (1980) Amino acids and derivatives. En *The biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*. Mifflin BJ (ed.). New York Academic Press, New York. pág. 359-374.
- Kleczkowski LA, Givan CV (1988) Serine formation in leaves by mechanisms other than the glycolate pathway. *Journal of Plant Physiology* 132: 641-652.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396.
- Koorneef M, Stam P (1992) Genetic analysis. En *Methods in Arabidopsis research*. Koncz C, Chua NH, Schell J (eds.). World Scientific. pág. 83-99.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman M R (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2283-2290.
- Larsson C, Albertsson E (1979) Enzymes related to serine synthesis in spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 45: 7-10.
- Laux T, Wurschum T, Breuninger H (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* 16: S190-202.
- Lee LY, Gelvin SB (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* 146:325-332.
- Leptin M (1994) Drosophila. En *Embryos*. Bard J (ed.). Wolfe Publishing, Singapur. pág. 135-147.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396

- Liu QH, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ (1998) The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Current Biology* 8: 1300-1309.
- Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhim R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG (2011) Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux contributes to oncogenesis. *Nature Genetics* 43:869-874.
- Lund K, Merrill DK, Guynn RW (1987) Purification and properties of phosphoserine aminotransferase from bovine liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 254: 319-328.
- Maes T, De Keukeleire P, Gerats T (1999) Plant tagnology. *Trends in Plant Science* 4: 90-96.
- Maliga P, Bock R (2011) Plastid Biotechnology: Food, Fuel, and Medicine for the 21st Century. *Plant Physiology* 155: 1501-1510.
- Marques IA, Oberholzer MJ, Erismann KH (1985) Metabolism of glycollate by *Lemna minor* L. grown on nitrate or ammonium as nitrogen source. *Journal of Experimental Botany* 36: 1685-1697.
- McCormick S (2004) Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16:S142-S153.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 679-682.
- Meyerowitz EM (1987) *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* 21: 93-111.
- Meyerowitz EM (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56: 263-269.

- Meyerowitz EM (2001) Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* 125: 15-19.
- Meyerowitz EM, Pruitt RE (1985) Molecular biology of plant growth and development. *Arabidopsis thaliana* as an experimental system. *Developmental Biology* 5: 353-366.
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu LH, Obermeyer G, Feijo JA (2011) Glutamate receptor-like genes form Ca^{2+} channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* 332: 434-437.
- Morot-Gaudry JF (1980) Oxygen effect on photosynthetic and glycolate pathways in young maize leaves. *Plant Physiology* 66: 1079-1084
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 4926-4931.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S (2001) Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91: 173-180.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Muñoz-Bertomeu J, Anoman AD, Toujani W, Cascales-Miñana B, Flores-Tornero M, Ros R (2011a) Interactions between abscisic acid and plastidial glycolysis in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 6: 157-159.
- Muñoz-Bertomeu J, Bermudez MA, Segura J, Ros R (2011b) *Arabidopsis* plants deficient in plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase show

- alterations in abscisic acid (ABA) signal transduction: interaction between ABA and primary metabolism. *Journal of Experimental Botany* 62:1229-1239.
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Alaiz M, Segura J, Ros R (2010a) A critical role of plastidial glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the control of plant metabolism and development. *Plant Signaling and Behavior* 5: 67–69.
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Irlés-Segura A, Mateu I, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Segura J, Ros R (2010b) The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 152:1830-1841.
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet JM, Baroja-Fernandez E, Pozueta-Romero J, Kuhn JM, Segura J, Ros R (2009) Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 151:541-558.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Osteryoung KW, Webber APM (2011) Plastid biology: focus on the defining organelle of plants. *Plant Physiology* 155: 1475-1476.
- Page DR, Grossniklaus U (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 3: 124-136.
- Page RDM (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Petiard V, Bariaud-Fontanel A (1987) El cultivo de células. *Mundo Científico* 7: 730-736.

- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29.
- Platt SG, Plaut Z, Bassham JA (1977) Steady-state photosynthesis in alfalfa leaflets: effects of carbon dioxide concentration. *Plant Physiology* 60: 230-234.
- Pollari S, Kakonen SM, Edgren H, Wolf M, Kohonen P, Sara H, Guise T, Nees M, Kallioniemi O (2011) Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* 125: 421-430.
- Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM (2011) Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476: 346-U119.
- Quesada V, Ponce MR, Micol JL (2000) Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421-436.
- Rédei GP (1970) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and Biology. *Bibliographia Genetica* 20: 1-151.
- Rédei GP (1975) Arabidopsis as a genetic tool. *Annual Review of Genetics* 9:111-127.
- Rédei GP, Koncz C (1992) *Classical mutagenesis*. En *Methods in Arabidopsis research*. Koncz C, Chua NH, Schell J (eds.). World Scientific. pág. 16-82.
- Reynolds PHS, Belvins DG (1986) Phosphoserine Aminotransferase in Soybean Root Nodules. Demonstration and localization. *Plant Physiology* 81:293-296.

- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW (1991) Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* 97: 227-233.
- Ripio-Samper JJ (2004) Análisis genético y molecular de *PEP1*, un gen implicado en la morfogénesis del fruto de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Ros R, Cascales-Miñana B, Segura J, Anoman AD, Toujani W, Flores-Tornero M, Rosa-Téllez S, Muñoz-Bertomeu J (2013) Serine biosynthesis by photorespiratory and non-photorespiratory pathways: an interesting interplay with unknown regulatory networks. *Plant Biology* 15: 707-712.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saito K, Takaji Y, Ho C-L, Takahashi H, Noji M (1997) Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding phosphoserine aminotransferase involved in phosphorylated pathway of serine biosynthesis from spinach. *Plant Molecular Biology* 33: 359-366.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernandez N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Muñoz L, Alvarez SF, González E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C (2006) High level

- expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotechnology* 124: 469-472.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu Y-C, Lee PY, Truong MT, Beals TB, Goldberg RB (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction* 11: 297-322.
- Schmidt R, Bancroft I (2011) *Genetics and genomics of the Brassicaceae*. Plant genetics and genomics: crops and models, vol 9. Springer, New York
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37: 501-506.
- Scholl RL, May ST, Ware DH (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1477-1480.
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell* 16: S46-S60.
- Servaites JC, Ogren WL (1977) Chemical inhibition of the glycolate pathway in soybean leaf cells. *Plant Physiology* 60: 461-466.
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke J D, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* 14: 2985-2994.
- Skirycz A, Sjozefczuk M, Stobiecki D, Muth, Zanol MI, Witt I, Mueller-Roeber B (2007) Transcription factor AtDOF4;2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 175: 425-438.

- Slaughter JC, Davies DD (1968) Inhibition of 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase by L-Serine. *Biochemical Journal* 109: 749-755.
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767.
- Snyder FW, Tolbert NE (1974) Effect of CO₂ concentration on glycine and serine formation during photorespiration. *Plant Physiology* 53:514-515.
- Sokal RR, Rohlf FJ (2012) Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research W. H. Freeman and company, New York.
- Somerville C, Koornneef M (2002) A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3: 883-889.
- Somerville CR, Ogren WL (1981) Photorespiration-deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana* .Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity. *Plant Physiology* 67: 666-671.
- Somerville CR, Ogren WL (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochemical Journal* 202: 373-380.
- Stewart GR, Larcher F (1980) Amino acids and derivatives. En *The biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*. Mifflin BJ (ed.). New York Academic Press, New York. pág. 609-635.
- Stolz M, Dörnemann D (1994) Purification, characterization and N-terminal sequence of phosphoserine aminotransferase from the green alga *Scenedesmus obliquus*, mutant C-2 A. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 49: 63-69.
- Strasburger E, Noll F, Schenck H, Schimper AFW (1994) *Tratado de Botánica*. 8ª ed. Editorial Omega.
- Tartof KD, Hobbs CA (1988) New cloning vectors and techniques for easy and rapid restriction mapping. *Gene* 67: 169-182.

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Timm S, Nunes-Nesi A , Pärnik T, Morgenthal K , Wienkoop S , Keerberg O, Weckwerth W , Kleczkowski LA , Fernie A R, Bauwe H (2008) A Cytosolic Pathway for the Conversion of Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2848-2859.
- Timm S, Florian A, Wittmiss M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 379-389.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Miguel Angel Torres MA, Murphy G, Jones JDG (1999) Multiple Independent Defective *Suppressor-mutator* Transposon Insertions in *Arabidopsis*: A Tool for Functional Genomics. *Plant Cell* 11:1841-1852.
- Tolbert NE (1980) Photorespiration. En *The biochemistry of plants, Vol 2*. Davies DD (ed.). Academic Press, New York, pág. 487-523.
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant cell* 20: 1736-1737.
- Ufaz S, Galili G (2008) Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities. *Plant Physiology* 147: 954-961.
- van der Krol AR, Brunelle A, Tsuchimoto S (1993) Functional analysis of petunia floral homeotic MADS box gene *pMADS1*. *Genes & Development* 7: 1214-1228.

- van Engelen FA, Molthoff JW, Conner AJ, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ (1995) pBINPLUS: An improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research* 4: 288-290.
- Waditee R, Bhuiyan N H, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M, Takabe T (2007) Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *Journal of Biological Chemistry* 282: 34185-34193.
- Walton NJ, Woolhouse HW (1986) Enzymes of serine and glycine metabolism in leaves and non photosynthetic tissues of *Pisum sativum L.* *Planta* 167: 119-128.
- Wingler A, Lea PJ, Leegood RC (1997) Control of photosynthesis in barley plants with reduced activities of glycine decarboxylase. *Planta* 202: 171-178.
- Winter D, B Vinegar, H Nahal, R ammar, G V Wilson, N J Provart (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2: e718.
- Yadegari R, Drews GN (2004) Female gametophyte development. *Plant cell* 16: S133-S141.
- Yamaoka Y, Yu Y, Mizoi J, Fujiki Y, Saito K, Nishijima M, Lee Y, Nishida I (2011) PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 67: 648-661.
- Yang C, Vizcsay-Barrena G, Conner K, Wilson Za (2007) Male Sterility1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell* 19: 3530-3548.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β -Carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Coloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A,

- Zheng H, Paik JH, Lim C, R.Guimaraes A, S.Martin E, Chang J, F.Hezel A, R.Perry S, Hu J, Gan B, Xiao Y, M.Asara J, Weissleder R, Wang YA, Chin L, C.Cantley L, A.DePinho R (2012) Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149: 656-670.
- Yoshida K, Furuya S, Osuka S, Mitoma J, Shinoda Y, Watanabe M, Azuma N, Tanaka H, Hashikawa T, Itohara S, Hirabayashia Y (2004) Targeted Disruption of the Mouse 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Gene Causes Severe Neurodevelopmental Defects and Results in Embryonic Lethality. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 3573-3577.
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

Tabla Suplementaria 1. Lista de cebadores utilizados en la elaboración de esta tesis doctoral

Gen	Cebador	Secuencia	Uso		
At1g17745 (<i>PGDH</i>)	Salk_048256 LP	CAAATCCAAAATGGGTGGAAC	Genotipado de SALK_048256 (<i>pgdh1</i>)		
	Salk_048256 RP	CTCGCAAAGATTACGAGATCTG			
	Lb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC			
	Salk_149747 LP	GTGGTCCTTGTTCTGTCTTCTATC	Genotipado de SALK_149747 (<i>pgdh2</i>)		
	Salk_149747 RP	GGGAGGTTAGCTGTGCAGTTAG			
	Lb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC			
	At1g17745PromHind3F	CCCAAGCTTAATCATGCATTAGGGTTTGGTTTG	Clonaje del promotor del gen <i>PGDH</i>		
	At1g17745PromSpeIR	GACTAGTTGCCATGACTCTTTTTTTAATAATA			
	At1g17745GFP-F	ATGGCATTTCATCTTCGTGTTTC	Clonaje del cDNA del gen <i>PGDH</i>		
	At1g17745GFP-R2	GAGTTTAAGAAACACAAACTCTTCAATC			
	PD 4 RT For	GGACAGGTTGGTAACATACTTGG	qRT-PCR de los mutantes SALK_048256 (<i>pgdh1</i>) y SALK_149747 (<i>pgdh2</i>)		
	PD 4 RT Rev	CATCAACTCCAATCGCCATTATC			
GK155B09LP	GK155B09LP	TTGGTGTGTTTCAAAGAGGC	Genotipado de GK_155B09 (<i>eda9.1</i>)		
	GK155B09RP	TACATCGGTTCCGTTCAATTGG			
	GABI8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC			
	GK867A04LP	ACAAACAAATCACTTGCCTG			
	GK867A04RP	CCTCACGGCCAACCTTAGTCC	Genotipado de GK_867A04 (<i>eda9.2</i>)		
	GABI8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC			
	At4g34200 (<i>EDA9</i>)	At4g34200PromHind3F		CCCAAGCTTGGGTGATTAATGCTAATTGGAAG	Clonaje del promotor del gen <i>EDA9</i> a partir de la construcción <i>ProEDA9:GUS</i>
		At4g34200PromBamR		CGGGATCTGACATTGTACCCTTTTGGAGTGTG	
AT4g34200GFP-F		ATGTCAGCCACCGCCGCGCTCCTCCTCGAT	Clonaje del cDNA del gen <i>EDA9</i>		
AT4g34200GFP-R		GAGCTTGAGGAAAACGAACTCCTC			
At4g34200PromPmeIF		AGCTTTGTTTAAACGGGTGATTAATGCTAATTGGAAAG	Clonaje del promotor del gen <i>EDA9</i>		
At4g34200PromPacR		CCCTTAATTAAGACATTGCTACCCTTTTGGAGTGTG			
EDA 9RTFor		GTTGGGAGAATTGCACCGAG	qRT-PCR de los mutantes GK_155B09 (<i>eda9.1</i>) y GK_867A04 (<i>eda9.2</i>)		
EDA 9RTFor		AGAATCAACAACACACAAACTAGAG			
SM_3_37584 LP	SM_3_37584 LP	GGCAGATGCAAAGAGATGAAG	Genotipado de SM_3_37584 (<i>3-pgdh1</i>)		
	SM_3_37584 RP	CCTTACTTAAACGCGCCTTATC			
	DSPM5	CGGGATCCGACACTCTTTAATTAAGTACACTC			
	GK_877F12 LP	CCTTACTTAAACGCGCCTTATC	Genotipado de GK_877F12 (<i>3-pgdh2</i>)		
	GK_877F12 RP	GGCAGATGCAAAGAGATGAAG			
	GABI8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC			
	At3g19480 (<i>3-PGDH</i>)	At3g19480PromHind3F		CCCAAGCTTGAGATATCTCACAAAAGCTTTCACT	Clonaje del promotor del gen <i>3-PGDH</i>
		At3g19480PromSpeIR	GACTAGTCATCGCGATGGCGGGAATATAATGTAAG		
At3g19480GFP-F		ATGGCGACGTCTCTGAATCTATC	Clonaje del cDNA del gen <i>3-PGDH</i>		
At3g19480GFP-R		TAGITTTGAGGAAAACAACTCTTC			
PD8 RT For		CTCTGTTTTCCCATCCGTCAG	qRT-PCR del mutante SM_3_37584 (<i>3-pgdh1</i>)		
PD8 RT Rev		GCCTAGTCTCCTCCGTTACGAG			
PD9 RT For		CTTTGTACGAAGATCTCTCTTTGTG	qRT-PCR del mutante GK_877F12 (<i>3-pgdh2</i>)		
PD9 RT Rev		GCGTCCAACAACCTTAAGCC			

Tabla Suplementaria 2. Valores absolutos de expresión, medidos a través de *Affymetrix GeneChip Operating Software* (GCOS), de 45 órganos y/o estadios de desarrollo para el gen *PGDH* (At1g17745). Los estadios de desarrollo aparecen representados en la Figura IV.3. Las diferentes categorías aparecen ordenadas en orden decreciente de expresión. Para cada categoría se muestra el valor medio de expresión \pm SD. Valores extraídos de *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007; detalles en el Apartado III.12).

Órgano / estadio de desarrollo	Expresión potencial
Hoja senescente	1583,9 \pm 54,23
Flor, estadio 15 (sépalos)	1288,9 \pm 55,02
Flor, estadio 12 (pétalos)	1228,08 \pm 7,52
Tallo, segundo entrenudo	1111,03 \pm 21,2
Flor, estadio 15 (Carpelos)	1037,13 \pm 28,6
Primer nódulo de ramificación	1052,2 \pm 33,38
Flor, estadio 15	918,98 \pm 34,29
Semillas, estadio 3 (silicua)	835,56 \pm 24,56
Flor, estadio 15 (pedicelo)	824,28 \pm 22,78
Hoja Caulinar	813,95 \pm 20,34
Flor, estadio 15 (estambres)	795,96 \pm 31,69
Flor, estadio 12	778,71 \pm 3,19
Hipocotilo	775,86 \pm 44,64
Flor, estadio 12 (sépalos)	723,51 \pm 15,65
Raíz de planta adulta	694,96 \pm 19,5
Ápice de la inflorescencia	659,81 \pm 31,02
Flor, estadio 12 (carpelos)	682,11 \pm 17,94
Hoja de roseta, estadio 2	605,16 \pm 49,69
Flor, estadio 9	598,66 \pm 23,34
Raíz de plántula joven	587,7 \pm 42,65
Flor, estadio 10/11	551,83 \pm 41,05
Ápice de transición	542,9 \pm 35,09
Semillas, estadio 4 (silicuas)	534,41 \pm 16,99
Roseta basal después de la floración	465,98 \pm 15,67
Flor, estadio 12 (estambres)	389,55 \pm 19,37
Semillas, estadio 5 (silicua)	386,66 \pm 11,55
Hoja de roseta, estadio 4	342,16 \pm 11,39
Hoja de roseta, estadio 6	302,55 \pm 23,3
Hoja, estadio 7(pecíolo)	273,5 \pm 5,08
Hoja de roseta, estadio 8	203,5 \pm 8,08
Hoja, estadio 7 (mitad proximal)	189,03 \pm 8,9
Semillas, estadio 6 (silicua)	182,13 \pm 18,96
Hoja de la roseta, estadio 10	170,03 \pm 2,68
Hoja, estadio 7 (mitad distal)	176,85 \pm 0,81

Tabla Suplementaria 2. Continuación.

Órgano / estadio de desarrollo	Expresión potencial
Roseta vegetativa	161,51 ± 20,42
Tallo, Ápice vegetativo	161,28 ± 10,22
Cotiledón	150,81 ± 12,23
Hoja de la roseta, estadio 12	138,36 ± 7,42
Semillas, estadio 7(silicua)	114,35 ± 0,67
Semillas, estadio 8 (silicua)	70,68 ± 6,72
Hoja, estadios 1 + 2	52,18 ± 7,96
Semilla embebida 24 h	37,76 ± 3,9
Semillas, estadio 9 (silicua)	37,33 ± 5,63
Polen maduro	35,83 ± 4,65
Semillas, estadio 10 (silicua)	28,21 ± 1,1

Tabla Suplementaria 3. Valores absolutos de expresión, medidos a través de *Affymetrix GeneChip Operating Software* (GCOS), de 45 órganos y/o estadios de desarrollo para el gen *3-PGDH* (At3g19480). Los estadios de desarrollo aparecen representados en la Figura IV.4. Las diferentes categorías aparecen ordenadas en orden decreciente de expresión. Para cada categoría se muestra el valor medio de expresión \pm SD. Valores extraídos de *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007; detalles en el Apartado III.12).

Órgano / estadio de desarrollo	Expresión potencial
Hoja, estadios 1 + 2	256,2 \pm 8,85
Cotiledón	185,13 \pm 3,19
Hoja, estadio 7 (mitad proximal)	165,91 \pm 31,68
Flor, estadio 15 (pedicelos)	156,0 \pm 1,77
Hoja de la roseta, estadio 8	140,88 \pm 2,39
Hoja, estadio 7 (mitad distal)	136,48 \pm 4,73
Hoja de roseta, estadio 6	126,3 \pm 5,33
Hoja de roseta, estadio 4	119,46 \pm 5,11
Hoja de roseta, estadio 10	118,98 \pm 8,28
Roseta vegetativa	118,73 \pm 12,97
Flor, estadio 12 (sépalos)	116,66 \pm 14,21
Roseta basal después de la floración	111,31 \pm 16,63
Hoja de roseta, estadio 12	95,46 \pm 2,98
Hoja, estadio 7 (pecíolo)	95,43 \pm 7,11
Hoja caulinar	82,78 \pm 2,76
Hoja de roseta, estadio 2	77,88 \pm 12,41
Semillas, estadio 3 (silicua)	69,78 \pm 5,25
Primer entrenudo	64,1 \pm 4,55
Semillas, estadio 4 (silicua)	53,16 \pm 5,18
Tallo, segundo entrenudo	48,08 \pm 1,51
Flor, estadio 10/11	47,96 \pm 2,3
Flor, estadio 12	40,44 \pm 6,33
Semillas, estadio 5 (silicua)	35,76 \pm 4,92
Hipocotilo	31,9 \pm 2,36
Flor, estadio 15(sépalos)	31,1 \pm 3,79
Flor, estadio15	29,15 \pm 3,9
Flor, estadio 15 (carpelos)	28,53 \pm 3,77
Flor, estadio 15 (pétalos)	27,23 \pm 3,47
Ápice vegetativo	24,8 \pm 4,31
Hoja senescente	22,01 \pm 2,01
Flor, estadio 9	25,9 \pm 3,32
Flor, estadio 12 (pétalos)	20,8 \pm 2,48
Flor, estadio 15 (estambres)	16,0 \pm 3,54
Ápice de transición	15,83 \pm 1,31

Tabla Suplementaria 3. Continuación.

Órgano / estadio de desarrollo	Expresión potencial
Flor, estadio 12 (carpelos)	15,15 ± 3,69
Ápice de la inflorescencia	13,63 ± 1,08
Semillas, estadio 6 (silicuas)	10,61 ± 3,7
Semilla seca	7,37 ± 1,53
Flor, estadio 12 (Estambres)	7,25 ± 2,21
Semillas, estadio 10 (silicua)	5,35 ± 5,76
Semillas, estadio 7 (silicua)	4,2 ± 2,37
Polen maduro	2,38 ± 0,98
Semilla embebida 24 h	2,63 ± 1,49
Semillas, estadio 8 (silicua)	1,86 ± 0,82
Raíz de plántula joven	1,61 ± 0,43
Semillas, estadio 9 (silicua)	1,4 ± 0,47
Raíz de planta adulta	1,15 ± 0,14

Tabla Suplementaria 4. Valores absolutos de expresión, medidos a través de *Affymetrix GeneChip Operating Software* (GCOS), de 45 órganos y/o estadios de desarrollo para el gen *EDA9* (At4g34200). Los estadios de desarrollo aparecen representados en la Figura IV.5. Las diferentes categorías aparecen ordenadas en orden decreciente de expresión. Para cada categoría se muestra el valor medio de expresión \pm SD. Valores extraídos de *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007; detalles en el Apartado III.12).

Órgano / estadio de desarrollo	Expresión potencial
Ápice vegetativo	1171,16 \pm 35,11
Ápice de transición	1057,08 \pm 38,6
Raíz de plántula joven	996,81 \pm 43,51
Raíz de planta adulta	985,16 \pm 60,72
Semilla embebida 24 h	974,35 \pm 58,55
Ápice de la inflorescencia	931,75 \pm 42,2
Hipocotilo	861,96 \pm 47,58
Roseta vegetativa	824,03 \pm 65,93
Flor, estadio 12 (pétalos)	778,86 \pm 17,99
Flor, estadio 15 (carpelos)	670,15 \pm 27,84
Flor, estadio 12 (carpelos)	612,83 \pm 31,02
Flor, estadio 9	583,0 \pm 30,91
Flor, estadio 12	566,66 \pm 53,56
Flor, estadio 12 (estambres)	565,35 \pm 26,02
Flor, estadios 10/11	561,18 \pm 17,67
Semillas, estadio 4 (silicua)	555,66 \pm 16,31
Semillas, estadio 5 (silicua)	552,6 \pm 8,59
Primer nódulo	543,5 \pm 15,25
Hoja, estadio 7 (pecíolo)	499,48 \pm 6,09
Hoja de roseta, estadio 12	497,68 \pm 6,15
Semillas, estadio 6 (silicua)	486,58 \pm 30,51
Roseta basal después de la floración	440,46 \pm 42,56
Tallo, segundo entrenudo	384,46 \pm 17,38
Hoja de roseta, estadio 10	370,81 \pm 38,29
Flor, estadio 15 (pedicelo)	350,88 \pm 17,15
Semillas, estadio 7 (silicua)	326,28 \pm 1,67
Hoja, estadios 1 + 2	323,43 \pm 40,21
Flor, estadio 15	291,75 \pm 5,43
Semilla seca	284,85 \pm 71,56
Hoja de la roseta, estadio 8	266,88 \pm 18,92
Hoja senescente	238,9 \pm 2,24
Polen maduro	231,98 \pm 21,95
Flor, estadio 12 (sépalos)	231,76 \pm 11,32
Flor, estadio 15 (sépalos)	228,11 \pm 6,43

Tabla Suplementaria 4. Continuación.

Órgano / estadio de desarrollo	Expresión potencial
Hoja de roseta, estadio 6	224,28 ± 31,16
Hoja de roseta, estadio 2	214,58 ± 18,63
Hoja de roseta, estadio 4	210,95 ± 10,61
Hoja, estadio 7 (mitad proximal)	211,7 ± 12,07
Semillas, estadio 3 (silicua)	186,95 ± 4,62
Cotiledón	181,1 ± 12,07
Hoja, estadio 7 (mitad distal)	156,6 ± 7,18
Hoja caulinar	134,58 ± 11,93
Semillas, estadio 8 (silicua)	126,9 ± 7,82
Flor, estadio 15 (estambres)	117,2 ± 5,08
Flor, estadio 15 (pétalos)	101,86 ± 7,33
Semillas, estadio 10 (silicua)	83,25 ± 16,18
Semillas, estadio 9 (silicua)	78,25 ± 6,35

