



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Biología Vegetal

# Profundización en la caracterización funcional de las isoformas glicolíticas de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Arabidopsis*



Tesis doctoral presentada por Djoro Armand Anoman para optar al grado de Doctor por la Universitat de València

D030-01 Programa oficial de Postgrado en Biotecnología

Dirigida por Jesús Muñoz-Bertomeu y Roc Ros Palau

Valencia, 2015

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



BIOTECMED  
Estructura de Recerca Interdisciplinària  
en Biotecnologia i Biomedicina





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Biología Vegetal**

**Profundización en la caracterización funcional  
de las isoformas glicolíticas de la  
gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de  
Arabidopsis**

Tesis doctoral presentada por Djoro Armand Anoman para  
optar al grado de Doctor por la Universitat de València

**D030-01 Programa oficial de Postgrado en Biotecnología**

**Dirigida por Jesús Muñoz-Bertomeu y Roc Ros Palau**

**Valencia, 2015**

VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



**BIOTECMED**

Estructura de Recerca Interdisciplinària  
en Biotecnologia i Biomedicina



D. Jesús Muñoz Bertomeu, Doctor en Biología por 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 “Profundización en la caracterización funcional de las isoformas glicolíticas de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de Arabidopsis”, presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat de València, ha sido realizada bajo nuestra dirección por el licenciado en Biotecnología  
DJORO ARMAND ANOMAN

Fdo. Jesús Muñoz-Bertomeu

Fdo. Roc Ros Palau



# FINANCIACIÓN

---

Esta tesis de doctorado se realizó gracias a las siguientes fuentes de financiación:

- Beca de la “Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo” del Gobierno de España
- Bourse du Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique” de la République de Côte d’Ivoire
- Proyecto de investigación BFU2009-07020/BFI del Ministerio de Ciencia e Innovación (2010-2012).
- Proyecto de investigación BFU2012-31519 del Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015).
- PROMETEO/2009/075 de la Generalitat Valenciana (2009-2013).
- PROMETEO II/2014/052 de la Generalitat Valenciana (2014-2017)





*A mon Père et à ma Mère*



# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar quiero darle las gracias a mi director de tesis, Dr Roc Ros, que confió en mí y me dio la oportunidad de realizar la tesis bajo su dirección. Me ayudó en todos los aspectos de la investigación con Arabidopsis y fue para mí un mentor, un brillante y humilde investigador, y un gran apoyo tanto a nivel científico como a nivel personal. Muchas gracias Roc por todo.

Mis agradecimientos también a mi co-director y compañero, Dr Jesús Muñoz, que guió mis pasos desde mi llegada al laboratorio. Su ayuda para la realización de esta tesis fue inestimable y fue para mí un gran amigo.

También agradecer a los doctores Juan Segura, Isabel Arrillaga, Ester P. Lorences y Carmen Calvo, Miguel C. Sanchez, profesores del departamento de Biología Vegetal, por su simpatía, su disponibilidad y por haber escuchado mis preocupaciones y la de mis compañeros de laboratorio cuando lo hemos necesitado.

Quiero darle las gracias al Dr Ramón Serrano, profesor investigador en el IBMCP, y a Mariche, a ambos por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y por su disponibilidad, y también al Dr Eduardo Bueso por su ayuda en la realización de los análisis de transcriptómica. No olvido tampoco al resto de integrantes del laboratorio 1.10 con los que pase buenos momentos.

A mis compañeras y ex-compañero, Sara, María y Walid, os digo también muchas gracias. Más que compañeros hemos sido amigos y habéis estado siempre cuando lo he necesitado, tanto en el laboratorio como en todos los aspectos de la vida diaria.

Muchas gracias a mis compañeras del grupo CyD, Isabel y Marian, por vuestra ayuda y por haber hecho que mi estancia sea más llevadera en el laboratorio.

No olvido en estos agradecimientos a Estrella que no pierde nunca la sonrisa, Carolina, M. Carmen, Consuelo y M. José que han estado siempre disponibles para mis compañeros y para mí solucionando nuestros problemas y dudas.

Mis agradecimientos a todo el personal del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental y a Sonia Priego, técnica de microscopía confocal en la facultad de medicina, por el excelente soporte científico del cual hemos disfrutado. Mis agradecimientos también al Dr Alisdair Fernie y a su equipo en el Instituto Max Planck por los análisis de metabólica.

Muchas gracias a todos los técnicos y colaboradores que han estado en nuestro grupo de investigación y que me han ayudado en la realización de esta tesis.

Muchas gracias a todos mis amigos, Miquel, Lupe, especialmente a Luis Carlos y María I., por su amistad y por su inestimable ayuda.

Muchas gracias a Olga, por estar siempre conmigo y por soportarme, y también a su familia ¡Gracias Olga y Pepe, y mucho ánimo!

Mis agradecimientos también al gobierno español por la beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo que he disfrutado para la realización de esta tesis.

Termino dando las gracias a todas las personas que no he mencionado aquí, pero que de una forma u otra me han ayudado en la realización de este trabajo, y también presento mis sinceras disculpas a todas las personas que he ofendido y he podido ofender.

Je termine ces lignes en disant un grand Merci à ma famille pour tout le soutien qu'elle m'a procuré durant toutes ces années. Merci Papa, merci Maman, merci tonton Loba, tonton David, merci Irène, Sandrine, Estelle, Evrard, Elodie, pour tous vos sacrifices et pour votre aide. Merci aussi à tous mes amis en Côte d'Ivoire, en particulier Michel B., et à mes amis à l'Université de Daloa, les professeurs Constant Ayolié et Cissé M'bouillé.

Merci enfin au gouvernement de Côte d'Ivoire pour la bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique dont j'ai bénéficié.





# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvii</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aproximaciones biotecnológicas al metabolismo primario .....	3
1.2 La planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
1.2.1 Biología de <i>A. thaliana</i> .....	6
1.2.2 Genética de <i>Arabidopsis</i> .....	9
1.3 Importancia agronómica del metabolismo primario y aplicaciones biotecnológicas .....	10
1.4 El plasto y el metabolismo primario.....	13
1.5 La glicólisis en las plantas.....	18
1.5.1 Descripción.....	18
1.5.2 Funciones de las enzimas glicolíticas.....	19
1.6 La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.....	21
1.6.1 La GAPDH citosólica.....	24
1.6.2 La GAPDH plastidial .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>

<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	Material Biológico.....	39
3.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
3.1.2	Cepas bacterianas .....	41
3.1.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	41
3.1.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	41
3.2	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	41
3.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
3.2.1.1	Esterilización de semillas .....	41
3.2.1.2	Medios de cultivo .....	42
3.2.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> .....	43
3.2.1.4	Cultivo en invernadero .....	43
3.2.2	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	44
3.2.2.1	Medio LB.....	44
3.2.2.2	Medio SOB.....	45
3.2.2.3	Medio SOC.....	45
3.2.2.4	Mantenimiento de las bacterias .....	45
3.3	Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos.....	46
3.3.1	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	46
3.3.1.1	Extracción de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i> .....	46
3.3.1.2	Aislamiento de DNA plasmídico.....	47
3.3.1.3	Extracción de RNA.....	49
3.3.1.4	Cuantificación de los ácidos nucleicos .....	50
3.3.2	Análisis de ácidos nucleicos .....	50
3.3.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa .....	50
3.3.2.2	Purificación de los productos de PCR .....	52
3.3.2.3	Electroforesis en gel de agarosa .....	53
3.3.2.4	Purificación de fragmentos de DNA en gel de agarosa.....	53
3.3.2.5	Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.....	54
3.3.2.6	Ligación de moléculas de DNA.....	54
3.3.2.7	Secuenciación del DNA .....	54
3.3.3	Análisis de la expresión génica .....	55
3.3.3.1	Síntesis de cDNA .....	55
3.3.3.2	RT-PCR cuantitativa .....	55



3.4	Diseño de las construcciones plasmídicas para la obtención de plantas transgénicas .....	56
3.4.1	Vectores de clonación y transformación .....	57
3.4.2	Construcción génica <i>ProRBCS:G1</i> .....	60
3.4.3	Construcción génica <i>ProCAB:G1</i> .....	60
3.4.4	Construcción génica <i>ProADH:G1</i> .....	61
3.4.5	Construcción génica <i>ProPHT:G1</i> .....	61
3.4.6	Construcción génica <i>ProHS:G1</i> .....	62
3.4.7	Construcción génica con el sistema alc .....	62
3.5	Obtención de células competentes de bacterias y procedimientos de transformación.....	63
3.5.1	Células competentes de <i>E. coli</i> .....	64
3.5.2	Transformación de <i>E. coli</i> .....	64
3.5.3	Células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	65
3.5.4	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	66
3.6	Transformación de <i>A. thaliana</i> .....	66
3.7	Selección de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> .....	67
3.8	Cuantificación de parámetros morfológicos de las plantas .....	68
3.8.1	<i>In vitro</i> .....	68
3.8.2	En invernadero.....	69
3.9	Medidas de almidón y de azúcares solubles y totales.....	69
3.10	Medidas de actividades enzimáticas.....	71
3.10.1	Extracción de las enzimas .....	71
3.10.2	Determinación de las actividades de las enzimas glicolíticas.....	71
3.10.3	Determinación de las actividades de las enzimas del ciclo TCA .....	72
3.11	Determinación de los ácidos grasos.....	73
3.12	Determinación de los macronutrientes y micronutrientes .....	74
3.13	Análisis de microscopía.....	75

3.13.1	Ensayos de localización utilizando la proteína verde fluorescente GFP ...	75
3.13.2	Ensayos de localización utilizando la proteína reportera $\beta$ -glucuronidasa	75
3.14	Análisis por Western Blot	76
3.14.1	Extracción proteica	76
3.14.2	Electroforesis SDS-PAGE	77
3.14.3	Transferencia y Detección	78
3.14.4	Lavado y reutilización de las membranas	79
3.15	Análisis metabolómico	80
3.15.1	Extracción de los metabolitos	80
3.15.2	Derivatización	81
3.16	Análisis transcriptómico	82
3.16.1	Extracción del RNA y Síntesis del cDNA	83
3.16.2	Transcripción <i>in vitro</i> del amino alil RNA (aRNA) y marcaje fluorescente	84
3.16.3	Hibridación de las micromatrices	85
3.16.4	Lavado de las micromatrices	86
3.16.5	Escaneo y análisis estadístico de las micromatrices	86
3.17	Tratamiento estadístico de los resultados	87
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>89</b>
4.1.	Caracterización molecular de las isoformas de la GAPDH	91
4.2.	Caracterización fenotípica de las líneas mutantes de las isoformas citosólicas y plastidiales	93
4.3.	Caracterización metabolómica de los mutantes dobles de las isoformas citosólicas de la GAPDH	95
4.4.	Caracterización fenotípica de las líneas sobreexpresoras de la GAPCp1.	99

4.5.	Expresión de la GAPCp1 en partes aéreas de Arabidopsis .....	101
4.5.1.	Patrón de expresión de <i>GAPCp1</i> en las plantas <i>g1g2 RBCS:G1</i> .....	102
4.5.2.	Expresión de la proteína GAPCp1 en las líneas transformantes .....	103
4.5.3.	Localización subcelular de la proteína GAPCp1 bajo el control del <i>ProRBCS</i> .....	105
4.5.4.	Caracterización fenotípica de las plantas que expresan la GAPCp1 en las partes aéreas. ....	105
4.5.5.	Perfil metabólico .....	111
4.6.	Expresión de la GAPCp1 en las raíces de Arabidopsis .....	117
4.6.1.	Patrón de expresión de la GAPCp1 en las plantas transformadas con las construcciones génicas <i>ProPHT:G1</i> y <i>ProADH:G1</i> .....	118
4.6.2.	Expresión de la proteína GAPCp1 en las líneas transformantes .....	119
4.6.3.	Localización subcelular de GAPCp1 bajo el control del <i>ProPHT</i> . ....	120
4.6.4.	Caracterización fenotípica de las plantas expresando la GAPCp1 en las raíces.....	121
4.6.5.	Perfil metabólico de las líneas <i>g1g2 PHT:GAPCp1</i> .....	124
4.6.6.	Alteración del metabolismo del carbono, nitrógeno y nutrición mineral por la ausencia de la actividad GAPCp1 .....	132
4.6.7.	Evaluación del contenido en macronutrientes y micronutrientes. ....	140
4.6.8.	Suplementación del medio de cultivo con minerales. ....	142
4.6.9.	Medidas de actividades enzimáticas.....	142
4.7.	Dianas metabólicas y genómicas primarias de la actividad de la GAPCp1 .....	144
4.7.1.	Obtención de mutantes condicionales de la GAPCp1. ....	144
4.7.2.	Caracterización fenotípica de las plantas <i>g1g2 HS:G1</i> .....	146
4.7.3.	Expresión del gen <i>GAPCp1</i> tras el tratamiento de inducción en los mutantes condicionales.....	148
4.7.4.	Expresión de la proteína de fusión GAPCp1-GFP en las líneas transformantes con el transcurso del tiempo .....	149
4.7.5.	Dianas metabólicas y transcriptómicas primarias de la actividad de la GAPCp1 .....	151

4.7.5.1.	Dianas metabólicas .....	151
4.7.5.2.	Dianas transcriptómicas de la actividad de la GAPCp1 .....	159
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>165</b>
5.1.	Funciones de las GAPDHs fosforilativas en el metabolismo y desarrollo de la planta.....	167
5.2.	La actividad de la GAPCp1 en células no-fotosintéticas restaura el crecimiento y el perfil metabólico de la parte aérea .....	170
5.3.	La ausencia de actividad de la GAPC afecta al metabolismo del carbono, del nitrógeno y a la nutrición mineral.....	172
5.4.	Dianas primarias de la actividad de la GAPCp1 .....	175
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>183</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>187</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>201</b>

# ABREVIATURAS

---

1,3-bisPGA	1,3-bisfosfoglicerato
35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
35S:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>Pro35S:G1</i>
3-PGA	3-fosfoglicerato
ABA	Ácido abscísico
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
ADH:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>ProADH:G1</i>
Agua Milli-Q	Agua ultrapura
AlcA:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>ProAlcA:G1</i>
APS	Persulfato Amónico
aRNA	Amino alil RNA
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAB:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>ProCAB</i>
<i>CAB2</i>	Gen que codifica la proteína de union a clorofilas A/B 2
cDNA	DNA copia
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
DH5 $\alpha$	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido dexosirribonucleico

DNAasa	Dexosirribonucleasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENO1	Enolasa 1
FAME	Metil esteres de ácidos grasos (del inglés <i>Fatty Acid Methyl Esters</i> )
Fru-6P	Fructosa-6-fosfato
G1/G1/g1	Hace referencia a GAPCp1 (proteína /gen/gen mutado o mutante)
G2/G2/g2	Hace referencia a GAPCp2 (proteína /gen/gen mutado o mutante)
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPA	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A subunidad 2 plastidial
GAPA1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A subunidad 2 plastidial (At3g26650)
GAPA2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A subunidad 2 plastidial (At1g12900)
GAPB	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa B plastidial (At1g42970)
GAPC	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C citosólica
GAPC1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C subunidad 2 citosólica (At3g04120)
GAPC2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C subunidad 1 citosólica (At1g13440)
GAPCp	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial
GAPCp1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial 1 (At1g79530)
GAPCp2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial 2

	(At1g16300)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
Glu-6P	D-glucosa-6-fosfato
Glu-6P-DH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintetasa
GS	Glutamina sintasa
GUS	$\beta$ -glucuronidasa
GV3101	Cepa bacteriana de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
HK	Hexoquinasa
HS:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>ProHS:G1</i>
HSP18.2	Proteína de choque térmico 18.2
IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
MES	Ácido 2-N-Morfolinoetanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
MS	Murashige & Skoog
NADH/NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH/NADP <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
PBS	Del inglés <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PC1	Componente principal 1
PCA	Análisis de los componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato

PGDH	Fosfoglicerato deshidrogenasa
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PHT:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>ProPHT:G1</i>
PHT1.2	Transportador de fosfato 1.2
PK	Piruvato quinasa
PLD	Fosfolipasa D
<i>Pro35S</i>	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
<i>Pro35S:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>Pro35S</i>
<i>ProADH</i>	Promotor del gen At1g77120 que codifica la alcohol deshidrogenasa
<i>ProADH:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>ProADH</i>
<i>ProAlcA</i>	Promotor del gen de <i>Aspergillus nidulans</i> que codifica la alcohol deshidrogenasa
<i>ProAlcA:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>ProAlcA</i>
<i>ProCAB</i>	Promotor del gen At1g29920 que codifica la proteína <i>Chlorophyll A/B Binding Protein 2</i>
<i>ProCAB:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>ProCAB</i>
<i>ProHS</i>	Promotor del gen At5g59720 que codifica la proteína de choque térmico 18.2
<i>ProHS:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>ProHS</i>
<i>ProPHT</i>	Promotor del gen At5g43370 que codifica el transportador de fosfato 1,2
<i>ProPHT:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>ProPHT</i>



<i>ProRBCS</i>	Promotor del gen At5g38420 que codifica la subunidad pequeña 2B de la RuBISCO
<i>ProRBCS:G1</i>	Construcción donde el cDNA del gen <i>GAPCp1</i> fusionado al gen que codifica la GFP están bajo el control del <i>ProRBCS</i>
PSAT	3-fosfoserina aminotransferasa
PSP	3-fosfoserina fosfatasa
RBCS:G1	Líneas transgénicas obtenidas con la construcción <i>ProRBCS:G1</i>
RBCS-2B	Subunidad pequeña 2B de la RuBISCO
RFBS	Ruta fosforilativa de biosíntesis de serina
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RuBisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Error estandar
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SuSy	Sacarosa sintasa
T <sub>1</sub>	Primera generación de plantas transgénicas
T <sub>2</sub>	Segunda generación de plantas transgénicas
T <sub>3</sub>	Tercera generación de plantas transgénicas
TB	Tampón de transformación
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácidos tricarboxílicos
T-DNA	DNA de transferencia
TEMED	Tetrametiletilenodiamina

TOP10	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WT	Tipo silvestre / grupo control
X-GlcA	5-bromo-4-cloro-3- indolil glucurónido

# RESUMEN

---

La glicólisis es una ruta metabólica que se encuentra, al menos en parte, en todos los organismos vivos, y es una de las primeras grandes rutas cuyas enzimas fueron identificadas y caracterizadas a nivel bioquímico. En los últimos años, se ha demostrado que las enzimas que participan en la glicólisis están también implicadas en otros procesos como por ejemplo en la señalización celular.

En esta tesis doctoral, ha sido el objeto de nuestro estudio las isoformas glicolíticas de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fosforilativa de *Arabidopsis thaliana*. Las distintas isoformas de esta enzima participan en el ciclo de Calvin en los cloroplastos, y en la glicólisis en el citosol y en los plastos. Demostramos que todas las isoformas glicolíticas de la GAPDH (GAPC y GAPCp) son más abundantes en las raíces que en las partes aéreas, lo que nos llevó a postular que la glicólisis podría ser un proceso menor en la parte aérea, o al menos en las células fotosintéticas en condiciones luminosas donde sería un proceso antagonista a la fotosíntesis. Además, la ausencia de unas isoformas no está compensada con una sobreexpresión de otras. Demostramos igualmente mediante una caracterización morfológica y metabólica de mutantes dobles que las enzimas GAPCps contribuían más al metabolismo y al desarrollo de *Arabidopsis* que las GAPCs.

Se había demostrado previamente que la GAPDH glicolítica plastidial (GAPCp) es esencial para el desarrollo de la raíz y de las microsporas. Sin embargo, faltaba aún conocer la contribución específica de esta enzima en el metabolismo de la raíz y sobre todo su posible función en la parte aérea. Para ello se expresó la *GAPCp1* en los mutantes dobles de la GAPCp bajo el control de promotores específicos de células fotosintéticas (promotor de la RuBisCo) o de las raíces (promotor del transportador de fosfato PHT1.2). La expresión de la GAPCp en células fotosintéticas de las hojas no afectó al desarrollo de la parte aérea ni a su perfil metabólico. Sin embargo la expresión de la GAPCp bajo el control de

PHT1.2 aumentó el número de raíces laterales y tuvo un efecto importante en el metabolismo y desarrollo de la parte aérea. Estos resultados indican que la GAPCp1 no tiene significación funcional en las células fotosintéticas pero juega un papel fundamental en las raíces, y probablemente en otras células heterotróficas de la parte aérea. En las raíces, la actividad específica de la GAPCp1 podría requerirse en los meristemas y en las células de la caliptra, donde sería esencial para el crecimiento de la raíz primaria, que a su vez contribuiría al crecimiento del resto de la planta. Un estudio transcriptómico y metabolómico con mutantes condicionales de la GAPCp nos permitió identificar las dianas primarias génicas y metabólicas de la actividad de la enzima. Así pues, pudimos determinar que la glutamina, el glicerato y el galactinol eran las dianas metabólicas primarias de la GAPCp, lo que nos llevó a concluir que la glutamina y el glicerato podrían ser los metabolitos que responden directamente a la actividad de la enzima participando en el restablecimiento de la homeostasis metabólica, mientras que el galactinol sería un indicador de estrés consecuencia de la falta de actividad de la GAPCp que podría participar en la respuesta al estrés oxidativo. A nivel génico, identificamos los genes de una lisina descarboxilasa (At5g06300; *LOG7*) y de una glutamato descarboxilasa (At5g17330; *GAD*) como posibles dianas primarias de la actividad de la GAPCp1. *GAD* es un nexo metabólico entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno y esto podría ser la clave para explicar las desregulaciones que sufren las plantas mutantes dobles de la GAPCp.

Nuestros resultados indican que la GAPCp podría ser un conector de redes metabólicas clave como por ejemplo de glicólisis con la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina, la ruta de asimilación del amonio o el metabolismo del ácido gamma aminobutírico. Para manipular el metabolismo de la planta es necesario entender de forma precisa las redes metabólicas de las plantas y su forma de interconexión. Los resultados presentados en esta tesis doctoral abren nuevas direcciones para la investigación sobre los mecanismos moleculares que conectan estas redes metabólicas en las plantas.

# RESUM

---

La glicòlisi és un ruta metabòlica que es troba, si més no en part, a tots els organismes vius, i és una de les primeres grans rutes els enzims de la qual van ser identificats i caracteritzats a nivell bioquímic. En els darrers anys, s'ha fet palesa que els enzims que hi participen es troben també implicats en altres processos com per exemple en la senyalització cel·lular.

En aquesta tesi doctoral, han sigut objecte d'estudi les isoformes glicolítiques de la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) fosforilativa d'*Arabidopsis thaliana*. Les diverses isoformes d'aquest enzim participen al cicle de Calvin als cloroplasts, i en la glicòlisi al citosol i als plastids. Fem palesa que totes les isoformes glicolítiques de la GAPDH (GAPC i GAPCp) són més abundants a l'arrel que a la part aèria, la qual cosa ens porta a postular que la glicòlisi potser és un procés menor en la part aèria, o com a mínim a les cèl·lules fotosintètiques en condicions lluminoses, on seria un procés antagonista a la fotosíntesi. A més a més, la absència d'unes isoformes no es troba compensada amb una sobreexpressió d'altres. Demostrem igualment, mitjançant una caracterització morfològica i metabòlica de mutants dobles, que els enzims GAPCps contribueixen més al metabolisme i al desenvolupament d'*Arabidopsis* que les GAPCs.

Previament, es va demostrar que la GAPDH glicolítica plastidial (GAPCp) és essencial per al desenvolupament de l'arrel i de les microespores. No obstant això, restava encara per conèixer la contribució específica d'aquest enzim al metabolisme de l'arrel i sobre tot la seua possible funció en la part aèria. Amb aquest objectiu es va expressar la GAPCp1 als mutants dobles de la GAPCp sota el control de promotors específics de cèl·lules fotosintètiques (promotor de la RuBisCo) o de l'arrel (promotor del transportador de fosfat PHT1.2). L'expressió de la GAPCp en cèl·lules fotosintètiques de les fulles no va afectar al desenvolupament de la part aèria ni al seu perfil metabòlic. Tanmateix, l'expressió de la GAPCp sota el control de PHT1.2 va augmentar el nombre d'arrels laterals i

tingué un efecte important al metabolisme i desenvolupament de la part aèria. Aquests resultats indiquen que la GAPCp1 no té significació funcional en les cèl·lules fotosintètiques però juga un paper fonamental a les arrels i, probablement, a altres cèl·lules heterotròfiques de la part aèria. A les arrels, l'activitat específica de la GAPCp1 potser es requereix als meristems i cèl·lules de la caliptra, on seria essencial per al creixement de l'arrel primària, que al seu torn contribuiria al creixement de la resta de la planta. Un estudi transcriptòmic i metabolòmic amb mutants condicionals de la GAPCp ens va permetre identificar les dianes gèniques i metabolòmiques primàries de la activitat de l'enzim. Així doncs, determinarem que la glutamina, el glicerat i el galactinol eren les dianes metabòliques primàries de la GAPCp, la qual cosa ens fa concloure que la glutamina i el glicerat potser són els metabòlits que responen directament a l'activitat de l'enzim, i participen en el restabliment de la homeòstasi metabòlica, mentre que el galactinol potser és un indicador d'estrès produït per la manca d'activitat de la GAPCp, la qual potser participa en la resposta a l'estrès oxidatiu. A nivel gènic, vam identificar els gens d'una lisina descarboxilasa (At5g06300; *LOG7*) i d'una glutamat descarboxilasa (At5g17330; *GAD*) com a possibles dianes primàries de l'activitat de la GAPCp1. *GAD* és un nexa metabòlic entre el metabolisme del carboni i del nitrogen i això pot ser siga la clau per a explicar les desregulacions que sofreixen les plantes mutants dobles de la GAPCp.

Els nostres resultats indiquen que la GAPCp pot ser siga un connector de xarxes metabòliques clau com per exemple de la glicòlisi amb la ruta fosforilativa de biosíntesi de serina, la ruta d'assimilació de l'amoni o el metabolisme de l'àcid gamma aminobutíric. Per manipular el metabolisme de la planta és necessari entendre de forma precisa les xarxes metabòliques de les plantes i la seua forma d'interconnexió. Els resultats presentats en aquesta tesi doctoral obrin noves direccions per a la investigació sobre els mecanismes moleculars que connecten aquestes xarxes metabòliques en les plantes.

# ABSTRACT

---

Glycolysis is a metabolic pathway which is present, at least in part, in all living organisms, and is one of the major pathways which enzymes have been biochemically identified and characterized. In recent years, it has been demonstrated that enzymes which take part to glycolysis were also implicated in other processes, like for example cell signaling.

In this doctoral thesis, we have studied glycolytic isoforms of the phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in *Arabidopsis thaliana*. The various isoforms of this enzyme participate in Calvin cycle into chloroplasts, and in glycolysis into the cytosol and plastids. We demonstrated that all GAPDH glycolytic isoforms (GAPC and GAPCp) are more abundant in roots than in aerial parts, so we postulated that glycolysis could be a minor process in aerial parts, or at least in photosynthetic cells in light conditions where it would be antagonistic to photosynthesis. Besides, the lack of one of the isoforms was not compensated by an overexpression of the others. We also demonstrated via a metabolic and morphological characterization of double mutants that GAPCp enzymes contributed more to *Arabidopsis* metabolism and development than did GAPCs.

It has been previously demonstrated that plastidial glycolytic GAPDH (GAPCp) is essential for root growth and microspore development. However, the specific contribution of this enzyme to root metabolism and especially its potential role in the aerial part has not been unraveled yet. For this purpose, we expressed the enzyme in double *gapcp* mutants under the control of photosynthetic (RuBisCO) or root (PHT1.2) cell specific promoters. Expression of GAPCp in leave photosynthetic cells did not have any effect on the aerial part metabolic profile or growth. However, expression of GAPCp1 under the control of PHT1.2 promoter clearly affected *Arabidopsis* development, by increasing the number of lateral roots and having a major effect on the aerial part growth and metabolic

profile. Our results indicate that GAPCp1 is not functionally significant in photosynthetic cells but has a fundamental role in roots and probably in other heterotrophic cells of the aerial part. Specifically, GAPCp activity may be required in root meristems and root cap for proper primary root growth, which in turn would contribute to the growth of the rest of the plant. Performing a transcriptomic and metabolomic study on GAPCp conditional mutants, we were able to identify metabolic and genomic primary targets responding to GAPCp activity. Metabolic primary targets were glutamine, glycerate and galactinol. We postulate that glutamine and glycerate are the metabolite whose levels are primarily responding to GAPCp activity and are participating in the reestablishment of metabolic homeostasis while galactinol is the stress indicator generated by the lack of GAPCp activity that could participate in the response to oxidative stress. Genomic primary targets were a lysine decarboxylase (At5g06300; *LOG7*) and a glutamate decarboxylase (At5g17330; *GAD*). *GAD* is a metabolic link between carbon and nitrogen metabolism that could be a key to explain deregulations that occur in GAPCp double mutants plants.

Our results indicate that GAPCp could be a key metabolic connector of pathways such as the phosphorylated pathway of serine biosynthesis, the ammonium assimilation pathway or the metabolism of gamma-aminobutyric acid. Manipulation of plant metabolism needs to precisely understand plant metabolic networks and how they are interconnected. The results presented in this doctoral thesis open new directions for research on the molecular mechanisms connecting plant metabolic networks.



# RESUME

---

La glycolyse est une voie métabolique qui se trouve, au moins en partie, dans tous les organismes vivants, et elle est l'une des premières grandes voies dont les enzymes furent identifiées et caractérisées au niveau biochimique. Au cours des dernières années, il a été démontré que les enzymes qui participent à la glycolyse sont aussi impliquées dans d'autres processus comme par exemple la signalisation cellulaire.

Dans cette thèse doctorale, nous avons étudié les isoformes glycolytiques de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante de *Arabidopsis thaliana*. Les différentes isoformes de cette enzyme participent au cycle de Calvin dans les chloroplastes et à la glycolyse dans le cytosol et dans les plastes. Nous avons démontré que toutes les isoformes glycolytiques de la GAPDH (GAPC y GAPCp) sont plus abondantes au sein des racines qu'au sein des parties aériennes, ce qui nous a conduit à postuler que la glycolyse serait un processus mineur dans les parties aériennes, ou du moins dans les cellules photosynthétiques en conditions lumineuses où elle serait un processus antagoniste à la photosynthèse. De plus, l'absence de l'une de ces isoformes n'est pas compensée par une surexpression des autres. Nous avons aussi démontré à travers une caractérisation morphologique et métabolique de mutants doubles que la GAPC contribue plus au métabolisme et au développement d'*Arabidopsis* que la GAPCp.

Précédemment, il avait été démontré que la GAPDH glycolytique plastidiale (GAPCp) est essentielle pour le développement de la racine et des microspores. Cependant, il restait encore à connaître la contribution spécifique de cette enzyme au métabolisme de la racine, et surtout sa possible fonction dans la partie aérienne. Pour ce faire, nous avons exprimé la *GAPCp1* dans les mutants doubles de la GAPCp sous le contrôle de promoteurs spécifiques de cellules photosynthétiques (promoteur de la RuBisCO) ou de racines (promoteur du transporteur de phosphate PHT1.2). L'expression de la GAPCp au sein des cellules photosynthétiques des

feuilles n'a affecté ni le développement de la partie aérienne, ni son profil métabolique. Toutefois, l'expression de la GAPCp sous le contrôle de PHT1.2 a augmenté le nombre de racines latérales et a aussi eu un impact important sur le métabolisme et le développement de la partie aérienne. Ces résultats indiquent que la GAPCp1 n'a pas une signification fonctionnelle au sein des cellules photosynthétiques mais joue un rôle fondamental dans les racines, et probablement dans d'autres cellules hétérotrophes de la partie aérienne. Au sein des racines, l'activité de la GAPCp1 pourrait être nécessaire dans les méristèmes et dans les cellules de la calyptra, où elle serait nécessaire à la croissance de la racine primaire, qui à son tour contribuerait à la croissance du reste de la plante. Une étude transcriptomique et métabolomique avec des mutants conditionnels de la GAPCp nous a permis d'identifier les cibles primaires géniques et métaboliques de l'activité de cette enzyme. Ainsi, nous avons pu déterminer que la glutamine, le glycérate et le galactinol étaient les cibles métaboliques primaires de la GAPCp. Cela nous a conduit à conclure que la glutamine et le glycérate pourraient être les métabolites qui répondent directement à l'activité de l'enzyme en participant au rétablissement de l'homéostasie métabolique, pendant que le galactinol serait un indicateur de stress comme conséquence de l'absence d'activité de la GAPCp qui pourrait participer à la réponse au stress oxydatif. Au niveau génique, nous avons identifié les gènes d'une lysine décarboxylase (At5g06300; *LOG7*) et d'une glutamate décarboxylase (At5g17330; *GAD*) comme étant les possibles cibles primaires de l'activité de la GAPCp1. *GAD* est un lien métabolique entre le métabolisme du carbone et de l'azote et cela pourrait être la clef pour expliquer les dérégulations que souffrent les plantes mutantes doubles de la GAPCp.

Nos résultats indiquent que la GAPCp pourrait être un connecteur clef de réseaux métaboliques comme par exemple de la glycolyse avec la voie phosphorylante de biosynthèse de sérine, la voie d'assimilation de l'ammonium ou le métabolisme de l'acide gamma aminobutyrique.

Pour manipuler le métabolisme des plantes il est nécessaire de comprendre de façon précise les voies métaboliques qui ont lieu en leur sein et leur mode d'interconnexion. Les résultats présentés dans cette thèse doctorale ouvrent de nouvelles voies pour la recherche sur les mécanismes moléculaires qui connectent ces réseaux métaboliques.



# **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1 APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS AL METABOLISMO PRIMARIO

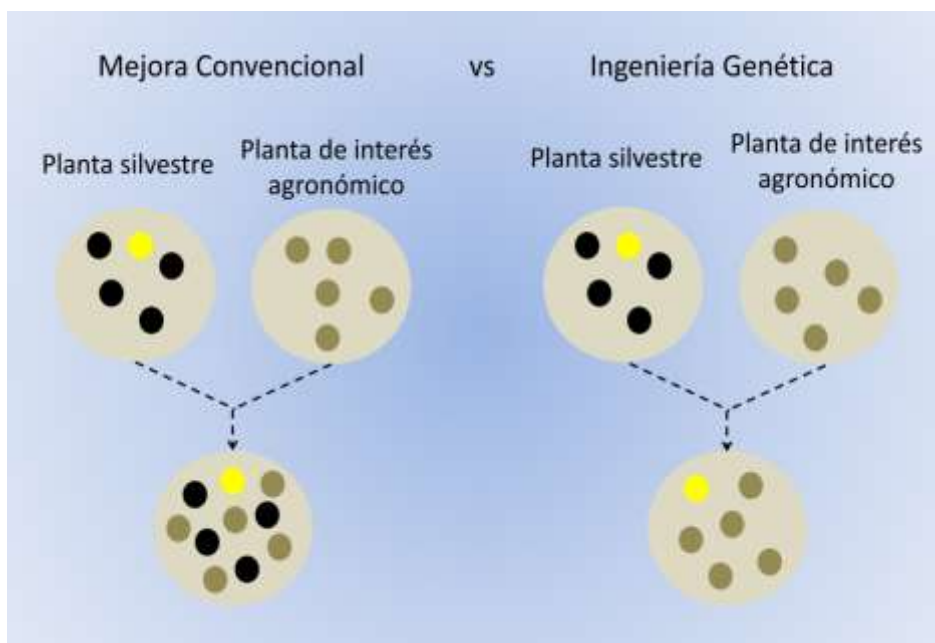
La biotecnología se define como un conjunto de herramientas que utilizan a organismos vivos, o a partes de ellos, con el propósito de generar o modificar un producto, y para mejorar plantas, animales o microorganismos para usos específicos (ISAAA, 2010). La biotecnología abarca una serie de herramientas y elementos de las técnicas convencionales de mejora genética, bioinformática, microbiología, genética y biología molecular, bioquímica y fisiología vegetal (ISAAA, 2010).

La mejora convencional de las plantas ha sido el método utilizado durante cientos de años para desarrollar nuevos cultivos con un mayor crecimiento, una producción más elevada, y proporcionarles resistencias a plagas y enfermedades. Este método tradicional consiste en seleccionar los mejores individuos de un cultivo, o en cruzar individuos con el fin de mejorarlos. Sin embargo, estas técnicas convencionales no pueden hacer frente a una presión demográfica cada vez mayor (ISAAA, 2010). La FAO estimó para el año 2050 que la población mundial alcanzaría unos nueve mil millones de habitantes, y que para alimentarla habría que incrementar la producción de alimentos en un 70% (FAO, 2009).

Con el fin de contribuir a la seguridad alimentaria y de mejorar la producción, los biotecnólogos desarrollaron varias herramientas que han permitido incorporar características de provecho a plantas de interés agronómico, ya que la mejora tradicional suele transmitir también características que no son interesantes y además es muy lenta (Figura 1.1). De estas nuevas herramientas podemos resaltar las tecnologías basadas en endonucleasas de restricción, mutagénesis dirigida, cisgénesis e intragénesis, injertos, y transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Lusser y col., 2012).

Mediante la transformación genética, que permite añadir uno o varios genes al genoma de la planta transformada, se crearon por ejemplo plantas resistentes a estreses bióticos y abióticos. Esta técnica implica por lo tanto entender la función de los genes utilizados y poder asociarlos a las características de las cuales son

responsables. En este aspecto, los avances que se han hecho en el campo de la genómica fueron de gran importancia. Los genomas de varias plantas modelo y de plantas de interés agronómico se han secuenciado (o están en proceso), de las cuales citamos como ejemplo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), *Solanum lycopersicum* cv Heinz (Tomato Genome Consortium, 2012), *Oriza sativa* L. ssp *japonica* (Goff y col., 2002), *Zea mays* ssp. *mays* L. (Schnable y col., 2009) y *Triticum aestivum* (Brenchley y col., 2012). Una aplicación de la información que proporcionan las secuencias es identificar marcadores moleculares que se puedan utilizar para mapear rápidamente rasgos agronómicamente deseables. El uso creciente del locus de un carácter cuantitativo (*quantitative trait locus*, QTL) lo demuestra, y permite asociar variaciones fenotípicas a variaciones alélicas en el genoma (Edwards y Batley, 2010).



**Figura 1.1.** Comparación entre la mejora convencional de las plantas y la mejora por ingeniería genética vegetal. Los puntos amarillos y marrones indican características deseables, mientras que los puntos negros indican características no deseables. Modificado de ISAAA (2010).



A parte de ser importante para la seguridad alimentaria, la investigación vegetal puede permitir también la identificación de compuestos que beneficiarán a la salud y disminuirán el riesgo de enfermedades crónicas (Martin y col., 2011). Por ejemplo el Golden Rice-2 que acumula hasta 37  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno por gramo de arroz podría ser una solución a la deficiencia en vitamina A en poblaciones cuya dieta se basa esencialmente en su consumo. Otro ejemplo es la producción de vacunas, anticuerpos y proteínas terapéuticas en plantas (Lusser y col., 2012).

A pesar de que la biotecnología vegetal ha tenido un gran desarrollo en las últimas décadas, los organismos modificados genéticamente son materia de debate en cuanto a sus riesgos para la salud humana y el medio ambiente, y son objeto de una legislación muy rigurosa, particularmente en Europa (Kuzma y Kokotovich, 2011).

## 1.2 LA PLANTA MODELO *ARABIDOPSIS THALIANA*

*Arabidopsis thaliana* es una planta de la familia de las crucíferas que se ha convertido en el modelo de estudio en la biología de las plantas vasculares, y hasta la fecha esta especie ha sido la más estudiada en el campo vegetal (Koornneef y Meinke, 2010). Algunos investigadores observaron que esta angiosperma podría ser un modelo no solo para la biología vegetal, sino también para el estudio de los eucariotas en general (Meinke y col., 1998), y solo durante 2008, más de 3500 publicaciones estaban relacionadas con ella (Koornneef y Meinke, 2010).

Los Doctores Laibach (en Europa) y Redei (en Estados Unidos) fueron algunos de los investigadores pioneros en el uso de *Arabidopsis*. Meyerowitz comenta que Laibach en 1943 propuso a esta especie como organismo modelo basándose en su corto ciclo reproductivo, la facilidad de realizar cruces entre plantas y la posibilidad de realizar mutaciones (Meyerowitz, 2001). Otros autores indican que en 1964 también se la conocía como la *Drosophila* de los botánicos (Koornneef y Meinke, 2010).

La era moderna en la investigación sobre esta especie empezó en 1987 con la tercera conferencia internacional sobre *Arabidopsis* y la creación de un grupo

electrónico de noticias sobre ella. Una de las ideas de partida sobre su uso como planta modelo fue facilitar la identificación de genes de interés agronómico (Meinke y col., 1998). Además de las características indicadas, otras ventajas son su pequeño tamaño, un gran número de semillas, un genoma relativamente pequeño compuesto de cinco cromosomas ya secuenciados, muchos ecotipos, y la facilidad para aislar mutantes y obtener plantas transgénicas (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Koornneef y Meinke, 2010).

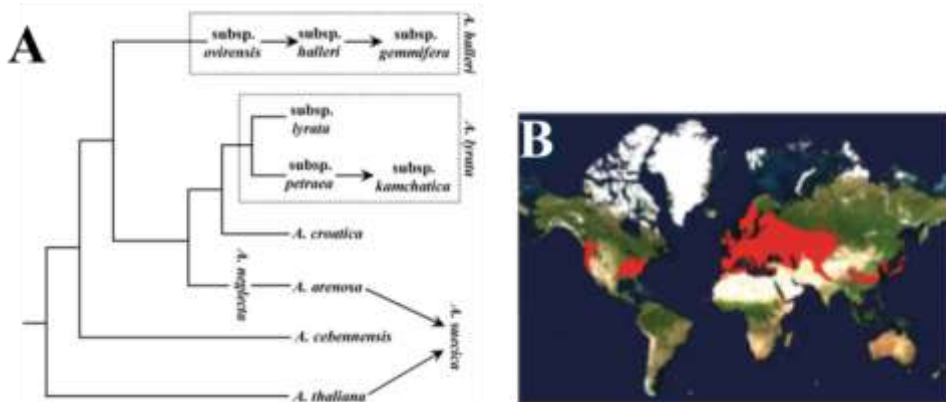
### 1.2.1 Biología de *A. thaliana*

En la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>), podemos encontrar el linaje completo de esta especie: Organismos celulares/ Eucariontes/ Viridiplantae/ Estreptofita/ Streptofitina/ Embriofitos/ Tracheófitas/ Eufilofitas/ Espermatofitas/ Angiospermae/ Mesangiospermae/ Eudicotas/ Gunneridae/ Pentapetalae/ rósidas/ málvidas/ Brassicales/ Brassicaceae/ Camelinae/ Arabidopsis/

El género *Arabidopsis* está compuesto por nueve especies y 8 sub-especies: *A. thaliana*, *A. suecica*, *A. arenosa* (subsp. *arenosa*, subsp. *borbasii*), *A. neglecta*, *A. croatica*, *A. cebennensis*, *A. pedemontana*, *A. lyrata* (subsp. *lyrata*, subsp. *petraea*, subsp. *kamchatica*), y *A. halleri* (subsp. *halleri*, subsp. *ovirensis*, subsp. *gemmaifera*) (Figura 1.2). Estas especies y subespecies están distribuidas principalmente en Europa, con dos de ellas extendiéndose por el norte y este de Asia, y una localizada en Norteamérica (Figura 1.2). De entre estas especies en la actualidad *A. thaliana* tiene una distribución mundial (Al-Shehbaz y O'Kane, 2002).

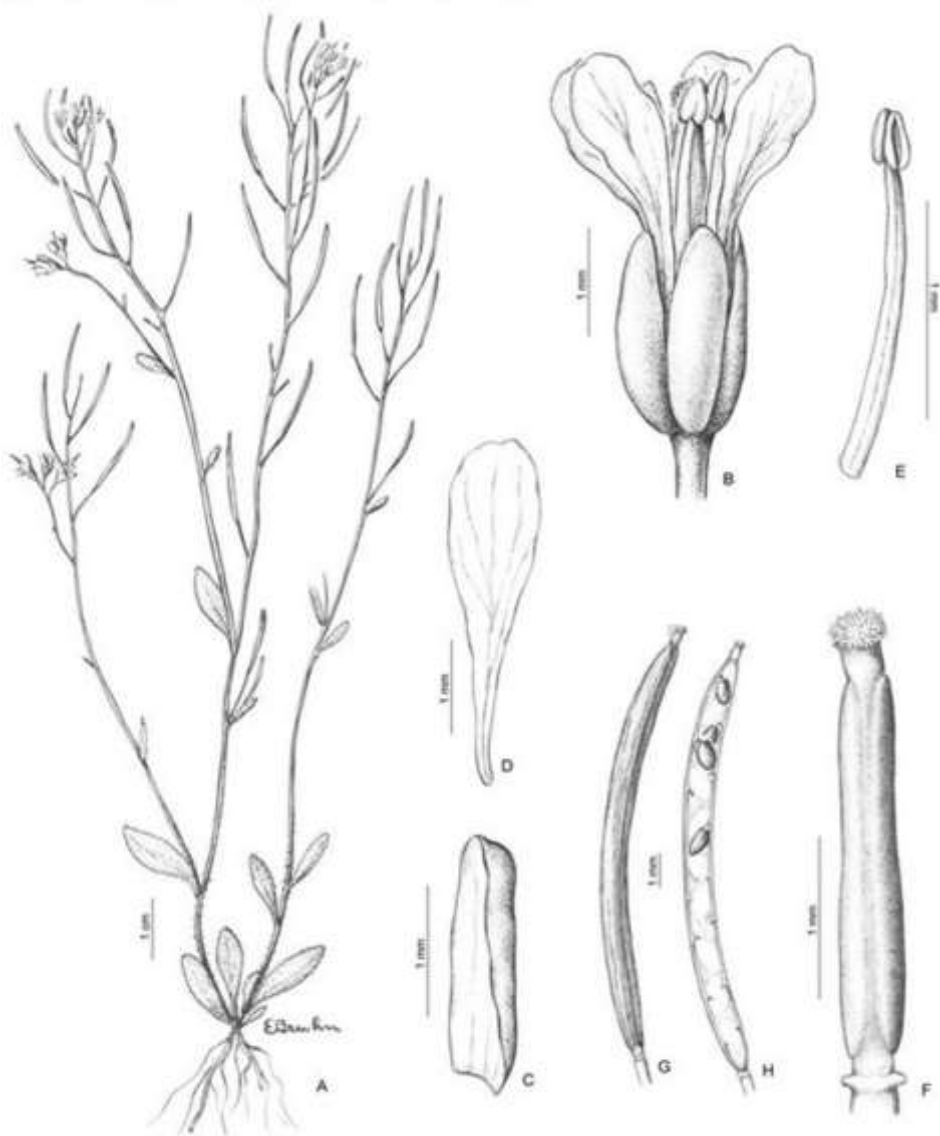
La floración y fructificación de *Arabidopsis thaliana* en la naturaleza se sitúa desde enero a junio, pudiendo llegar a octubre. Esta especie es una hierba anual que puede alcanzar los 60 cm. Uno o varios tallos se erigen rectos a partir de la tercera semana desde la base, y pueden ser ramificados, basalmente pilosos con tricomas en su mayoría individuales, y apicalmente glabros. Las hojas basales con peciolo

cortos son pecioladas y rosuladas; las láminas de las hojas son obovadas, espatuladas, ovadas o elípticas; la hoja tiene en su superficie adaxial tricomas simples y bifurcados y es de margen entero, ondulado, serrulado o dentado, con un ápice obtuso. Las generalmente pocas hojas caulinares son subsésiles o sésiles; sus láminas son lanceoladas, lineares, oblongas o elípticas, con un margen entero o raramente escasamente dentado, y con un ápice agudo a obtuso. Los pedicelos fructíferos son delgados, divaricados, rectos, de 3 a 15 mm de largo. Los sépalos son glabros o escasamente pubescentes, con tricomas simples en la porción distal. Los pétalos son blancos, espatulados, con un ápice obtuso y una base que se atenúa en una corta garra. Los filamentos son blancos y de 1,5 a 2 mm de largo. Cada ovario contiene entre 40 y 70 óvulos. La autopolinización se produce en cuanto se abren las flores. Las silicuas (los frutos) son lineares, teretes, lisas, de 0,8 a 2 cm de largo; las valvas tienen un nervio central conspicuo; el estilo mide 0,5 mm de largo. Las semillas son elipsoides, regordetas, de color marrón claro a marrón rojizo y de 0,3 a 0,5 mm de largo. Los cotiledones son incumbentes (Figura 1.3) (Meinke y col., 1998; Al-Shehbaz y O'Kane, 2002).



**Figura 1.2.** Relaciones filogenéticas en el género *Arabidopsis* (A) y zona de distribución geográfica de sus especies (B). Extraído de Al-Shehbaz y O'Kane (2002) y Koornneef y colaboradores (2011).

Existen varias accesiones de *A. thaliana* (o ecotipos) y entre ellas Landsberg erecta (Ler), Columbia (Col) y Wassilewskija (Ws) son las más comúnmente utilizadas en investigación (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000).



**Figura 1.3.** Descripción de *A. thaliana*. A: Planta; B: Flor; C: Sépalo; D: Pétalo; E: Estambre; F: Gineceo; G: Silicua; H: Corte longitudinal de una silicua. (<http://www.floraargentina.edu.ar/>).

### 1.2.2 Genética de Arabidopsis

En su totalidad, el genoma de Arabidopsis está repartido entre el núcleo, los plastos y las mitocondrias, los cuales difieren significativamente en la cantidad de genes, la organización y la estabilidad. El genoma nuclear, como se ha comentado, está formado por 5 cromosomas, tiene un tamaño de 115 Mb, y está compuesto de aproximadamente 26000 genes (Borevitz y Ecker, 2004). Los genes de los plastos codifican principalmente subunidades de los fotosistemas y de la cadena de transporte de electrones, mientras los genes de las mitocondrias codifican subunidades de la cadena respiratoria. Ambos orgánulos codifican proteínas específicas de sus membranas, así como proteínas constitutivas (Tabla 1.1). El primer genoma metilado secuenciado fue el de esta planta, y esto tuvo una gran importancia para el estudio de la herencia epigenética y la regulación génica (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

**Tabla 1.1.** Características generales de los tres genomas de Arabidopsis. nt, nucleótido. Extraído de Arabidopsis Genome Initiative (2000).

	Núcleo	Plasto	Mitocondria
Tamaño del genoma	115 Mb	154 kb	367 kb
Duplicación	60%	17%	10%
Cantidad de proteínas/genes	25498	79	58
Tamaño medio de la secuencia codificante	1900 nt	900 nt	860 nt
Genes con intrones	79%	18,4%	12%
Genes/Pseudogenes	1/0,03	1/0	1/0,2-0,5

La mayoría de las técnicas y el material necesario para el estudio de esta especie ha sido desarrollado por *Arabidopsis Research community*. Eso incluye una gran colección de mutantes con fenotipos que a lo largo del tiempo ha permitido identificar miles de mutantes deficientes en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta (Meinke y col., 1998).

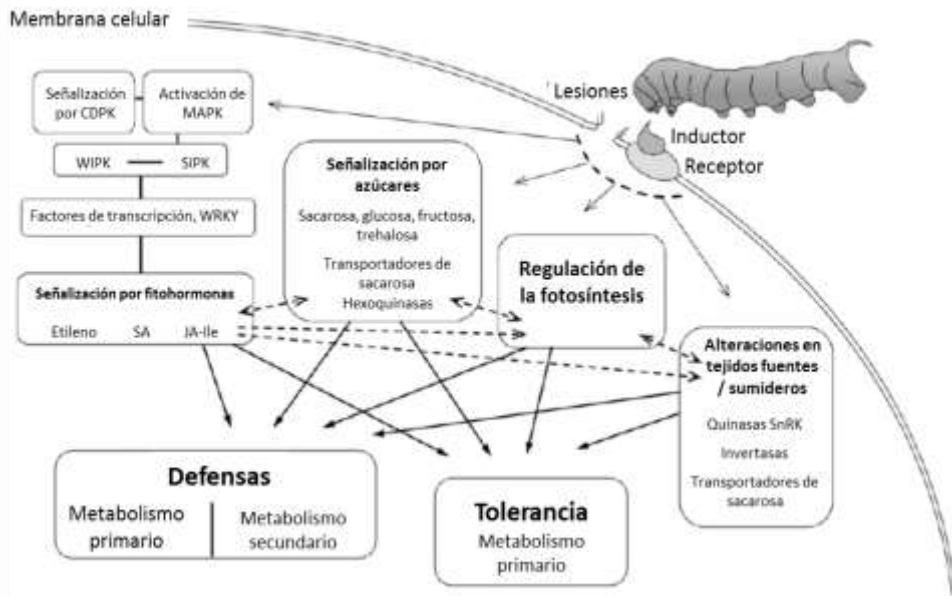
Arabidopsis no solo se ha convertido en un organismo modelo para entender la función y la estructura de las plantas, sino también permite el planteamiento de

preguntas más universales acerca de la naturaleza y del origen de la complejidad biológica.

### **1.3 IMPORTANCIA AGRONÓMICA DEL METABOLISMO PRIMARIO Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de una célula y que incluyen una gran cantidad de conversiones moleculares (Karp, 2005). De este concepto emergen el metabolismo primario, que interviene de forma directa en la supervivencia, y el metabolismo secundario, cuya ausencia no es tan perjudicial para la planta. Pichersky y Lewinsohn (2011) estiman que en *Arabidopsis* el número de metabolitos primarios es de 8000 aproximadamente; estos incluyen los carbohidratos, los aminoácidos, los nucleótidos y los acilglicéridos. Los procesos implicados en el metabolismo primario son la fotosíntesis, la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la síntesis de aminoácidos, la transcripción, la síntesis de proteínas y enzimas, la síntesis de coenzimas y de materiales estructurales, la duplicación del material genético, el crecimiento y la absorción de nutrientes.

El metabolismo primario no solo permite la supervivencia de las plantas, sino que también está implicado en otros mecanismos, como la señalización celular o la defensa de las plantas frente a ataques. Por ejemplo, Schwachtje y Baldwin (2008) destacaron el papel del metabolismo primario en la respuesta al ataque por herbívoros; dichos metabolitos primarios actuarían como moléculas señalizadoras, o bien, los mismos cambios en los metabolitos servirían como mecanismos de defensa (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Cambios en el metabolismo primario y secundario que permiten la respuesta de defensa y la tolerancia en las plantas. La respuesta de las plantas a un ataque o a una lesión implica una red compleja de interacciones que siguen sin dilucidarse en donde participan los metabolitos primarios. CDPK, MAPK, WIPK y SIPK hacen referencia a proteínas quinasas; SA: ácido salicílico; JA-Ile: jasmonato conjugado a isoleucina. Modificado de Schwachtje y Baldwin (2008).

Bolton (2009) resaltó también la implicación del metabolismo primario en la defensa de las plantas, y postuló que en una misma planta la fotosíntesis disminuía en las hojas infectadas y aumentaba en las hojas sanas. Este autor indicó que la reducción de la fotosíntesis permitiría reducir los recursos disponibles para el microorganismo patógeno, aunque no descartó que esta reducción también pudiera ser una consecuencia de los daños oxidativos. También postuló que, puesto que la defensa de las plantas es un proceso costoso en energía, el aumento de la fotosíntesis permitiría aumentar en los tejidos sanos los niveles de carbohidratos necesarios para hacer frente al ataque.

Una forma de aumentar los niveles de carbohidratos en plantas sería aumentando la actividad fotosintética, y esto podría hacerse regulando la actividad

de la RuBisCO. Esta enzima tiene actividad carboxilasa que permite fijar el CO<sub>2</sub>, pero también actividad oxigenasa que permite fijar el O<sub>2</sub> (esta segunda propiedad es responsable de la fotorrespiración). En condiciones fotorrespiratorias, ambas actividades (carboxilasa y oxigenasa) compiten. Si por ingeniería genética se consiguiera reducir la actividad oxigenasa (como ocurre en condiciones no fotorrespiratorias), la fijación de CO<sub>2</sub> aumentaría y en consecuencia de forma teórica la producción de biomasa. Sin embargo, experimentalmente una disminución de la fotorrespiración no va asociada a un aumento de la producción vegetal, por lo que Stitt (2013) postula que existen varios factores limitantes en el aumento de la producción de biomasa. De hecho, aunque la fotosíntesis determina la biomasa de las plantas, la distribución de los asimilados en los tejidos no fotosintéticos determina el rendimiento de las plantas (Ruan, 2014). Aumentar la relación carboxilación/oxigenación de la RUBISCO también podría permitir a las plantas sobrevivir en condiciones de sequía, ya que permitiría mantener los estomas cerrados más tiempo reduciendo así las pérdidas de agua por transpiración.

Como hemos mencionado anteriormente, el metabolismo de los carbohidratos ha sido una diana para la mejora de las plantas por ingeniería genética. La sacarosa es uno de los mayores carbohidratos producidos durante la fotosíntesis, y este azúcar se transloca de los tejidos fotosintéticos al floema para alcanzar los tejidos que no realizan la fotosíntesis. Su metabolización por la sacarosa sintasa (SuSy) produce la UDP-glucosa y la fructosa que son necesarias para el metabolismo y desarrollo vegetal. Por ello, SuSy está implicada en el crecimiento y el mantenimiento de los tejidos vegetales. Su sobreexpresión permite una mayor expansión de las hojas jóvenes, mejora el desarrollo temprano de las semillas y disminuye su tasa de aborto, y promueve el alargamiento de las fibras en el algodón (Xu y col., 2012).

Sin embargo, algunos intentos de mejorar las plantas se vieron limitados por los efectos negativos de los cambios provocados en ellas. Por ejemplo, intentos por inducir una sobre-acumulación de aminoácidos en semillas en desarrollo se vieron



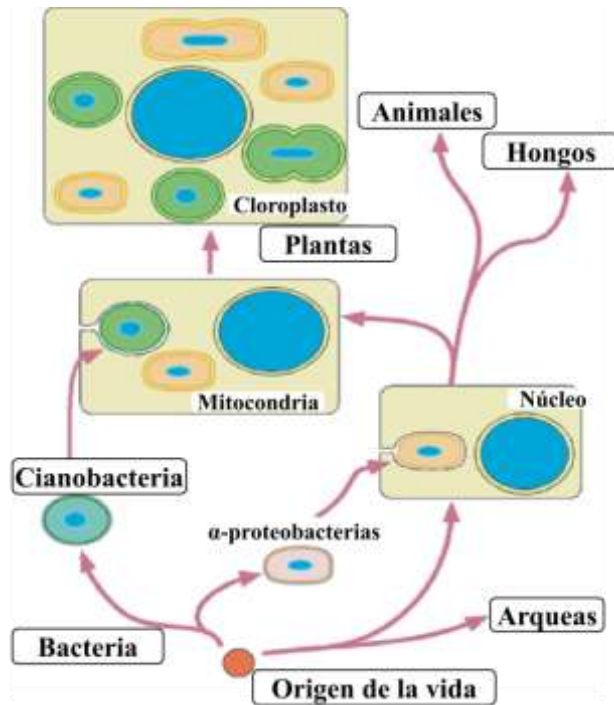
limitados por la inducción de la degradación de los mismos. En otro caso, se intentó aumentar la cantidad de almidón mediante la introducción de la invertasa, sola o con la glucoquinasa, pero lo que se consiguió fue una mayor glicólisis junto con una disminución de la síntesis de almidón en las plantas transgénicas (Trethewey y col., 1998).

Frente a esta problemática en la mejora de las plantas, Ruan (2014) propuso un enfoque sinérgico piramidal de los genes expresados mediante ingeniería genética, para de esta forma maximizar las ventajas y reducir los inconvenientes de los cambios efectuados en las plantas. Este enfoque consistiría en modificar no solo uno, sino varios genes de una misma ruta metabólica con el fin de contrarrestar los efectos adversos de un único cambio.

#### **1.4 EL PLASTO Y EL METABOLISMO PRIMARIO**

Los plastos son un grupo muy diverso de orgánulos eucariotas que juegan un papel central en el metabolismo de las plantas a través de la fotosíntesis, la síntesis de aminoácidos y de lípidos, la asimilación del nitrógeno y del azufre, y la síntesis de cofactores de las enzimas y de factores de regulación (Wise, 2006; Osteryoung y Weber, 2011). Su origen es un misterio a pesar de que están relacionados filogenética, ontogénica y fisiológicamente. No obstante, está claro que se originaron por la adquisición por parte de una célula eucariota de una célula procariota fotosintética (Figura 1.5) (Gunning y col., 2006; Wise, 2006).

Los plastos son semiautónomos y se encuentran en casi todas las células de las plantas y de las algas. Tienen un genoma pequeño formado por un DNA circular con un número de genes muy reducido, ya que se han ido trasladando al genoma nuclear a lo largo de la evolución (Hooper, 2006). A pesar de ello, estos genes codifican aproximadamente 100 de las 2500 proteínas que los componen (Wise, 2006).



**Figura 1.5.** Origen evolutivo de los plastos y las mitocondrias. Las mitocondrias y los plastos son los descendientes de una serie de eventos endosimbióticos. Las mitocondrias aparecieron primero de un ancestro  $\alpha$ -proteobacteria, el cual fue incorporado a un eucariota primitivo que evolucionó de una arqueobacteria. Los plastos aparecieron más tarde a partir de una cianobacteria fotosintética adquirida por un eucariota en el cual las mitocondrias estaban ya introducidas (Modificado de Gunning y col., 2006).

Los diferentes plastos que nos encontramos en una planta suelen derivar de un proplasto, que se puede diferenciar a etioplasto, cromoplasto, cloroplasto, leucoplasto, amiloplasto, oleoplasto o proteinoplasto (Wise, 2006). Además, los plastos diferenciados pueden reconvertirse en otros tipos de plastos en función de su entorno y de determinadas señales moleculares (Pyke, 2008).

Varios de los productos sintetizados por los plastos son metabolizados en otros compartimentos celulares y a su vez, el metabolismo del plasto depende de los precursores suministrados por el citoplasma. En consecuencia, el funcionamiento de la célula vegetal se basa en una compleja red metabólica que

entrelaza las reacciones en los plastos con las reacciones en los compartimentos extra-plastidiales a través de un intercambio de metabolitos. La membrana plastidial representa una interfaz entre ambos compartimentos y contiene numerosas proteínas que median el flujo de metabolitos y de iones a través de ella (Weber y col., 2005). Por ejemplo, la mayoría de las enzimas y reacciones enzimáticas implicadas en la síntesis de aminoácidos esenciales se encuentra en los plastos, y luego esos aminoácidos pueden ser transportados al citoplasma para generar proteínas (Lancien y Lea, 2006).

En la gran familia de los plastos, los cloroplastos de las algas verdes y de las plantas son los que más se han estudiado, ya que su capacidad para realizar la fotosíntesis permitió la aparición de la vida en el planeta Tierra (Hooper, 2006).

La luz es la fuente primaria de energía para el metabolismo de los cloroplastos. Durante el día, los cloroplastos captan la energía solar a través de la maquinaria fotosintética para producir ATP y los equivalentes reductores, NADH y NADPH. Estos últimos son necesarios para la reducción del dióxido de carbono en azúcares, los cuales son utilizados en el metabolismo celular como fuente de energía y como monómeros de grandes macromoléculas. Sin embargo, durante la noche el metabolismo del cloroplasto depende de la energía almacenada. Así, a través de procesos catabólicos los productos de almacenamiento como el almidón, que se acumularon durante el día, se descomponen para proporcionar la energía necesaria para el correcto funcionamiento de las células (Dai, 2006).

Osteryoung y Weber (2011) opinan que uno de los mayores desafíos de la investigación en la biología de los plastos sería entender los procesos mecánicos y de regulación que rigen su desarrollo, morfología, dinámica y función, y como las actividades de los plastos se integran de manera más amplia en el desarrollo, el metabolismo, y las respuestas de la planta al entorno.

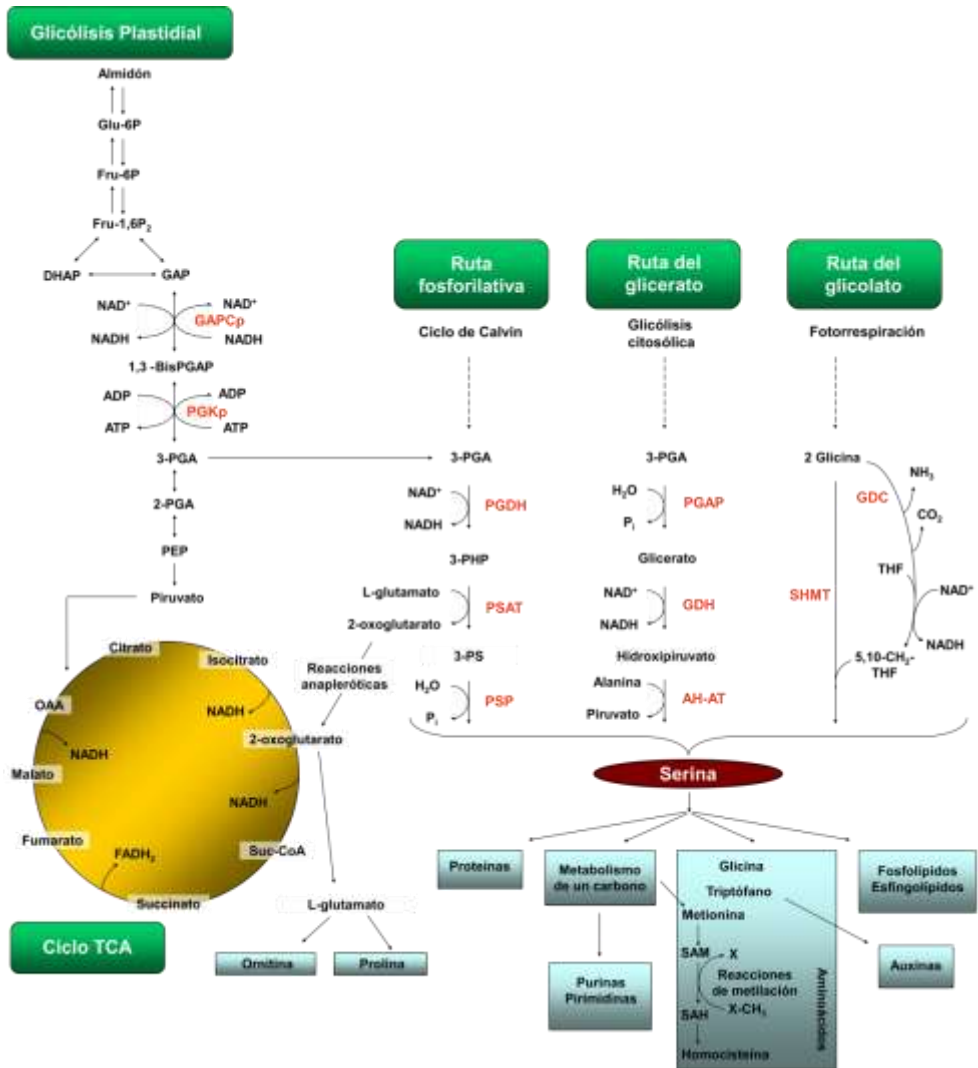
Varios equipos de investigación han estudiado el plasto a través de su metabolismo. Así, Baud y colaboradores (2007) destacaron el papel del

metabolismo plastidial estudiando la función de la piruvato quinasa (PK) plastidial y su estrecho control en semillas de *Arabidopsis*.

Chen y Thelen (2010) demostraron el papel crucial de la triosa fosfato isomerasa plastidial (pdTPI) de *Arabidopsis* en la transición de tejidos heterótrofos a autótrofos y su responsabilidad en el funcionamiento normal de los cloroplastos. Prabhakar y colaboradores (2010) demostraron que el fosfoenol piruvato (PEP) plastidial era esencial para la fertilidad masculina y femenina, y también esencial para el desarrollo normal de las semillas y de las plantas de *Arabidopsis*.

Durante los últimos años, en nuestro equipo de investigación estamos estudiando el metabolismo plastidial a través de dos enzimas glicolíticas [la gliceraldehído-3-fosfato (GAP) deshidrogenasa (GAPDH) y la fosfoglicerato quinasa (PGK)] y dos enzimas de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina [RFBS; la fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH) y la 3-fosfoserina fosfatasa (PSP)]. Para evitar confusiones con la nomenclatura de los genes y proteínas de esta ruta, durante esta tesis doctoral vamos a hacer referencia a los nombres de las enzimas de la RFBS propuestos por Ros y colaboradores (2014).

Los trabajos publicados por nuestro grupo han demostrado el papel crucial de la GAPDH plastidial de *Arabidopsis* en el desarrollo vegetativo de las plantas y de los órganos reproductores, y también en la señalización de fitohormonas, destacando así la contribución de las enzimas plastidiales al metabolismo primario (Muñoz-Bertomeu y col., 2009, 2010a, 2010b, 2011a, 2011b). También hemos demostrado las conexiones esenciales que existen entre la ruta glicolítica plastidial y la RFBS para proporcionar serina a determinados tipos celulares (Toujani y col., 2013; Cascales-Miñana y col., 2013). En plantas se había postulado que la principal ruta de biosíntesis de serina era la ruta del glicolato, asociada a la fotorrespiración (Figura 1.6). Nuestro grupo caracterizó funcionalmente por primera vez en plantas la RFBS y ha proporcionado evidencias genéticas y moleculares del papel de la PGDH y de la PSP en el crecimiento de las raíces, en el desarrollo del embrión y del polen de *Arabidopsis*.



**Figura 1.6.** Representación esquemática de la biosíntesis de serina en las plantas y rutas metabólicas. Las enzimas están en rojo. Abreviaturas: GAPCp, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PGKp, fosfoglicerato quinasa; PGDH, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa; PSAT, 3-fosfoserina aminotransferasa; PSP, 3-fosfoserina fosfatasa; PGAP, 3-fosfoglicerato fosfatasa; GDH, glicerato deshidrogenasa; AH-AT, alanina-hidroxipiruvato aminotransferasa; GDC, glicina descarboxilasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Fru-1,6P<sub>2</sub>, fructosa-1,6-bifosfato; Fru-6P, fructosa-6-fosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; Glu-6P, glucosa-6-fosfato; OAA, oxaloacetato; PEP, fosfoenolpiruvato; SAH, S-adenosilhomocisteína; SAM, S-adenosilmetionina; Suc-CoA, succinil Coenzima A; TCA, ácido tricarbóxico; THF, tetrahidrofolato; 1,3-BisPGAP, 1,3-bisfosfoglicerato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 3-PHP, 3-fosfohidroxipiruvato; 3-PS, 3-fosfoserina; 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, 5,10-metileno-tetrahidrofolato. Las flechas no continuas indican varias reacciones enzimáticas. Modificado de Ros y colaboradores (2014).

## 1.5 LA GLICÓLISIS EN LAS PLANTAS

### 1.5.1 Descripción

La respiración aerobia se encuentra en todos los organismos eucariotas, y a grandes rasgos, la respiración en las plantas superiores es similar a la que se encuentra en los animales y en los eucariotas inferiores (Taiz y Zeiger, 1991). La respiración se basa en procesos de óxido-reducción en los que algunos compuestos se oxidan a  $\text{CO}_2$ , y el  $\text{O}_2$  que se utiliza se reduce para formar  $\text{H}_2\text{O}$  (Salisbury y Ross, 1994). Estos compuestos son la glucosa, el almidón, la sacarosa y otros azúcares, los lípidos, los ácidos orgánicos e incluso las proteínas (Taiz y Zeiger, 1991). La respiración se realiza en varias reacciones que se pueden dividir en 3 fases: la glicólisis, el ciclo TCA y la cadena de transportes de electrones (Taiz y Zeiger, 1991).

La glicólisis es un proceso que ocurre en todos los organismos vivos (procariontes y eucariotas). Desde el punto de vista de la evolución, es la más antigua de las tres fases de la respiración y su papel fundamental es oxidar las hexosas para generar ATP, poder reductor, piruvato, y producir precursores para el anabolismo (Plaxton, 1996). Nueve reacciones enzimáticas constituyen la glicólisis, la cual puede dividirse en 2 fases: durante la primera, la glucosa-6-fosfato (Glu-6P) se convierte en GAP; durante la segunda el GAP se convierte en piruvato (Janniere y col., 2007). Las enzimas de esta ruta también pueden funcionar al revés, es decir generan hexosas a partir de compuestos de menor peso molecular (a este proceso se le llama gluconeogénesis; Plaxton, 1996).

Además de ser un proceso dedicado exclusivamente a la producción de ATP, la glicólisis también juega un papel de gran importancia en la transformación de los azúcares en metabolitos, que pueden ser incorporados a una gran variedad de productos biosintéticos (Curtis, 1999).

En plantas, la glicólisis se produce de forma independiente tanto en el citosol como en los plastos. Sin embargo, la glicólisis citosólica y la glicólisis plastidial interactúan a través de transportadores altamente selectivos presentes en la

membrana plastidial (Plaxton, 1996; Curtis, 1999; Weber, 2004). No obstante no se conoce con exactitud cuál es el grado de integración entre las dos rutas, cuál su función específica ni si los intermediarios glicolíticos están o no en equilibrio entre los dos compartimentos celulares.

Las enzimas glicolíticas plastidiales se sintetizan en el citosol, donde están inactivas, y se transfieren al plasto gracias a su péptido señal N-terminal (Plaxton, 1996). Giegé y colaboradores (2003) demostraron que las enzimas de la glicólisis están presentes también en la membrana externa de las mitocondrias, donde podrían proporcionarle piruvato o regular algunas funciones.

### **1.5.2 Funciones de las enzimas glicolíticas**

Las enzimas glicolíticas citosólicas y plastidiales podrían tener su origen en la duplicación de un gen nuclear ancestral, aunque también se acepta que los genes que codifican para las enzimas plastidiales podrían haberse copiado del genoma plastidial al genoma nuclear (Plaxton, 1996).

Las enzimas glicolíticas no son solo componentes de la ruta glicolítica como se creía, sino que más bien son proteínas complejas y multifuncionales (Kim y Dang, 2005). El papel de estas enzimas en otros procesos metabólicos se ha investigado en las últimas décadas, y en la actualidad es un objeto importante de estudio.

Entre otros procesos, las enzimas glicolíticas están implicadas en la regulación transcripcional [hexoquinasa (HK), lactato deshidrogenasa (LDH), GAPDH y enolasa (ENO1)], la apoptosis (HK y GAPDH) y la movilidad celular [Glu-6-P isomerasa (GPI)] (Kim y Dang, 2005). Zhao y Assmann (2011) demostraron en *Arabidopsis* la implicación de las enzimas glicolíticas en los movimientos del estoma, el crecimiento vegetativo y la fertilidad. Además, Barkla y colaboradores (2009) han indicado que las enzimas glicolíticas permiten que *Arabidopsis* sea tolerante al estrés salino.

La PK plastidial está implicada en la maduración de las semillas, en la biosíntesis de ácidos grasos (Andre y col., 2007; Baud y col., 2007) y en el desarrollo del embrión (Baud y col., 2007). En concreto, una mutación en el gen que codifica la subunidad  $\beta 1$  de esta enzima provoca una reducción del 60% en el contenido de aceite en las semillas de *Arabidopsis* (Andre y col., 2007). A parte de resaltar el papel fundamental de la PK plastidial, los resultados de estos autores corroboran los estudios realizados por Focks y Benning (1998) que demostraron que el mutante *wrinkled1* de *Arabidopsis*, que tiene una reducción general de la glicólisis, tiene también una reducción de un 80% del contenido en aceite de las semillas. Esto se debe a que el factor de transcripción WRINKLED1 regula esta enzima (Baud y col., 2009).

Se ha descrito que tanto en plantas como en animales la enzima ENO1 actuaría como un represor transcripcional (Kim y Dang, 2005).

El mutante doble *ipgam* de la fosfogliceratomutasa (PGAM) de *Arabidopsis* presenta unos fenotipos de retraso severo en el crecimiento y unas hojas pálidas y reticuladas que se asocian con una alteración del metabolismo de los aminoácidos aromáticos (Zhao y Assmann, 2011). Estos autores sugieren también que la glicólisis es necesaria para el desarrollo del polen, dado que el mutante doble presenta esterilidad masculina debido a que no produce polen. Este trabajo además demuestra el papel crucial de las enzimas glicolíticas en la función de las células guarda del estoma en respuesta a señales del entorno.

En *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que existe un fuerte vínculo entre la glicólisis y la replicación del DNA (Janniére y col., 2007).

Con todos estos resultados, se puede ver que además de su función en la obtención de energía, la contribución de la glicólisis al metabolismo fundamental resulta ser crucial para la vida.



## 1.6 LA GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA

Como ya se ha comentado anteriormente, una de las enzimas implicadas en la glicólisis es la GAPDH, que fue identificada por primera vez en extractos de guisante (Curtis, 1999) y desde entonces su caracterización ha sido objeto de diferentes estudios.

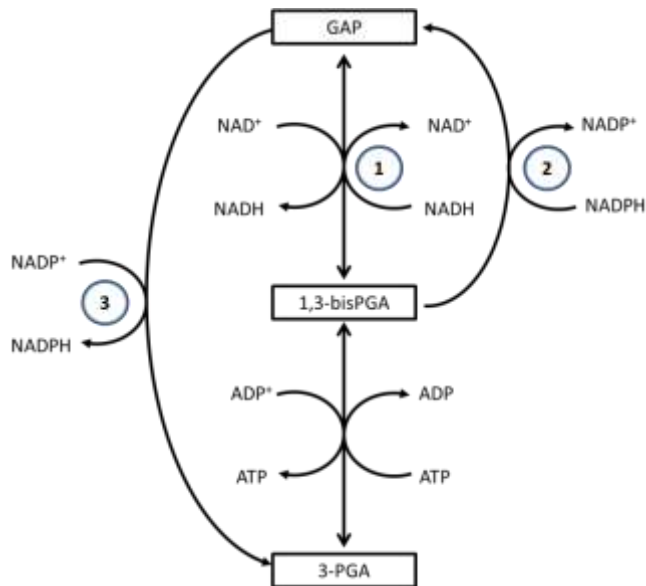
*Arabidopsis* posee siete isoformas fosforilativas de la GAPDH, de las cuales cinco son plastidiales y dos son citosólicas (Muñoz-Bertomeu y col., 2009; Guo y col., 2012). Las isoformas plastidiales GAPA1, GAPA2 y GAPB catalizan la transformación del 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-bisPGA) en GAP y utilizan al NADP<sup>+</sup>/NADPH como poder reductor. Estas isoformas están implicadas en la fososíntesis, concretamente en la fase reductiva del ciclo de Calvin. Las isoformas plastidiales GAPCp1 y GAPCp2 catalizan la transformación del GAP en 1,3-bisPGA en una reacción reversible y utilizan al NAD<sup>+</sup>/NADH como poder reductor. Estas dos isoformas, junto con las isoformas citosólicas, están implicadas en la glicólisis. Las isoformas citosólicas GAPC1 y GAPC2 catalizan de forma reversible la transformación del GAP en 1,3-bisPGA y utilizan al NAD<sup>+</sup>/NADH como poder reductor (Meyer-Gauen y col., 1994). Los genes que codifican las GAPDH citosólicas y plastidiales tienen unos niveles de expresión que difieren en *Arabidopsis* (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Niveles de expresión en *Arabidopsis thaliana* de los genes que codifican las distintas isoformas de la GAPDH. Modificado de Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009).

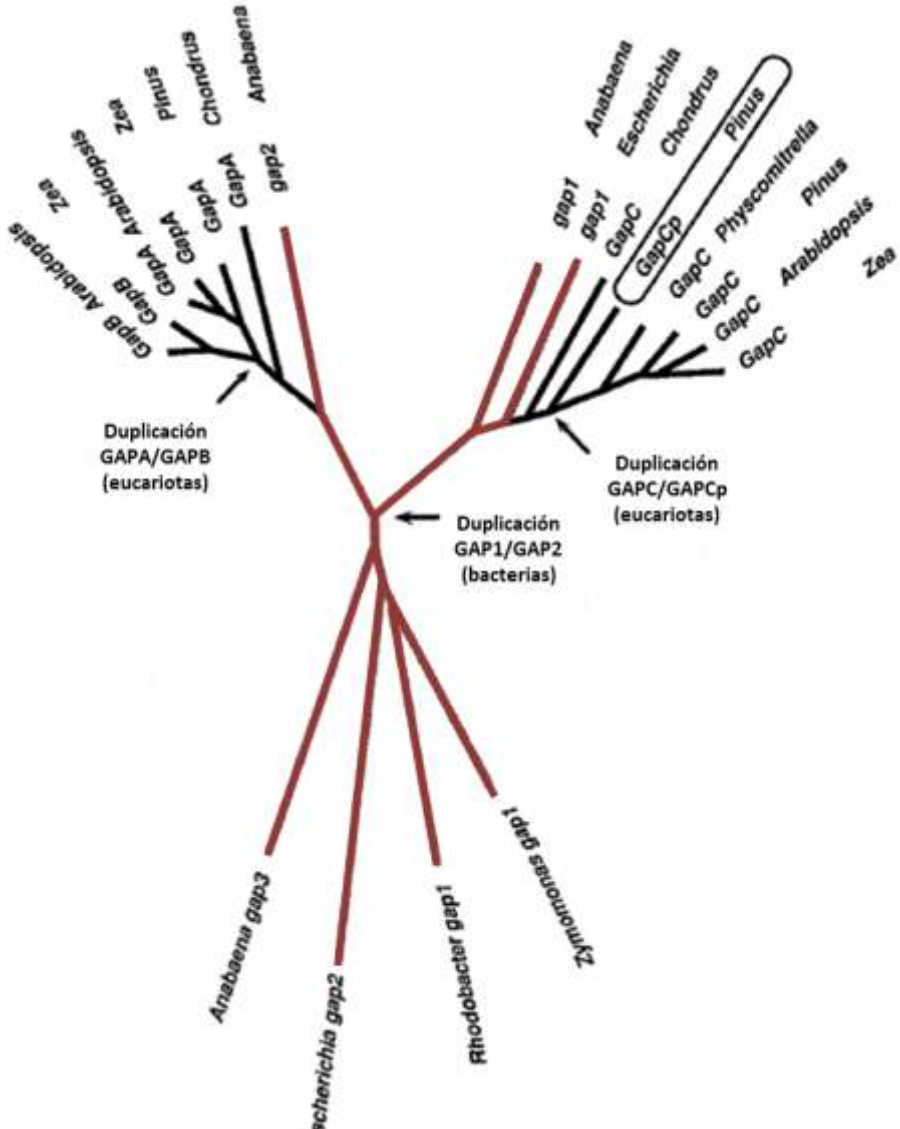
Gen	Expresión Génica
At3g26650 ( <i>GAPA1</i> )	8423 ± 729
At1g12900 ( <i>GAPA2</i> )	6616 ± 291
At1g42970 ( <i>GAPB</i> )	6860 ± 181
At3g04120 ( <i>GAPC1</i> )	3892 ± 154
At1g13440 ( <i>GAPC2</i> )	5903 ± 228
At1g79530 ( <i>GAPCp1</i> )	208 ± 15
At1g16300 ( <i>GAPCp2</i> )	

A parte de estas siete isoformas que presentan una actividad fosforilativa, en *Arabidopsis* y en otras angiospermas existe también una enzima con actividad GAPDH que es citosólica y no fosforilativa, la aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Habenicht y col., 1994; Plaxton, 1996; Guo y col., 2012). Esta enzima no tiene una homología de secuencia con las GAPDH fosforilativas y cataliza la conversión del GAP en 3-fosfoglicerato (3-PGA) acoplado a la reducción de  $\text{NADP}^+$  a NADPH (Figura 1.7) (Habenicht y col., 1994).

Los genes *GAPCp* y *GAPC* provienen de una duplicación de un gen *GAPDH* ancestral en la evolución de las plantas, de igual forma que la duplicación de los genes *GAPA* y *GAPB* (Figura 1.8) (Meyer-Gauen y col., 1994).



**Figura 1.7.** Actividades gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en plantas. Los números representan las siguientes enzimas: 1: GAPDH glicolíticas; 2: GAPDH del ciclo de Calvin; 3: Aldehído deshidrogenasa. Abreviaturas: GAP: gliceraldehído-3-fosfato; 1,3-bisPGA: 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato.



**Figura 1.8.** Árbol filogenético de GAPDH. Las ramas de color marrón y de color negro representan respectivamente a genes contenidos en cromosomas procariotas y eucariotas (Meyer-Gauen y col., 1994).

### 1.6.1 La GAPDH citosólica

Las GAPDH citosólicas (GAPC1 y GAPC2) son homotetrámeros de 4 subunidades idénticas, y los genes que las codifican pueden estar expresados de forma constitutiva o en respuesta al entorno (Meyer-Gauen y col., 1994).

Hajirezaei y colaboradores (2006) observaron que una disminución del 90% de la actividad de la GAPDH citosólica no se tradujo en cambios fenotípicos en la patata. Estos autores concluyeron entonces que la GAPC tenía una influencia relativamente menor en el metabolismo de las hojas y del tubérculo.

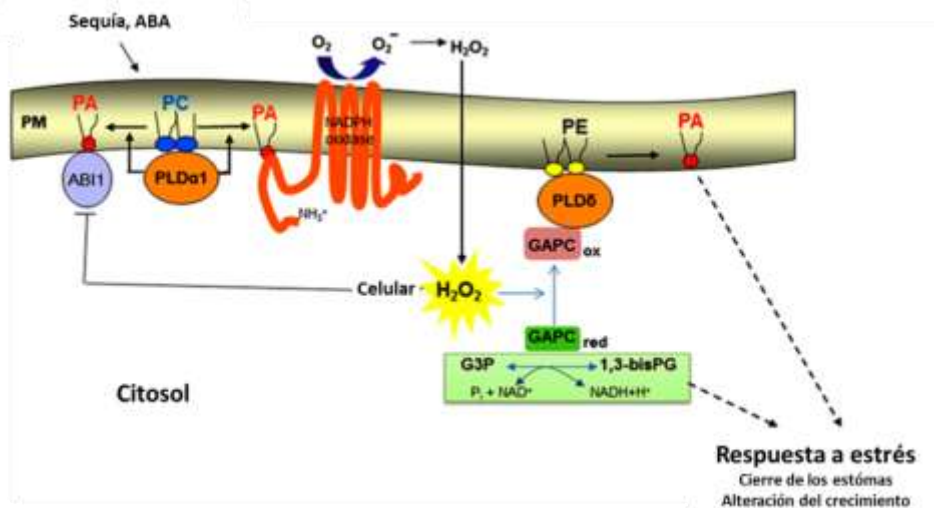
La GAPC también ha sido implicada en una cascada de señalización inducida por las especies reactivas de oxígeno, en concreto el peróxido de hidrógeno, mediante su interacción con la fosfolipasa D $\delta$  (PLD $\delta$ ), por lo que tendría también una función reguladora (Hancock y col., 2005; Guo y col., 2012). El peróxido de hidrógeno facilita la interacción de la GAPC con la PLD $\delta$  disminuyendo la disociación de la unión GAPC/PLD $\delta$ . Esta unión aumenta la respuesta de las plantas al déficit hídrico, haciendo de la GAPC una proteína señalizadora esencial en la respuesta de las plantas al estrés hídrico (Figura 1.9).

En animales, el papel de la GAPDH citosólica ha sido estudiado de forma extensa y jugaría un papel en el transporte a través de la membrana, en la fusión de membranas, la agrupación de los microtúbulos, la exportación del RNA nuclear, las reacciones fosfotransferasa/quinasa, el control de la traducción, la replicación y la reparación del DNA. También estaría implicada en el programa de expresión génica durante la apoptosis, en los desórdenes neurológicos, el cáncer de próstata, y por último estaría implicada en la farmacología y la toxicidad del óxido nítrico (Sirover, 1999; Sirover, 2011).

### 1.6.2 La GAPDH plastidial

Como se ha comentado anteriormente, existen en los plastos varias isoformas de la GAPDH que están implicadas tanto en la glicólisis como en el ciclo de Calvin.

La GAPDH del ciclo de Calvin es un típico marcador de los cloroplastos y está presente en las angiospermas como un homotetrámero A<sub>4</sub> o un heterotetrámero A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> (Cerff y Chambers, 1979). Esta GAPDH en Arabidopsis tiene tres isoformas: GAPA1, GAPA2 y GAPB. Las dos primeras tienen un peso molecular ligeramente inferior a la tercera, y la expresión de sus genes está regulada a nivel transcripcional por la luz (Meyer-Gauen y col., 1994).



**Figura 1.9.** Implicación de la GAPC en la respuesta al estrés hídrico. El modelo representa el papel del complejo PLD/PA en la regulación de la producción de especies reactivas del oxígeno y en la respuesta al estrés hídrico. La GAPC oxidada interacciona con PLDδ y promueve su actividad. Abreviaturas: PM: membrana plasmática; PA: ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PLD: fosfolipasa D; GAPCox: GAPC oxidada; GAPCred: GAPC reducida; G3P: gliceraldehído-3-fosfato; 1,3-bisPG: 1,3 bisfosfoglicerato; Modificada de Guo y colaboradores (2012).

La GAPCp fue descrita por primera vez por Meyer-Gauen y colaboradores (1994) y se sintetiza como un precursor en el citosol, que posteriormente es introducido en los plastos gracias a un péptido señal. Backhausen y colaboradores (1998) propusieron que la GAPCp era esencial para el metabolismo del almidón durante la fase oscura en los plastos verdes y no verdes. También demostraron que la GAPCp junto con la PGK estaba implicada en la producción de ATP necesario

para el metabolismo del almidón. Petersen y colaboradores (2003) sugirieron que la GAPCp jugaba un papel específico en la producción de energía glicolítica en los plastos no verdes y que estaba ausente de los cloroplastos de las angiospermas.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado también en el papel de la GAPCp como se refleja en las publicaciones de Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009, 2010a, 2010b, 2011a, 2011b). En *Arabidopsis*, las enzimas GAPCp1 y GAPCp2 tienen un 93% de homología en la secuencia de aminoácidos y están presentes en los plastos de las hojas y de las raíces. Los mutantes simples de los genes *GAPCp1* y *GAPCp2* no presentan ningún fenotipo aparente, aunque por el contrario las plantas mutantes dobles *gapcp1gapcp2* (con motivo de simplificación, identificaremos a *GAPCp1*, *gapcp1*, *GAPCp2* y *gapcp2* como *G1*, *g1*, *G2* y *g2*) para estos dos genes son enanas, tienen raíces cortas y son estériles (Figura 1.10).



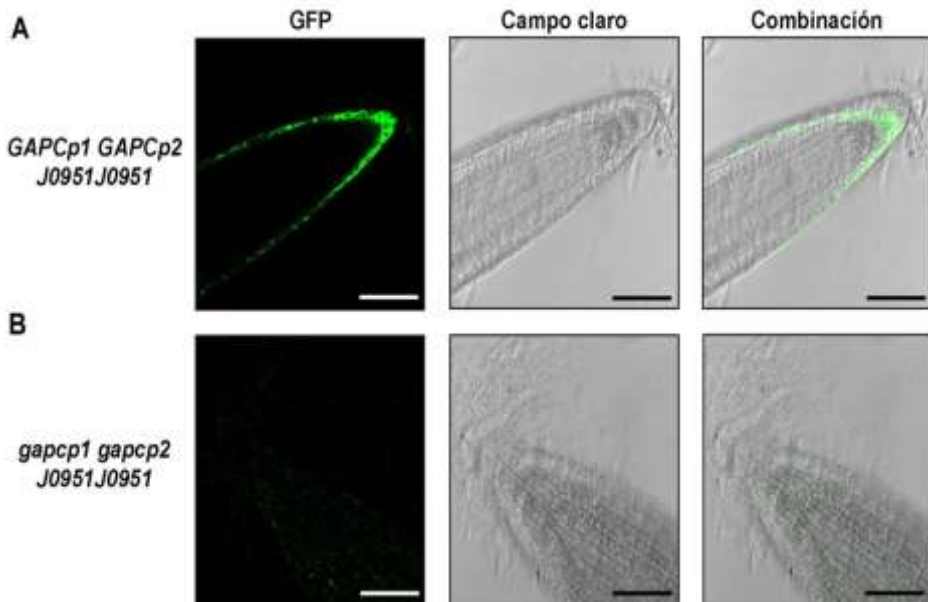
**Figura 1.10.** Caracterización fenotípica de los mutantes *gapcp* y de sus líneas complementadas. A: fenotipo radicular de los mutantes *gapcp*. Los mutantes dobles son *g1.1g1.1 g2.1g2.1*, *g1.1g1.1 g2.2g2.2* y *g1.2g1.2 g2.1g2.1*. Los mutantes simples (*g1.1g1.1 G2g2.1*), las líneas heterocigotas (*g1.1g1.1 G2g2.1*), y el mutante doble *gapcp* complementado con una construcción portadora del DNA genómico de *GAPCp1* (*g1.1g1.1 g2.1g2.1 PGI: G1*) presentan un desarrollo normal de la raíz, en comparación con las plantas control (WT). Escala = 1 cm. B: plantas mutantes dobles *g1.1g1.1 g2.1g2.1*, *g1.1g1.1 g2.2g2.2* y *g2.3g2.3 g1.1g1.1* enanas en el estadio adulto. Las plantas heterocigotas *g1.1g1.1 G2g2.1* son parecidas a las plantas silvestres. Escala = 5 cm. Modificado de Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009).

El fenotipo en las plantas *g1g2* se pudo complementar con las construcciones que llevaban el DNA genómico o el cDNA de la GAPCp1 bajo su propio promotor. Sin embargo, la complementación de las plantas *g1g2* con una construcción que llevaba el cDNA de la GAPCp1 bajo el control del promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor (*Pro35S:G1*; para abreviar a dicho promotor se le nombrará como *Pro35S*) dio lugar a plantas idénticas a las plantas silvestres pero estériles. Estos resultados demostraron que la GAPCp necesita expresarse de forma específica en un tipo celular concreto para permitir un desarrollo correcto del polen (Muñoz-Bertomeu y col., 2010a).

Como acabamos de comentar, las plantas *g1g2* son enanas y tienen raíz corta (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Estas plantas presentan una alteración profunda en su patrón de azúcares tanto en las partes aéreas como en las raíces, cuando se comparan con plantas control. El balance en aminoácidos no cambió en las partes aéreas en comparación con los controles, aunque por el contrario en las raíces este balance estuvo profundamente alterado. Uno de los aminoácidos afectados, la serina, fue un 50% inferior con respecto a los valores obtenidos en las plantas control (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Una suplementación con 100  $\mu$ M de serina en el medio de crecimiento de los mutantes dobles permitió restaurar parcialmente el balance en aminoácidos y en azúcares, aunque no permitió recuperar la fertilidad (Muñoz-Bertomeu y col., 2009).

En plantas la serina se sintetiza por tres rutas: la ruta del glicolato asociada a la fotorrespiración en las mitocondrias, en los plastos por la RFBS y en el citosol por la ruta del glicerato (Figura 1.6). El 3-PGA, el precursor de la RFBS, se obtiene en la glicólisis a partir del GAP que se convierte primero en 1,3-bisPGA y este último en 3-PGA (Figura 1.6 y Figura 1.7). No se conocía si el 3-PGA utilizado por la RFBS provenía de la glicólisis plastidial o citosólica, puesto que se asumía que los intermediarios glicolíticos están en equilibrio entre ambos compartimentos. Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009) postularon que la función de la GAPCp era proporcionar el precursor para la producción de serina en los plastos de las

raíces y otros tejidos no fotosintéticos. Para corroborar esta hipótesis, se estudió también la RFBS caracterizando funcionalmente la PSP1 y la familia de la PGDH (Cascales-Miñana y col., 2013; Muñoz-Bertomeu y col., 2013; Toujani y col., 2013a; Toujani y col., 2013b) que son la última y la primera enzima de la ruta. Los resultados obtenidos para el mutante *psp1* y *pgdh1* (que eran letales y fueron obtenidos mediante expresión condicional) mostraron que la hipótesis sobre la GAPCp como enzima que proporciona metabolitos para la síntesis de serina era correcta. En concreto, estos mutantes condicionales tenían el mismo fenotipo que el mutante *glg2*, y al igual que en este último, la suplementación con serina en el medio de cultivo permitía la recuperación parcial del crecimiento de la raíz y de la parte vegetativa. De esta manera, además de confirmar la hipótesis planteada por Muñoz-Bertomeu y colaboradores en 2009, se estableció el papel esencial de la RFBS en los tejidos no fotosintéticos.



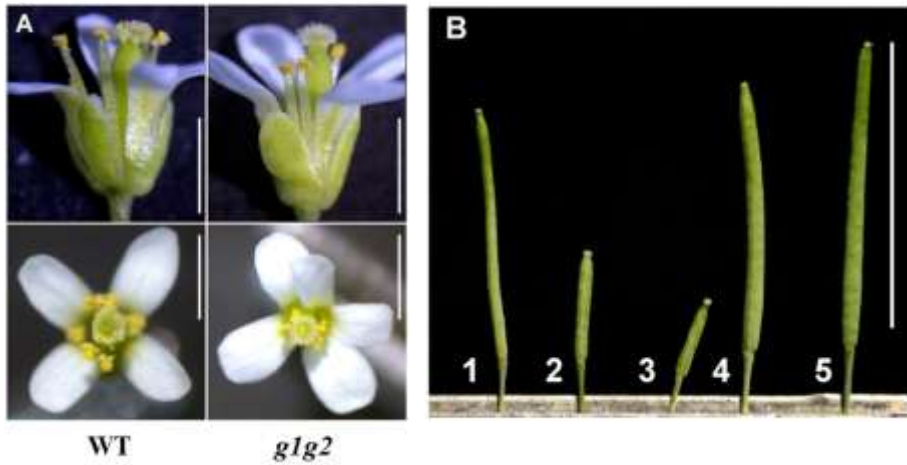
**Figura 1.11.** Análisis de fluorescencia realizado mediante microscopía confocal. A: plantas silvestres, B: plantas *gapcp1gapcp2*. Las plantas son portadoras de un marcador fluorescente específico de la columela, de las células laterales de la caliptra y de las células iniciales de la epidermis. Escala = 75  $\mu$ m. Extraído de Cascales-Miñana 2012)



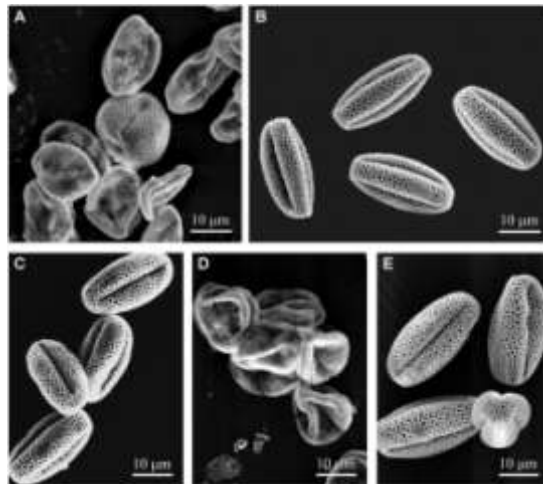
Por otro lado, Cascales-Miñana (2012) estudió el efecto de la falta de expresión de la GAPCp en las raíces utilizando varios marcadores fluorescentes de tipos celulares específicos, y determinó que las plantas *g1g2* presentaban un patrón de fluorescencia diferencial respecto a las plantas silvestres cuando utilizaba el marcador celular J0951 (específico de la caliptra y de las células iniciales de la epidermis; Figura 1.11). Así, podríamos emitir la hipótesis de que la GAPCp tendría una función especial en estos tipos celulares capaz de afectar sus perfiles de expresión génica y en consecuencia al desarrollo de la raíz primaria.

Mediante experimentos de fertilización cruzada se determinó que las plantas *g1g2* presentaban un fenotipo de esterilidad masculina y que los granos de polen de las plantas *g1g2* presentaban alteraciones morfológicas que les impedían germinar. El estudio de la estructura de las anteras demostró que el tapete, capa de células esencial para el desarrollo del polen, estaba degenerado en los mutantes doble *g1g2* (Figura 1.12 y Figura 1.13). Por tanto, la expresión específica de la GAPCp en el tapete permite un desarrollo correcto de esta capa de células y del polen (Muñoz-Bertomeu y col., 2010a).

En relación con las hormonas vegetales, la deficiencia de la GAPCp en el mutante doble *g1g2* provoca una ausencia de sensibilidad al ácido abscísico (ABA) y una alteración de la transducción de la señal de esta hormona (Muñoz-Bertomeu y col., 2011a, 2011b). En concreto, esta insensibilidad al ABA ocurre durante el crecimiento, el cierre de los estomas y durante la germinación. Los autores postularon que la deficiencia de la GAPCp es la responsable de esta insensibilidad, y que por tanto esta enzima es una pieza esencial en las interacciones entre el metabolismo y el desarrollo.



**Figura 1.12.** Esterilidad masculina del mutante doble *glg2*. A. Vista frontal y superior de flores de una planta silvestre (WT; izquierda) y del mutante *glg2* (derecha). Escala = 1,5 mm. B. Silicuas obtenidas de (1) plantas *glg2* fertilizadas con polen WT, (2) plantas WT fertilizadas con polen proveniente de plantas *glg2*, (3) plantas *glg2*, (4) plantas heterocigotas *glg1G2g2*, y (5) plantas WT. Escala = 1,5 cm. Extraído de Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2010a).



**Figura 1.13.** Micrografías de polen de plantas *glg2* y WT tomadas mediante microscopía electrónica de barrido. Plantas A: *glg2*, B: WT, C: *glg2* transformadas con la construcción genómica *ProGAPCp1:GAPCp1g*, D: *glg2* transformadas con la construcción *Pro35S:GAPCp1c* (*GAPCp1c* es el cDNA de *GAPCp1*), E: *glg2* transformadas con la construcción *ProGAPCp1:GAPCp1c* (*ProGAPCp1* es el promotor nativo de *GAPCp1*). Extraído de Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2010a).

Todos estos estudios previos demuestran la función importante que desempeña la GAPCp en el metabolismo y desarrollo de tejidos no fotosintéticos. Existe cierta controversia sobre la contribución de la glicólisis en órganos fotosintéticos. Estudios de expresión génica habían demostrado la presencia de las GAPCps en la parte aérea. Sin embargo, se desconoce si estas isoformas tienen un papel específico en los órganos fotosintéticos y especialmente en células fotosintéticas dónde se colocan junto con las isoformas cloroplásticas. Esta tesis doctoral se pretende profundizar en el estudio de la glicólisis plastidial en células fotosintéticas y no fotosintéticas utilizando como modelo la enzima GAPDH.



## **2. OBJETIVOS**

---



Esta tesis doctoral se enmarca en un proyecto más amplio que tiene como objetivo final profundizar en el conocimiento de las rutas del metabolismo primario plastidial entre las que se encuentran la ruta glicolítica y la ruta fosforilativa de biosíntesis del aminoácido serina en las plantas. Se pretende profundizar en 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 estudian las GAPDH glicolíticas utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

- 1) Conocer la abundancia de las distintas isoformas de la GAPDH en diferentes tejidos y condiciones en *Arabidopsis*.
- 2) Estudiar la función de las isoformas glicolíticas citosólicas (GAPCs) y las plastidiales (GAPCp).
- 3) Estudiar la contribución específica de la enzima GAPCp1 en las partes aéreas y raíces de *Arabidopsis*.
- 4) Identificar las dianas primarias de la actividad de la GAPCp1 así como el mecanismo por el cual controla el desarrollo de *Arabidopsis*.





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

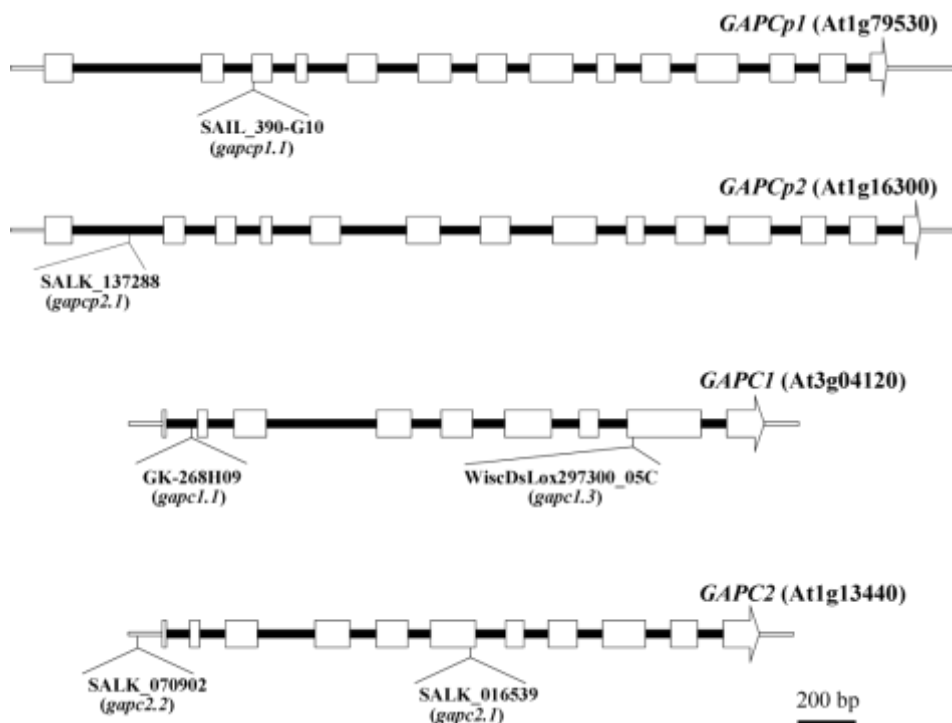


### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

En este trabajo se utilizó la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El ecotipo Columbia 0 (Col-0) fue el fondo genético utilizado para la obtención de las distintas líneas transgénicas y también se utilizó como control (WT, por sus siglas en inglés *wild type*). Este ecotipo fue proporcionado por el *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC; ID: N6673) (Scholl y col., 2000).

Se utilizaron también varios mutantes simples para las isoformas de la GAPDH para generar los mutantes dobles (Figura 3.1), siendo la mayoría proporcionados también por el NASC.



**Figura 3.1.** Localización de las inserciones de T-DNA en los genes que codifican las isoformas glicolíticas de la GAPDH empleadas en este trabajo (Muñoz-Bertomeu y col., 2009; Guo y col., 2012).

Los mutantes simples de los genes At3g04120 (*GAPC1*; GK-268H09 y WiscDsLox297300\_05C) y At1g13440 (*GAPC2*; SALK\_016539 y SALK\_070902) se cruzaron para generar los mutantes dobles *gapc1.1gapc2.1* (GK-268H09 cruzado con SALK\_016539), *gapc1.1gapc2.2* (GK-268H09 cruzado con SALK\_070902) y *gapc1.3gapc2.2* (WiscDsLox297300\_05C cruzado con SALK\_070902). Los mutantes dobles *gapc1.1 gapc2.1* y *gapc1.1gapc2.2* fueron generosamente proporcionados por el laboratorio del Dr Wang (Dpto de Biología, Universidad de Missouri, St. Louis, Estados Unidos).

Los mutantes simples de los genes At1g79530 (*GAPCp1*; SAIL\_390\_G10) y At1g16300 (*GAPCp2*; SALK\_137288) se cruzaron para obtener el mutante doble *gapcp1 gapcp2*. Dado que este mutante doble es estéril, se mantuvo a través de plantas heterocigotas *gapcp1gapcp1 GAPCp2gapcp2* o bien *GAPCp1gapcp1 gapcp2gapcp2* por segregación (Muñoz-Bertomeu y col., 2009).

En algunos experimentos se emplearon líneas transgénicas que sobreexpresaban el cDNA del gen *GAPCp1* al ser transformadas con la construcción *Pro35S:G1* (ver Apartado 3.4.1) (Muñoz-Bertomeu y col., 2009).

Para determinar la localización subcelular y tisular de la *GAPCp* se utilizaron plantas silvestres transformadas con la construcción génica *ProG1:GUS-GFP* obtenidas por Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009). Esta construcción permite la expresión del gen *GUS* (codifica la  $\beta$ -glucuronidasa) fusionado al gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP).

Además, en esta tesis doctoral también se obtuvieron líneas transgénicas que expresaban el gen *GAPCp1* bajo el control de varios promotores inducibles o específicos de tejido transformando plantas heterocigotas *g1g1 G2g2* (Apartado 3.4).

### 3.1.2 Cepas bacterianas

#### 3.1.2.1 *Escherichia coli*

Para el mantenimiento y obtención de nuevos plásmidos fue necesaria la utilización de las siguientes cepas de *E. coli* :

- **DH5 $\alpha$** : F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ ( $\square$ *lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ <sup>-</sup>
- **TOP10**: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*  $\lambda$ <sup>-</sup>*

#### 3.1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *Arabidopsis* se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101, resistente a la rifampicina. Esta cepa contiene el plásmido binario pMP90, que proporciona resistencia a gentamicina, y el plásmido ayudante (*helper*) pSoup, que da tolerancia a tetraciclina (Koncz y Schell, 1986; Hellens y col., 2000).

## 3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

### 3.2.1 *Arabidopsis thaliana*

#### 3.2.1.1 Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml con un máximo de unas 2000 semillas por tubo. El proceso de esterilización se realizó en 2 etapas: primero se hicieron dos lavados de 15 min cada uno con 1 ml de una solución de etanol 70% y 0,05% SDS (Dodecil Sulfato Sódico, SIGMA, Ref. 1667289), seguidos de un lavado de 5 min con 1 ml de una solución de etanol 70%. Los tres lavados se realizaron en agitación continua, y al final de ellos las semillas junto con el etanol se depositaron sobre un papel de filtro estéril en una cabina de flujo laminar y se dejaron secar. Una vez secas las semillas se sembraron en placas con el medio de cultivo adecuado o se guardaron en tubos Eppendorf estériles a 4°C para su posterior siembra.

### 3.2.1.2 Medios de cultivo

- Medio de cultivo estándar

En general, el cultivo *in vitro* se llevó a cabo utilizando placas 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 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), y el pH ajustado a 5,7 [ajustado con Tris (tris(hidroximetil)aminometano; SIGMA, Ref. T6066) o KOH].

- Medio de selección de líneas transgénicas

Para la selección de plantas transgénicas se utilizó un medio similar al anterior excepto por contener más sales del preparado de sales MS con vitaminas Gamborg (2,25 g/l) que denominamos MS 1/2 y que suplementamos con 0,5% de sacarosa.

La esterilización de los medios de cultivo para *Arabidopsis* y para bacterias (ver Apartado 3.2.2.1) se llevó a cabo en autoclave (20 min a 120°C, 105 Pa). Las sustancias termolábiles como los antibióticos y los aminoácidos se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,20 µm (Whatman, Ref. FP30/0.2 CA-S) 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 3.1. Se vertió 25 ml de medio en las placas redondas y 75 ml de medio en las placas cuadradas.

**Tabla 3.1.** Concentración de los antibióticos utilizados en el medio de cultivo de *Arabidopsis*

Antibiótico	Concentración final (µg/ml)
Higomicina	25
Kanamicina	50
Cefotaxima	100

### 3.2.1.3 Cultivo *in vitro*

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. Antes de ser transferidas a cámaras de crecimiento (Sanyo-MLR-351H o CONVIRON-CMP6010) para la germinación, las semillas sembradas en las placas se estratificaron 3 días a 4°C con objeto de favorecer y sincronizar la germinación. El cultivo permaneció los días adecuados para cada experimento a una temperatura de 22-25°C, humedad relativa del 40%, un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) e intensidad de luz de 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.1.4 Cultivo en invernadero

De manera rutinaria, el cultivo de *Arabidopsis* en invernadero se realizó en macetas de poliestireno cuadradas de 7x7x6,5cm y 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 (v/v). 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 a las bandejas cada 3-5 días según las necesidades hídricas de las plantas.

En los experimentos de transformación genética las semillas se sembraron en macetas redondas de 12 cm de diámetro (unas 20 semillas por maceta) y el resto del cultivo fue similar a lo comentado anteriormente.

Cuando fue necesario, algunas plántulas de cultivo *in vitro* se trasplantaron a macetas 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 Arasystem 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 alongar los tallos florales. Al final del ciclo biológico, cuando el botón floral dejaba de producir flores, se cesó el riego y se dejaron secar las plantas hasta la desaparición completa del color verde de las silicuas. Finalmente, las plantas se transfirieron a sobres de papel para asegurar su secado completo, y 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 malla 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 h de luz y 8 h de oscuridad) con una intensidad de luz aproximada de 130  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 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.

### **3.2.2 *E. coli* y *A. tumefaciens***

#### **3.2.2.1 Medio LB**

El medio *Lysogeny Broth* o LB (Bertani, 1951) se utilizó para el cultivo estándar de las bacterias. 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 antes de autoclavar.

Cuando fue necesaria su utilización en estado sólido se agregaron 1,5% (p/v) de agar (PRONADISA, Ref. 1802.00).

### 3.2.2.2 Medio SOB

El medio *Super Optimal Broth* o medio SOB (Hanahan, 1983) se usó durante la preparación de células competentes de *E. coli* por choque térmico y 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 MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>.

### 3.2.2.3 Medio SOC

Durante el proceso de transformación de *E. coli* se empleó el medio *Super Optimal broth with Catabolite repression* o medio SOC 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. 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 MgCl<sub>2</sub> y glucosa a una concentración final de 10 mM y 20 mM, respectivamente.

### 3.2.2.4 Mantenimiento de las bacterias

Las bacterias se cultivaron en dos medios diferentes, en medio líquido o en medio 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 cultivo 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 rpm para mantener una aireación adecuada.

Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas redondas de 9 cm de diámetro 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 3.2.1.2 y las concentraciones finales de los antibióticos utilizados se especifican en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Concentración de los antibióticos utilizados en el cultivo *in vitro* de bacterias.

Antibiótico	Concentración final (µg/ml)
Ampicilina	50
Espectinomicina	100
Gentamicina	25
Kanamicina	50
Tetraciclina	5

Para el mantenimiento a largo plazo, se hicieron glicerizados de los cultivos bacterianos. Para ello, se añadieron 270 µl de glicerol 80% (agente de criopreservación no iónico; SIGMA, Ref. 49767-1L) a 1 ml de cultivo bacteriano en crecimiento exponencial, se agitó y se guardó a -80°C.

### 3.3 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 3.3.1 Aislamiento de ácidos nucleicos

##### 3.3.1.1 Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis*

Se empleó el protocolo descrito por Edwards y colaboradores (1991) con algunas ligeras modificaciones. Un trozo de hoja joven (entre 50 mg y 100 mg) se

trituro a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf con 400  $\mu$ l de tampón de extracción [200 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA pH 7,5-8 (ácido etilendiaminotetraacético; Sigma, E5134) y 0,5% SDS] y se agitó vigorosamente en un vórtex para homogeneizar el extracto. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante un máximo de una hora hasta terminar la homogeneización de todas las muestras a analizar. Luego se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm y se recuperaron 300  $\mu$ l del sobrenadante que se transfirieron a un tubo nuevo. A continuación, se añadieron 300  $\mu$ l de isopropanol, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 min, induciéndose así la precipitación del DNA. Las muestras se centrifugaron de nuevo durante 5 min a 13000 rpm a temperatura ambiente, recuperando de esta forma el DNA precipitado en el fondo del tubo Eppendorf. Se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA precipitado se resuspendió en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura (Milli-Q) y se conservó el DNA extraído a 4°C hasta su utilización.

### 3.3.1.2 Aislamiento de DNA plasmídico

Se siguieron dos protocolos distintos, en función de los pasos siguientes a realizar con el material resultante de dicha extracción. Cuando el DNA 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 DNA plasmídico fue requerido para posteriores análisis de restricción con el fin de clonar o verificar la presencia o no de un determinado fragmento de DNA, se utilizó el protocolo de extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS descrito por Birnboim y Doly (1979).

#### *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 y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20

min. Se eliminó los restos del medio de cultivo y al precipitado de bacterias se le añadieron 250 µl de tampón de resuspensión (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8,0). El precipitado se resuspendió y a continuación se le añadieron 250 µl de tampón de lisis (0,2 M de NaOH, 1% de SDS); tras agitar se añadieron 350 µl de tampón de unión a la membrana (4 M de hidroclorilguanidina, 0,5 M de acetato de potasio, pH 4,2) frío (preincubado en hielo 15 min). La mezcla resultante se incubó en hielo 5 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. 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 min). 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 µl del primer tampón de lavado (5 M de hidroclorilguanidina, 20 mM de Tris-HCl, pH 6,6), mientras que el segundo consistió en la aplicación de 500 µl de segundo tampón (20 mM de NaCl, 2 mM de Tris-HCl, pH 7,5). Entre ambos pasos se realizaron sendas centrifugaciones de 1 min a 13000 rpm. Para la elución final del plásmido se depositaron sobre la membrana de la columna 50 µl de tampón de elución (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5) y se centrifugó la muestra (13000 rpm, 1 min). Este paso se realizó otra vez para recuperar el máximo de plásmido, y los 100 µl recuperados con el plásmido se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

### **Protocolo de extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS**

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

Las colonias aisladas en las transformaciones de *E. coli* se cultivaron durante 16-20 h en 4 ml de medio LB con sus respectivos antibióticos. Seguidamente, se procedió a la centrifugación de ese cultivo (13000 rpm durante 5 min a 4°C) 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  $\mu$ l de la solución alcalina recién preparada (0,2 N NaOH, 1% SDS), se agitó manualmente y la mezcla se colocó en hielo durante 5 min. A continuación, se añadieron 150  $\mu$ l 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 min. Para la precipitación del DNA plasmídico, el sobrenadante resultante de la centrifugación (13000 rpm durante 10 min a 4°C) se mezcló con 2 volúmenes de etanol 96% y se mantuvo en hielo durante 10 min. Por último, la mezcla alcohólica se centrifugó (13000 rpm, 20 min), el precipitado fue lavado en 1 ml de etanol 70%, se volvió a centrifugar y el precipitado una vez seco se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua Milli-Q con 1  $\mu$ l de RNasa (20  $\mu$ g/ml) incubándose 10 min a 37°C. El DNA plasmídico fue almacenado a -20°C hasta su uso.

### 3.3.1.3 Extracción de RNA

La extracción del RNA de tejidos 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).

Las soluciones utilizadas fueron suministradas por el kit y el material empleado era libre de RNasas, dado que durante el proceso de extracción el RNA puede ser degradado por estas enzimas.

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  $\mu$ l de tampón RA1 junto con 3,5  $\mu$ l de  $\beta$ -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 min. El filtrado se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf, sin coger restos del precipitado que se queda en el fondo del tubo, y se le añadieron 350  $\mu$ l de etanol 70%. La mezcla homogeneizada se cargó en una nueva columna con filtro y se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm para que el

RNA 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  $\mu$ l de solución MDB y se centrifugó adicionalmente 1 min a 13000 rpm, para posteriormente adicionar 95  $\mu$ l de solución DNAsa (90  $\mu$ l de tampón DNAsa + 10  $\mu$ l de DNAsa). Finalmente, antes de la elución del RNA, la membrana se lavó con 200  $\mu$ l de tampón RA2, 600  $\mu$ l de RA3 y 250  $\mu$ l de RA3, entre cada pasó se realizó una centrifugación de 1 min a 13000 rpm. La elución final se realizó añadiendo 40  $\mu$ l de agua libre de RNAsas a la columna, y tras una centrifugación de 1 min a 13000 rpm se añadieron otros 20  $\mu$ l y se volvió a centrifugar, ya que eluyendo en dos tiempos se obtiene una mayor concentración de RNA final.

### 3.3.1.4 Cuantificación de los ácidos nucleicos

Cuando fue necesario cuantificar el DNA plasmídico extraído o algún otro tipo de DNA, se cargó una alícuota en un gel de TBE (Tampón Tris-Borato-EDTA; ver Apartado 3.3.2.3) y se comparó la banda con las bandas del marcador *Lambda DNA/HindIII Marker* (Biotools, Ref. 31.011). Se obtuvo así una cuantificación aproximada.

La cuantificación del RNA extraído se realizó poniendo 1  $\mu$ l de RNA en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, el cual indica directamente la concentración del RNA y su pureza.

### 3.3.2 Análisis de ácidos nucleicos

#### 3.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo número de ellas (Mullis y col., 1986). Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo partiendo de una cantidad de DNA molde comprendida entre 10 y 50 ng, que podía ser bien DNA genómico o plasmídico. Cada reacción se realizó de forma rutinaria en 30  $\mu$ l 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], 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP; Thermo Scientific, ref. R0181), 0,5 μM de cada cebador, 0,9 U de DNA Polimerasa (Biotools, Cat.no 10.047) y entre 10 a 50 ng de DNA [1 μl del extracto de DNA genómico (ver apartado 3.3.1.1) o 1 μl de una dilución del DNA plasmídico (ver apartado 3.3.1.2) para conseguir los 10-50 ng necesarios]. 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).

Como polimerasa termoestable en las reacciones donde no se requería una alta fidelidad se empleó la enzima BIOTOOLS DNA Polimerasa (Ref. 10.047), mientras que cuando se requería una amplificación de alta fidelidad del DNA se empleó la enzima *Pfu* DNA Polimerasa (Biotools, 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 min a 94°C, seguidos de 35-45 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s 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 min por cada 1000 pb de banda a amplificar (en el caso de utilizar *Pfu* se utilizaron 2 min por cada 1 Kb). Al término de los ciclos se mantuvo la temperatura a 72°C durante 10 min, para posteriormente rebajarla a 4°C y extraer del termociclador las muestras amplificadas para su procesado (observación o utilización). Durante todo el proceso hasta el mantenimiento a 4°C el bloque térmico superior estuvo a una temperatura de 103°C para evitar la condensación de las muestras. Los cebadores y sus secuencias respectivas utilizadas en esta tesis se detallan en el Anexo 1.

### **PCR diagnóstica**

La PCR diagnóstica se utilizó para identificar plantas mutantes heterocigotas u homocigotas. Para la determinación de los alelos silvestres o mutantes de cada línea mutante, se utilizaron un par de oligonucleótidos que hibridan en el DNA del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado del T-DNA, o un par de oligonucleótidos de los cuales uno hibrida en el T-DNA y el otro en el genoma vegetal. Se utilizaron en algunos casos estos tres cebadores a la vez cuando el patrón de bandas obtenido permitía distinguir entre las plantas silvestres, heterocigotas u homocigotas. Tras las distintas PCRs, los correspondientes productos se visualizaron en un gel de agarosa para la identificación y aislamiento de los mutantes heterocigotos u homocigotos a través del análisis del patrón de bandas resultante.

#### **3.3.2.2 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 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q, se le añadieron 500 µl del tampón de unión [3 M de tiocinato de guanidinio, 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 min a 13000 rpm a temperatura ambiente eliminando posteriormente la solución filtrada. Se procedió luego 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) de 500 µl y 200 µl respectivamente, seguidas cada una de un paso de centrifugación de 1 min a 13000 rpm y la posterior eliminación del filtrado. La elución final de la muestra se realizó a través de 50 µl de tampón de elución (10 mM de Tris-HCl, pH 8,5) por centrifugación (13000 rpm, 1 min). El producto eluido se mantuvo a -20°C hasta su uso.



### 3.3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR y otros fragmentos de DNA 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  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de bromuro de etidio (SIGMA, Ref. E-1510). 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. Se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  de los marcadores de tamaño molecular *100 bp DNA Ladder* (BIOTOOLS, Ref. 31.006) ó *1 kb DNA Ladder* (BIOTOOLS, Ref. 31,005), en función del tamaño esperado del fragmento (ambos preparados a 0,2 mg/ml). En aquellos casos en los que fue requerida la cuantificación del producto de PCR separado por electroforesis, se utilizó el marcador *lambda-Hind III* (Ver Apartado 3.3.1.4).

En aquellos casos en los que los fragmentos de DNA eran de un tamaño reducido (inferior a 400 pb) 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 V) y finalmente las bandas de DNA se visualizaron iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda en un transiluminador UVitec UVIdoc-HD2/20.

### 3.3.2.4 Purificación de fragmentos de DNA en gel de agarosa

Tras separar las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se cortaron del gel con un bisturí y el DNA 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).

Una vez separados los fragmentos de DNA mediante electroforesis, se visualizó la banda bajo luz ultravioleta y se cortó. 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  $\mu\text{l}$  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 1 min 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 µl del tampón NT3 y la muestra se centrifugó otro min a 13000 rpm desechando nuevamente el filtrado. Este último paso se repitió nuevamente pero en esta ocasión la centrifugación se prolongó durante 1 min más para eliminar cualquier resto de la solución. Finalmente, el DNA se eluyó añadiendo 50 µl del tampón NE a la columna, incubando la muestra durante 1 min a temperatura ambiente. Como último paso se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm y el DNA purificado se cuantificó (ver apartado 3.3.1.4) y se guardó a -20°C hasta su uso.

### **3.3.2.5 Digestión del DNA con endonucleasas de restricción**

Las digestiones de DNA 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 U de enzima por cada microgramo de DNA a digerir. Las enzimas que utilizamos fueron de las casas comerciales TAKARA y Thermo Scientific.

### **3.3.2.6 Ligación de moléculas de DNA**

La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando 1 U de la enzima ligasa *T4 DNA Ligase* (INVITROGEN, 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 h a 16°C.

### **3.3.2.7 Secuenciación del DNA**

Los plásmidos obtenidos en la elaboración de las distintas construcciones génicas o los fragmentos amplificados de las líneas mutantes (utilizando un cebador del genómico y otro del T-DNA en la PCR) fueron secuenciados en el

Servicio de Secuenciación de DNA 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/](http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/)) y BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **3.3.3 Análisis de la expresión génica**

#### **3.3.3.1 Síntesis de cDNA**

Para realizar los análisis de expresión, así como para el clonaje de algunas construcciones, se partió de cDNA. La síntesis de cDNA se realizó con el kit *Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Fermentas, Ref. K1641) con algunas modificaciones en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, 0,5 a 3 µg de RNA se mezclaron con 2 µl de tampón de reacción (5X Reaction Mix), 1 µl de la enzima retrotranscriptasa (Maxima® Reverse Transcriptase), y se completó el volumen hasta 20 µl con agua libre de RNAsa. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador con el siguiente programa: 10 min a 25°C, 30 min a 50°C y finalmente 5 min a 85°C. Terminado el proceso, se añadieron 20 µl de agua Milli-Q a cada tubo de reacción y se guardaron a -80°C hasta su uso.

#### **3.3.3.2 RT-PCR cuantitativa**

Para cuantificar los niveles de RNA mensajeros de los genes de interés mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se utilizó el kit *SYBR® Premix Ex Taq™, Perfect Real Time* (TAKARA, Ref. RR041A) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En primer lugar se preparó una mezcla de los dos cebadores en 8,6 µl de agua Milli-Q (0,4 µl de cada cebador 10 mM y 7,8 µl de agua). Posteriormente, se preparó la mezcla de reacción con 10 µl de SYBR® Premix Ex Taq™ (2X) y 0,4 µl de *ROX Reference Dye* (proporcionado por el kit) por reacción. Cuando se

preparaba una solución premezcla, cada uno de los volúmenes de las soluciones se multiplicó por el número de reacciones + 1.

Una vez preparadas las dos mezclas, en cada pocillo de la placa de RT-qPCR (Applied Biosystems®, MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Ref 4346907) se cargaron 8,6 µl de la mezcla de cebadores, 10,4 µl de la mezcla de reacción y 1 µl de cDNA. Para cada gen y genotipo se realizaron 3 réplicas.

El análisis por RT-qPCR fue llevado a cabo usando un GeneAmp® 5700 *Sequence Detection System* (APPLIED BIOSYSTEMS, Ref. PN 4304472), que detecta la fluorescencia emitida por el SYBER® GREEN I intercalado en la doble cadena de DNA. El método de amplificación fue el siguiente: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a la temperatura del cebador, y 1 min a 72°C; tras los ciclos de amplificación se realizó una curva de disociación de 72°C a 95°C para confirmar la especificidad de la amplificación del producto de PCR.

La eficiencia de la reacción de RT-qPCR fue calculada a través del uso de diferentes genes de expresión constitutiva utilizados como control interno, los cuales fueron seleccionados de acuerdo con los principios metodológicos expuestos por Czechowski y colaboradores (2005) en función de la eficiencia de los cebadores. La abundancia relativa del nivel de RNA mensajero fue calculada a través del método comparativo por análisis de los diferentes parámetros Ct obtenidos de acuerdo con Pfaffl (2001).

### **3.4 DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS**

En esta tesis doctoral, se generaron varias construcciones génicas para expresar el gen *GAPCp1* bajo el control de promotores específicos de la parte aérea, específicos de la raíz e inducibles. Los distintos promotores se describen en la Tabla 3.3. A excepción de la construcción *proAlcA:G1*, todas las demás construcciones génicas se realizaron en el plásmido p35S:G1 que deriva del plásmido pMDC83 (Curtis y Grossniklaus, 2003; ver características del plásmido

en el apartado siguiente). Describimos a continuación las etapas para obtener las construcciones génicas, de las cuales algunas fueron descritas por Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009) y Cascales-Miñana (2012). Todas las nuevas construcciones fueron obtenidas en *E. coli*, y fueron secuenciadas para comprobar que no tuvieran mutaciones y que estuvieran bien construidas.

**Tabla 3.3.** Promotores utilizados en la obtención de nuevas construcciones génicas en esta tesis doctoral.

Especificidad	Promotor	Nombre abreviado
<b>Parte Aérea</b>	Subunidad 2B de la RuBisCO ( <i>RBCS-2B</i> )	<i>ProRBCS</i>
	Proteína de unión a clorofilas A/B 2( <i>CAB2</i> )	<i>ProCAB</i>
<b>Raíz</b>	Alcohol deshidrogenasa ( <i>ADH</i> )	<i>ProADH</i>
	Transportador de Fosfato ( <i>PHT1.2</i> )	<i>ProPHT</i>
<b>Inducible</b>	Proteína de choque térmico 18.2 ( <i>HSP18.2</i> )	<i>ProHS</i>
	Alcohol deshidrogenasa de <i>A. nidulans</i>	<i>ProAlcA</i>

### 3.4.1 Vectores de clonación y transformación

Los vectores utilizados, así como sus principales características, se especifican a continuación.

- **pUC18:** Es un pequeño plásmido de 2686 pb que deriva del plásmido pBR322. Contiene el replicón de *PMB1 rep* responsable de la replicación del plásmido, el gen *bla* que codifica por la  $\beta$ -lactamase y que confiere una resistencia a la ampicilina, y una región del operon *lac* de *E. coli*. (Figura 3.2A). Este plásmido que contiene una región de clonación múltiple (MCS) dentro del operon *lac* fue utilizado para evaluar la calidad de las células competentes de *E. coli*.

- **Pro35S:GI:** Este plásmido fue generado en nuestro laboratorio para dirigir la expresión del cDNA del gen *GAPCp1* bajo el control del promotor 35S (Figura 3.2B; Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Dado que deriva del pMDC83 sus principales características son la presencia de dos genes de resistencia a kanamicina e higromicina (resistencia utilizada para bacterias y plantas,

respectivamente), así como tener fusionado en el extremo final del *GAPCp1* la secuencia de la GFP.

- **pSBright**: Este plásmido lleva el *ProRBCS* del gen At5g38420 que se usó para dirigir la expresión del gen *GAPCp1* en la parte aérea de las plantas transformadas.

- **BACF1N18**: Este cromosoma artificial bacteriano (BAC) lleva el *ProCAB* del gen At1g29920 que se usó para dirigir la expresión del gen *GAPCp1* en la parte aérea de las plantas transformadas.

- **BACF22K20**: Este BAC lleva el *ProADH* del gen At1g77120 que se usó para dirigir la expresión del gen *GAPCp1* en la raíz de las plantas transformadas.

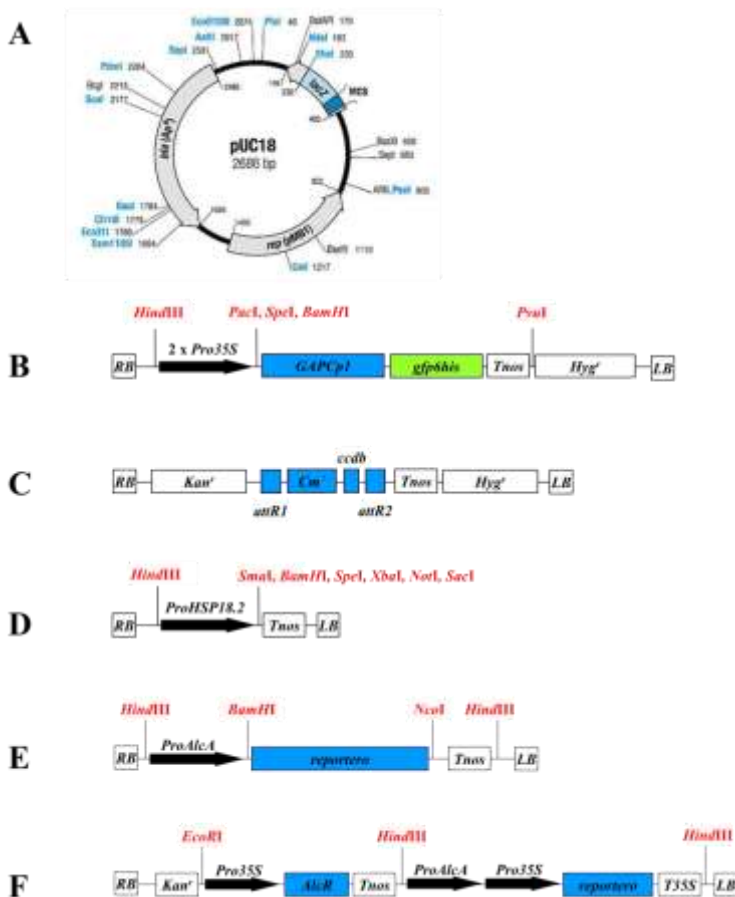
- **pGWB1**: Como en el caso del vector pMDC83, contiene tecnología *Gateway* que permite una recombinación entre los sitios *attR*. Confiere resistencia a kanamicina e higromicina en bacterias y en plantas, respectivamente. Contiene entre los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* el promotor del gen *PHT1.2* que codifica el transportador de fosfato 1.2 (Figura 3.2C).

- **pTT101**: El vector binario pTT101 es un plásmido derivado del pBI101 (Jefferson y col., 1987) utilizado para transformar *Arabidopsis*. En la Figura 3.2D se puede observar la zona donde tiene el promotor del gen que codifica la proteína de choque térmico 18.2 (*HSP18.2*, At5g59720; Takahashi y Komeda, 1989; Matsuhara y col., 2000). Este vector posee un tamaño aproximado de 12,2 Kb. Presenta genes de resistencia al antibiótico kanamicina, tanto para la selección de plantas como de bacterias transformantes bajo el control del promotor *NOS*. Este plásmido fue utilizado como elemento primario de clonación del promotor inducible por choque térmico de *Arabidopsis*.

- **pACN**: Este plásmido fue utilizado para realizar la construcción del promotor inducible por etanol con el sistema *alcR* (que se detalla en el apartado 3.4.7) y fue proporcionado por el laboratorio del Profesor Caddick M. (Universidad de Liverpool, Reino Unido). En la Figura 3.2E se puede observar la estructura de la

región del T-DNA. Permite el subclonaje del gen *GAPCp1* para posteriormente ser insertado en el plásmido pBinSRNACatN.

- **pBinSRNACatN:** Este plásmido fue usado para realizar la construcción del promotor inducible por etanol con el sistema alcR y fue proporcionado también por el Profesor Caddick M (ver T-DNA en la (Figura 3.2F). El plásmido contiene el factor de transcripción alcR bajo el promotor 35S. Este plásmido confiere la resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas.



**Figura 3.2.** Esquema de varios plásmidos y construcciones usados. A: pUC18; pUC18; B: pMDC83; C: pGWB1; D: pTT101; E: pACN; G: pBinSRNACatN. Las enzimas de restricción se muestran en color rojo.

### 3.4.2 Construcción génica *ProRBCS:G1*

El promotor *RBCS* de la Subunidad 2B de la RuBisCO (*RBCS-2B*, At5g38420) tiene un tamaño de 1335 pb y dirige la expresión específicamente en las células verdes incluyendo las células del mesófilo y en las células guarda (Kim y col., 2003). Este promotor subclonado en el plásmido pSBright fue generosamente proporcionado por el laboratorio de Dr. Alabadi [Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)/Centro superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, España]. Este promotor fue inicialmente clonado en el laboratorio del Dr. David Jackson (Cold Spring Harbor, NY, USA) (Kim y col., 2005). El promotor se amplificó del plásmido pSBright mediante PCR usando los cebadores AT5G38420pRbcS-For y AT5G38420pRbcS-Rev (Anexo 1), que poseían los sitios de restricción de *HindIII* y *PacI* respectivamente. El fragmento amplificado se purificó, se digirió con las dos enzimas, se realizó una electroforesis y se volvió a purificar a partir del gel. A continuación, se digirió el plásmido *Pro35S:G1* con *HindIII* y *PacI* para liberar el promotor 35S. Tras separar los 2 fragmentos en una electroforesis, se purificó el fragmento correspondiente al plásmido *Pro35S:G1* sin el promotor 35S. Mediante ligación, se unió el *ProRBCS* al plásmido para generar el plásmido *ProRBCS:G1* (Figura 3.3).

### 3.4.3 Construcción génica *ProCAB:G1*

El promotor del gen que codifica la proteína de unión a clorofilas A/B 2 (*CAB2*, At1g29920) tiene un tamaño de 320pb (Millar y col., 1992) y dirige la expresión en la parte aérea fotosintética. Las proteínas CAB unen clorofila A, clorofila B y carotenoides para formar el LHCII (*Light-harvesting complex* del PSII). Este promotor subclonado en el BAC F1N18 fue proporcionado por el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC). El promotor se amplificó mediante PCR usando los cebadores AT1G29920pCAB-For y AT1G29920pCAB-Rev (Anexo 1) que poseían los sitios de restricción de *HindIII* y *SpeI* respectivamente. A continuación, se digirió el plásmido *Pro35S:G1* con *HindIII* y



*SpeI* para liberar el promotor 35S. El fragmento correspondiente al plásmido *Pro35S:G1* sin el promotor 35S fue ligado al fragmento *ProCAB* para obtener la construcción *ProCAB:G1* (Figura 3.3).

#### **3.4.4 Construcción génica *ProADH:G1***

El promotor del gen que codifica la Alcohol Deshidrogenasa (*ADH*, At1g77120) tiene un tamaño de 940 pb (McKendree y Ferl, 1992) y en plantas permite la expresión de la *ADH* en las raíces en condiciones de anaerobiosis. Este promotor subclonado en el BAC F22K20 fue proporcionado por el ABRC. El promotor se amplificó mediante PCR usando los cebadores AT1G77120pADH-For y AT1G77120pADH-Rev (Anexo 1) que poseían los sitios de restricción de *HindIII* y *SpeI* respectivamente y posteriormente fue digerido con estas dos enzimas. Como en el caso anterior, el promotor y el fragmento del plásmido *Pro35S:G1* sin el *Pro35S* se ligaron para dar lugar al plásmido *ProADH:G1* (Figura 3.3).

#### **3.4.5 Construcción génica *ProPHT:G1***

El promotor *PHT* del gen que codifica el transportador de fosfato 1.2 (*PHT1.2*; At5g43370) tiene un tamaño de 2012 pb y es específico de las raíces, donde se expresa en las células epidérmicas y en los pelos radiculares (Mudge y col., 2002). Este promotor fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Cejudo, CSIC-Sevilla, España (Kirchsteiger y col., 2012) tras ser subclonado en el vector pGWB1 (Nakagawa y col., 2007). El promotor se amplificó del plásmido pGWB1 mediante PCR utilizando los cebadores PromPht1.2HindF y PromPht1.2SpeRev (Anexo 1) que poseían los sitios de restricción de *HindIII* y *SpeI* respectivamente. Tras digerirlo con estas dos enzimas, se ligó al fragmento del plásmido *Pro35S:G1* sin *Pro35S* como en los casos anteriores para dar lugar al plásmido *ProPHT:G1* (Figura 3.3).

### 3.4.6 Construcción génica *ProHS:G1*

El promotor *HS* del gen que codifica la HSP18.2 es un fuerte promotor inducible por choque térmico en plantas transgénicas (Matsuhara y col., 2000). Tiene un tamaño de 851 pb y estaba en el plásmido pTT101. Los plásmidos pTT101 y *Pro35S:G1* se digirieron con *HindIII* y *SpeI* para aislar respectivamente el promotor y el fragmento del plásmido *Pro35S:G1* sin el promotor *Pro35S*. Mediante electroforesis se separaron los fragmentos, se purificaron y se ligaron, dando lugar a la construcción *ProHS:G1* (Figura 3.3).

### 3.4.7 Construcción génica con el sistema *alc*

El sistema de expresión génica *alc* proviene del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Este sistema inducible por el etanol en plantas transgénicas se compone de 2 elementos: el factor de transcripción *alcR* (ALCR) que al unirse al promotor de la alcohol deshidrogenasa (*ProAlcA*) induce la expresión de ésta (Caddick y col., 1998; Roslan y col., 2001). El Apartado 3.4.1 describe los componentes del sistema para la expresión en plantas. Para la expresión inducible del gen *GAPCp1* en *Arabidopsis*, la construcción génica se realizó de la manera siguiente: se digirió el plásmido pACN con la enzima *NcoI*; la construcción *Pro35S:G1*, que se utilizó para aislar el fragmento *GAPCp1-GFP* que serviría de inserto, se digirió con *PvuI*. Los plásmidos pACN y *Pro35S:G1* abiertos se trataron con la enzima *Klenow* (Roche, Ref. 11008404001) para hacer los extremos romo. A continuación los plásmidos pACN y *Pro35S:G1* se digirieron con *BamHI* para purificar el fragmento del plásmido sin el gen *CAT* y aislar el fragmento *GAPCp1-GFP* que serviría de inserto de *Pro35S:G1*. A continuación se ligaron los dos fragmentos y se comprobó mediante digestión enzimática la orientación correcta del inserto. Se obtuvo de esta forma la construcción plasmídica pACN-*ProAlcA:GAPCp1-GFP*. Esta construcción se digirió con *HindIII* para aislar el fragmento *ProAlcA:GAPCp1-GFP*, y se ligó con el plásmido pSRNACNbin abierto por *HindIII*, previamente tratado con una fosfatasa alcalina para evitar que se autoligara. Para evitar una expresión inespecífica de la *GAPCp1-GFP* por el

*Pro35S* nos quedamos con la construcción en la cual el fragmento *ProAlcA:GAPCpI-GFP* se había insertado en sentido contrario a *Pro35S:alcR*. A esta nueva construcción se la designó como *ProAlcA:GI* (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Esquema de las construcciones génicas utilizadas en esta tesis doctoral.

### 3.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE BACTERIAS Y PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACIÓN.

En los experimentos de Hanahan (1983) sobre la transformación de *E. coli* se llegó a la conclusión de que las células bacterianas pueden adquirir la competencia de introducir un DNA exógeno. Para ello los tratamientos de las células a baja temperatura con iones calcio permiten que la pared celular bacteriana se debilite, y por tanto cuando existe DNA en el medio, éste puede llegar con facilidad a la membrana. En esta situación, si a estas células se les aplica un choque térmico la membrana se rompe parcialmente y el DNA puede introducirse en la célula.

### 3.5.1 Células competentes de *E. coli*

Para la propagación de plásmidos recombinantes y clonaje de las construcciones del apartado anterior se utilizaron células competentes de *E. coli*, obtenidas a través del protocolo descrito por Inoue y colaboradores (1990) con modificaciones. Se fabricaron células competentes de *E. coli* de las dos cepas mencionadas anteriormente (Apartado 3.1.2.1). Para ello, se partió de 400  $\mu$ 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 600 nm. Alcanzado este punto, el cultivo se enfrió en hielo durante 10 min, para posteriormente centrifugar las células durante 10 min a 5000 rpm a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante por decantación el sedimento celular se resuspendió agitando primero con el resto del sobrenadante para continuar posteriormente la resuspensión con 10 ml de tampón de transformación (TB) frío [20 mM de PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)) a pH 6,7 ajustado con KOH, 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, 210 mM de KCl y 50 mM de MnCl<sub>2</sub>]. La mezcla se mantuvo durante 10 min en hielo y se centrifugó en las mismas condiciones. Acto seguido, se repitió la operación resuspendiendo primero el sedimento con el resto del sobrenadante y con 4 ml de TB frío. Finalmente se añadieron 375  $\mu$ l de dimetil sulfóxido (DMSO; VWR, Ref 23500-260) poco a poco y en agitación suave continuada. Se dejó 10 min reposar en hielo y se distribuyó en alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml. Cada alícuota se congeló inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80°C.

Para evaluar la eficiencia de transformación de las células competentes, se transformaron varias alícuotas de 100  $\mu$ l de células competentes con 5  $\mu$ l (50 pg) del plásmido pUC18 siguiendo el procedimiento establecido por Hanahan (1983).

### 3.5.2 Transformación de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* se realizó según una adaptación del método descrito por Mandel e Higa (1970).

Las células competentes mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se pusieron en hielo durante 5 min para su descongelación y se les añadió de 1 a  $10\ \mu\text{l}$  del plásmido transformante (proveniente de mezcla de ligación o de recombinación). Las células con el plásmido se mezclaron y se dejaron reposar durante 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se realizó un choque térmico de 90 s a  $42^{\circ}\text{C}$  en un bloque térmico, e inmediatamente después se colocó el tubo en hielo durante 2 min. Seguidamente, se agregó 1 ml de medio SOC y se incubó una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  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 ( $25$ ,  $100$  y  $500\ \mu\text{l}$ ) extendiendo el cultivo con bolas de vidrio estériles mediante agitación de la placa. Una cuarta placa con medio LB sin antibiótico se sembró con  $100\ \mu\text{l}$  de bacterias transformadas para comprobar la viabilidad de las células. Las colonias resistentes a los antibióticos de selección resultaron visibles a las 8 ó 12 h de la siembra según se hubieran utilizado las cepas TOP10 o DH5 $\alpha$ , respectivamente. La presencia del vector de transformación en dichas colonias fue verificada por PCR de colonia, en la que se usó como molde células de las colonias, que con los primeros minutos de la PCR a  $95^{\circ}\text{C}$  se rompen y liberan sus plásmidos en la mezcla de reacción. Las colonias transformantes que resultaron positivas, se cultivaron en 5 ml de medio LB (junto con el antibiótico de selección del vector de transformación) y tras una noche de crecimiento a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación, se procedió a la extracción y secuenciación de los plásmidos siguiendo el protocolo descrito en los apartados 3.3.1.2 y 3.3.2.7. También se hicieron glicerizados de las colonias positivas siguiendo el protocolo del apartado 3.2.2.4 para posteriores usos.

### **3.5.3 Células competentes de *A. tumefaciens***

Para la obtención de células competentes de *A. tumefaciens* se generó un cultivo saturado en 2 ml de medio LB con gentamicina ( $25\ \mu\text{g/ml}$ ) y tetraciclina ( $5\ \mu\text{g/ml}$ ). A continuación se inoculó en 100 ml de medio LB, con los mismos antibióticos, 1 ml de cultivo saturado, y se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación constante

(250 rpm) 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 min. El precipitado celular resultante se resuspendió en 2 ml de una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. La suspensión se dividió en alícuotas de 100 µl, que se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### **3.5.4 Transformación de *A. tumefaciens***

Para transformar la cepa GV3101 pSoup de *A. tumefaciens* se utilizó una modificación del método de congelación-descongelación de Holsters y colaboradores (1978). Para ello, se descongeló en hielo una alícuota de 0,1 ml de células competentes y se le añadió 1 µg de plásmido (volumen máximo de 10 µl). La mezcla se agitó suavemente y se congeló rápidamente en N<sub>2</sub> líquido. A continuación se incubó a 37°C durante 5 min y tras la incubación se añadió 1 ml de LB líquido con gentamicina y tetraciclina. La suspensión transformante se incubó posteriormente a 28°C durante 4 h en agitación (250 rpm). Finalmente se extendió 0,1 ml de solución bacteriana transformada en placas con medio LB sólido conteniendo gentamicina, tetraciclina y el antibiótico específico del plásmido. Dichas placas se incubaron a 28°C. Las colonias resistentes a los antibióticos de selección resultaron visibles de 2 a 3 días tras la siembra. Las colonias transformantes se verificaron mediante PCR de colonia. Las colonias positivas se cultivaron en 5 ml de medio LB con gentamicina, tetraciclina y con el antibiótico de selección del vector de transformación. Tras un día de crecimiento a 28°C en agitación constante se realizaron glicerizados como se describe en el apartado 3.2.2.4.

#### **3.6 TRANSFORMACIÓN DE *A. 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 (plantas T<sub>0</sub>). Antes de proceder a su transformación, se eliminaron sus silicuas para aumentar las probabilidades de rescatar líneas transgénicas tras la siembra de una parte 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.

Para la transformación, 1 ml de cultivo saturado (absorbancia de 0,2-0,3 a 600 nm) de *A. tumefaciens* con el vector adecuado se inoculó a 200 ml de medio LB con tetraciclina, gentamicina y el antibiótico de selección específico del vector. El medio se incubó a 28°C durante 12 a 16 h en agitación constante (200 rpm). A continuación se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 4°C y las células sedimentadas se resuspendieron en 400 ml de la solución de transformación [5% (p/v) de sacarosa, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 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 la solución de transformación durante 2 min. A continuación las macetas se cubrieron durante un día con unas bolsas de plástico transparentes para mantener la humedad y aumentar la tasa de transformación. Al día siguiente se les hicieron cortes a las bolsas para que entrara el aire y tras 24 h se les quitó las bolsas y se tutoraron las plantas. 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 (semillas T<sub>1</sub>).

### 3.7 SELECCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *A. THALIANA*

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas se sembraron en placas redondas con medio de selección MS 1/2 con sacarosa (ver Apartado 3.2.1.2), el antibiótico adecuado para el T-DNA introducido y cefotaxima para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*. Tras un periodo de estratificación de 3 días a 4°C, las placas se transfirieron a una cámara de crecimiento durante 8 a 12 días. Los

transformantes ( $T_1$ ) resistentes se trasplantaron a tierra y una vez maduras y secas se recogieron las semillas ( $T_2$ ) que se sembraron de nuevo en placas con el medio de selección (sin cefotaxima), a fin de analizar la segregación en la generación  $T_2$ . La selección de las líneas con una sola inserción del transgén se fundamenta en la elección de la descendencia ( $T_2$ ) 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 plántulas resistentes a tierra para obtener la siguiente generación de semillas ( $T_3$ ), y aislar de la misma forma individuos homocigotos para el transgén, que serían aquellos cuyas semillas fueran 100% resistentes al antibiótico de selección. Aquellas líneas de las que se obtuvo una descendencia  $T_3$  con el 100% de plantas resistentes al antibiótico, constituyeron las líneas homocigotas para el transgén y fueron seleccionadas para realizar estudios fenotípicos y moleculares.

Cabe destacar que durante la selección de las líneas homocigotas también se cultivaron plantas control para poder hacer los diferentes experimentos con semillas de la misma edad. Esto mismo se aplicó al crecimiento y obtención de semillas de los mutantes.

### **3.8 CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE LAS PLANTAS**

#### **3.8.1 *In vitro***

Para los análisis *in vitro* se utilizaron placas cuadradas en posición vertical. Los parámetros que se evaluaron fueron el peso fresco y seco de las partes aéreas y de las raíces, la longitud de la raíz principal y su tasa de crecimiento.

El peso fresco se evaluó cuando las plántulas tenían entre 18 y 22 días con 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 alterar el resultado.



Para medir el peso seco el material vegetal (parte aérea o raíces) se envolvió en papel de filtro y se mantuvo a 70°C para su secado. Tras 5 a 7 días se pesó.

La longitud de las raíces se midió cada 2 días a partir del día 8 de crecimiento hasta el final de cada experimento (cuando las raíces de algunas de las líneas llegaban al extremo inferior de las placas). La tasa de crecimiento radicular fue la relación entre la longitud radicular y los días de crecimiento.

### 3.8.2 En invernadero

Plantas cultivadas en el invernadero de forma individual en macetas cuadradas se utilizaron para evaluar la longitud del tallo principal, el número de ramas por planta, el peso fresco y seco de la parte aérea cuando tenían entre 45 y 55 días. El peso seco se obtuvo de igual forma que en el apartado anterior.

### 3.9 MEDIDAS DE ALMIDÓN Y DE AZÚCARES SOLUBLES Y TOTALES

Estas medidas se evaluaron en plántulas cultivadas *in vitro* de 22 días de edad. La extracción se realizó con el kit *Enzytec<sup>TM</sup> Almidón* (Ref. E1268, r-biopharm) con algunas modificaciones en las instrucciones del fabricante. Este ensayo de determinación del almidón y de los azúcares solubles y totales se basa en que el almidón se hidroliza en D-glucosa a pH 4,6 en presencia de la enzima amiloglucosidasa (AGS). La D-glucosa formada se determinó con HK y con Glu-6P deshidrogenasa (Glu-6P-DH) a pH 7,6. La D-glucosa es fosforilada dando lugar a Glu-6P. En presencia de Glu-6P-DH, Glu-6P se oxida por el NADP en D-gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH. La cantidad de NADPH formada es estequiométricamente igual a la cantidad de D-glucosa formada por la hidrólisis del almidón. El NADPH se determinó por su absorción a 340 nm.

El material vegetal (parte aérea o raíces) se recogió y se trituró en N<sub>2</sub> líquido. Luego se repartió en alícuotas de 500 mg en tubos Corning® de 50ml y se procedió a la solubilización del almidón con DMSO y ácido clorhídrico (HCl) como se describe a continuación. A cada tubo con el material homogeneizado se añadieron 0,5 ml de HCl 8M y 2 ml de DMSO. Los tubos se incubaron a 60°C durante 1 h y

se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A continuación se añadió a cada tubo 5 ml de agua Milli-Q y se ajustó el pH entre 4 y 5 con NaOH. El volumen final se enrasó a 10 ml y los tubos se dejaron 2 h a temperatura ambiente para la sedimentación de las partículas en suspensión. Tras la sedimentación, se recogió la parte superior sin partículas y se usó para la medida del almidón y de los azúcares solubles y totales. La Tabla 3.4 describe el procedimiento del experimento.

**Tabla 3.4.** Procedimiento para la evaluación del almidón y de los azúcares solubles y totales.

Pipetear en cubetas:	Blanco de muestra	Reacción de la Muestra	Blanco de Reacción
AGS	-	17,25 µL	17,25 µL
Muestra	17,25 µL	17,25 µL	-
Mezclar con cuidado la cubeta. Incubar la cubeta cerrada a 60°C durante 15 min. Añadir:			
NADP, ATP	86,25 µL	86,25 µL	86,25µL
Agua milliQ	94,75 µL	77,50 µL	94,75 µL
Mezclar, después de aproximadamente 3 min leer las absorbancias a 340nm ( <b>A<sub>1</sub></b> ). Añadir:			
HK/Glu-6P-DH	2,75 µL	2,75 µL	2,75 µL
Mezclar, después de aproximadamente 10 a 15 min leer las absorbancias ( <b>A<sub>2</sub></b> )			

Se usaron las formulas siguientes para los cálculos de los contenidos en almidón, en azúcares solubles y en azúcares totales.

$$\text{Contenido}_{\text{almidón}} (g \cdot g^{-1} \text{ de muestra}) = \frac{((A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco de muestra}}) \times 0,2968 [g \text{ almidón/L solución de muestra}]}{\text{Peso muestra [en g/l solución de muestra]}}$$

$$\text{Contenido}_{\text{azúcares solubles}} (g \cdot g^{-1} \text{ de muestra}) = \frac{((A_1 - A_2)_{\text{blanco de muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco de reacción}}) \times 0,2968 [g \text{ azúcares solubles/L solución de muestra}]}{\text{Peso muestra [en g/l solución de muestra]}}$$

$$\text{Contenido}_{\text{azúcares totales}} = \text{Contenido}_{\text{almidón}} + \text{Contenido}_{\text{azúcares solubles}}$$

### **3.10 MEDIDAS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

La determinación de las actividades de la PGK, la PK y la fumarasa se realizaron siguiendo un procedimiento descrito por Gibon y colaboradores (2004). La determinación de la actividad de la enzima citrato sintasa se realizó siguiendo el procedimiento indicado por Nunes-Nesi y colaboradores (2007). En todos los casos se realizaron algunas modificaciones en los protocolos.

En el caso de la PGK y de la PK, se utilizaron ensayos de determinación directos mientras que en el caso de la fumarasa y citrato sintasa, se utilizaron ensayos de determinación cíclicos para amplificar el NADH producido al final de la reacción.

#### **3.10.1 Extracción de las enzimas**

Previamente a la determinación de las actividades, 50 mg de tejido fresco alicuotados en un tubo Eppendorf de 2 ml se mezclaron con 500  $\mu$ l de tampón de extracción [100 mM Tris-HCl (pH 8), 15 mM  $MgCl_2$ , 7,5% glicerol, 0,5 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) disuelto en DMSO, 2 mM benzamidina y 2 mM ácido  $\epsilon$ -aminocaprónico]. La mezcla se agitó en un vortex vigorosamente y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante que se mantuvo en hielo hasta su utilización.

#### **3.10.2 Determinación de las actividades de las enzimas glicolíticas**

En estos ensayos el volumen final de reacción fue 300  $\mu$ l.

##### **Determinación de la actividad de la fosfoglicerato quinasa**

Para este ensayo 5  $\mu$ l del extracto proteico se mezclaron con tampón de reacción y se midió la absorbancia a 570 nm hasta que la medida fuese estable. A continuación se añadió la enzima GAPDH (iniciador de la reacción) y se midió la absorbancia. Las concentraciones finales en la mezcla de reacción fueron 100 mM HEPES pH 7,6 [ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico; SIGMA, Ref. H3365], 1 mM EDTA, 2 mM  $MgSO_4$ , 0,3 mM NADH, 6,5 mM 3-fosfoglicerato, 1 mM ATP, y 3,32 U GAPDH. El valor de la actividad se determinó

a partir de la pendiente que indicaba la conversión del NADH en NAD<sup>+</sup>. Las reacciones y medidas se realizaron en microplacas de 96 pocillos.

### **Determinación de la actividad de la piruvato quinasa**

Para este ensayo, el tampón de reacción se compuso de 5 µl del extracto proteico, 50 mM MOPS pH 7(ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM NADH, 5 mM PEP, 6 U de LDH y 1 mM ADP. Este ensayo se realizó como en el caso anterior salvo que en este caso la LDH era el componente que servía de iniciador de la reacción.

### **3.10.3 Determinación de las actividades de las enzimas del ciclo TCA**

Estas enzimas se analizaron utilizando ensayos cíclicos, que tenía como objetivo amplificar el NADH producido al final de la reacción. En un primer paso, se añadieron los componentes que permitirían a la enzima producir NADH, y tras parar esta reacción y neutralizar sus componentes, se amplificaba el NADH en una reacción cíclica. Las reacciones se realizaron igualmente en microplacas de 96 pocillos.

### **Determinación de actividad de la fumarasa**

Primero, se procedió a la preparación de 50 µl del tampón de reacción compuesto por 100 mM Tricina-KOH (pH 8,0), 0,2 mM acetil-CoA, 5 mM tampón K-P (pH 7,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NAD<sup>+</sup>, 0,05% Triton X-100, 12U/ml malato deshidrogenasa (malato DH), 1U/ml citrato sintasa, y 5 µl de extracto proteico. La reacción empezó con la adición de 10 mM de fumarato (Ref Sigma F1506) o de agua (para el blanco) hasta completar el volumen de reacción a 50 µl. La mezcla se agitó y se incubó durante 40 min a temperatura ambiente.

Durante este tiempo, se realizó una recta patrón con concentraciones crecientes del estándar NADH (0, 0,2, 0,4, 0,8 y 1 nM), dado que es el producto final de la reacción.

Tras el tiempo de incubación se añadieron 20 µl de 0,5 M KOH, se mezcló (para detener la reacción), y tras una breve centrifugación (*spin*), la reacción se

incubó a 95°C durante 5 min. La reacción se neutralizó añadiendo 20 µl de 0,5 M de HCl en 0,2 M Tricina-KOH (pH 9) y se completó el volumen a 100 µl añadiendo 10 µl de agua. Una vez más el conjunto se mezcló y se centrifugó brevemente.

La determinación del NADH se realizó aumentando hasta los 150 µl la mezcla anterior con diferentes componentes que se quedaron a unas concentraciones de 100 mM Tricina-KOH (pH 9), 4 mM EDTA, 0,1 mM PES (etosulfato de fenazina), 0,6 mM MTT (metil tiazolil tetrazolio), 500 mM etanol y 6 U/ml alcohol deshidrogenasa. Esta reacción final se mezcló y se determinó la cinética de la reacción a 570 nm durante 45 a 60 min y se guardó la  $V_{\max}$ .

#### **Determinación de la actividad de la citrato sintasa**

Se procedió primero a la preparación de 50 µl del tampón de reacción compuesto por 100 mM Tricina-KOH (pH 8,5), 0,3 mM malato, 0,05% Triton X-100, 5 U/ml malato DH, 0,25 mM  $\text{NAD}^+$ . Se añadió a este tampón 5 µl de muestra y la reacción empezó con la adición de 0,2 mM de acetil CoA o de 5 µl de agua para el blanco. El conjunto se agitó y se incubó de 40 a 60 min. Durante este tiempo se preparó una curva patrón con el NADH como en el caso anterior. La detención de la reacción, la neutralización y la determinación se realizaron como en la medida de la actividad fumarasa.

### **3.11 DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

La determinación de los ácidos grasos y de los aceites en general es un parámetro importante para la determinación de la calidad organoléptica de los alimentos.

La composición en ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases de los metil esteres de ácidos grasos (FAME) como se describe en Focks y Benning (1998) con algunas modificaciones. Para determinar los FAME de una a diez semillas se pusieron en un tubo de vidrio con tapa de rosca al cual se añadió con una pipeta de vidrio 1 ml de HCl 1 N disuelto en metanol. Se añadió a

continuación ácido pentadecanóico a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y que sirve de control interno, y se incubó el tubo a 80°C durante 90 min en un baño. Tras enfriar el tubo a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min, se añadió 1 ml de NaCl al 9% y 1 ml de hexano. El tubo se agitó en el vórtex y tras una centrifugación de 4 min a 1000 rpm, la fracción superior compuesta por el hexano (en la cual se retuvieron los FAME) se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo de vidrio. Los FAME contenidos en esta fracción se concentraron bajo un flujo de nitrógeno sin dejar que se secasen, se volvieron a disolver en 100  $\mu\text{l}$  de hexano, y se transfirió la solución a tubos de vidrio de cromatografía de gases. Los FAME así extraídos se analizaron en un cromatógrafo de gases.

### 3.12 DETERMINACIÓN DE LOS MACRONUTRIENTES Y MICRONUTRIENTES

Los minerales presentes en partes aéreas y raíces de las plantas de *Arabidopsis* se analizaron siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Alcántara (2010). Se determinaron los contenidos de los macronutrientes N, P, K, Ca, Mg, S y Na, y de los micronutrientes B, Cu, Fe, Mn y Zn. Para este análisis, partes aéreas y raíces de plántulas de 21 días crecidas *in vitro* se recogieron por separado en  $\text{N}_2$  líquido, se trituraron y se liofilizaron. A continuación 0,5 g del material liofilizado (parte aérea o raíz) se mezclaron con 10 ml de ácido nítrico concentrado. La mezcla se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 24 h. Tras este tiempo, las muestras se incubaron en un bloque térmico durante 10 min a 120°C, y seguidamente durante 20 min a 170°C, hasta reducir a la mitad el volumen de ácido. Tras enfriarse, se añadieron a la mezcla 2 ml de ácido perclórico al 70% y se procedió con la digestión a 200°C, proceso que finalizaba cuando la solución se volvía incolora. El volumen se enrasó en frío a 25 ml con agua y se añadió una gota de Triton X-100. La determinación de los macronutrientes y de los micronutrientes se realizó a partir de esta mezcla en un espectrofotómetro de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES).

### **3.13 ANÁLISIS DE MICROSCOPIA**

#### **3.13.1 Ensayos de localización utilizando la proteína verde fluorescente GFP**

Los ensayos de localización subcelular 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 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania). Éste está compuesto por un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 láseres (458 nm, 488 nm, 514 nm y 534 nm). Para excitar a la GFP se utilizó el láser de 488 nm y su emisión se recogió en un rango de 500 nm a 520 nm (máximo de emisión: 509 nm). La clorofila se excitó con el mismo láser, y su emisión se recogió en el rango de 660 nm a 690 nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda.

Para la visualización de las muestras, se realizaron preparaciones simples en fresco, únicamente con dos lavados en 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. Plantas que sobreexpresan el gen de la proteína GFP bajo el promotor constitutivo 35S y que se usaron como controles de GFP, fueron gentilmente proporcionadas por el Prof. Julian Schroeder de la Universidad de California (San Diego, USA). Para cada línea se tomaron imágenes en diferentes órganos y las imágenes transmitidas con luz blanca.

#### **3.13.2 Ensayos de localización utilizando la proteína reportera $\beta$ -glucuronidasa**

Para los ensayos de localización utilizando la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), los órganos/tejidos de las plantas a estudiar se introdujeron 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 h a 37°C. El X-GlcA es utilizado por la  $\beta$ -glucuronidasa para crear un precipitado azulado (5,5'-dibromo-4,4'-icloroíndigo) que permite localizar el lugar donde se expresa el gen. Posteriormente, las muestras se destiñeron mediante lavados sucesivos con etanol al 70% (Jefferson y col., 1987). Tras este proceso las muestras se montaron en portaobjetos y se observaron con un microscopio que tenía incorporado una cámara digital LEICA DC350 con la que se tomaron las imágenes.

### **3.14 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT**

#### **3.14.1 Extracción proteica**

Las muestras (hojas, raíces o plántulas frescas o congeladas a -80°C) fueron homogeneizadas con N<sub>2</sub> líquido en un mortero y se alicuotaron en tubos Eppendorf (de 1,5 ó 2 ml). Por cada 500 mg de muestra se añadieron 750  $\mu$ l de tampón de extracción proteica (140 mM NaCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; pH 7,4) y 16,5  $\mu$ l de un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, P9599). Los extractos se centrifugaron (14000 rpm durante 20 min a 4°C) y los sobrenadantes se pasaron a tubos Eppendorf. Las proteínas extraídas se cuantificaron con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, 500-0006), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para realizar la recta patrón. Los extractos proteicos se diluyeron todos a la misma concentración con tampón de extracción proteica, se les añadió el tampón de carga 5X Laemmli (7,5% SDS, 0,1 M de ditiotreitól, 10 mM EDTA, 30% sacarosa, 0,25 mg/ml de azul de bromofenol, y 0,3 M Tris-HCl pH 6,8), se calentaron a 95°C durante 10 min, se dejaron enfriar hasta alcanzar unos 22-24°C, y en caso de no utilizarse en el momento para la electroforesis, se guardaron a -80°C hasta su uso.



### 3.14.2 Electroforesis SDS-PAGE

En las electroforesis se emplearon cantidades comprendidas entre 60 y 120  $\mu\text{g}$  de proteínas. En el caso de haber guardado las muestras a  $-80^\circ\text{C}$ , éstas se volvieron a calentar a  $95^\circ\text{C}$  durante 3 min.

Los geles de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma-Aldrich, 30% Solution, A3699) se componía de 2 partes: el gel de empaquetamiento (Tabla 3.5) y el gel de separación (Tabla 3.6). El gel de empaquetamiento permite que todas las proteínas se concentren a la vez antes de llegar al gel de separación, y este último permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular. La polimerización de los geles se realizó con persulfato amónico (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED).

La electroforesis se llevó a cabo en un tampón de electroforesis (190 mM Glicina; 25 mM Tris; 0,1% (p/v) SDS; pH 8,3) bajo un voltaje de 75 voltios.

**Tabla 3.5. Composición del gel de empaquetamiento al 4% Acrilamida/Bis-Acrilamida**

Sustancias	Volúmenes de los componentes (ml) para 4 ml de gel
Agua	2,375
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,000
Acrilamida/Bis-Acrilamida	0,530
SDS 100g/l	0,040
APS 100g/l	0,050
TEMED	0,005

**Tabla 3.6. Composición del gel de Separación al 8% Acrilamida/Bis-Acrilamida**

Sustancias	Volúmenes de los componentes (ml) para 7,5 ml de gel
Agua	2,72
Glicerol	0,75
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	1,875
Acrilamida/Bis-Acrilamida	2
SDS 100g/l	0,075
APS 100g/l	0,075
TEMED	0,0075

### 3.14.3 Transferencia y Detección

Las proteínas fueron electro-transferidas (durante 1 hora a 100V) a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Hybond™-ECL (RPN203D, GE Healthcare) utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Cell (BioRad) con el tampón de transferencia (192 mM Glicina, 16,94 mM Tris, 20% metanol) a 4°C. La eficacia de la transferencia, así como la correcta carga de las proteínas, se comprobó mediante la tinción de las membranas con una solución de Ponceau [0,1% Ponceau S (P3504, Sigma), 1% ácido acético] y el posterior desteñido con el tampón PBS (del inglés *Phosphate Buffer Saline*; 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, ajustado a pH 7,5).

La detección inmunológica se realizó con el sistema Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, fue necesario preparar un tampón de lavado, PBS-Tween o PBS-T [tampón PBS con 0,1% (v/v) de Tween 20] y una solución de bloqueo o diluyente de anticuerpos PBS-T-B [PBS-T con 2% (p/v) de polvo de bloqueo (ECL Prime blocking agent, RPN418V)]. Las membranas fueron incubadas durante una hora en agitación horizontal en la solución de bloqueo PBS-T-B y se lavaron 2 veces con el tampón de lavado PBS-T durante 30 s. A continuación, se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a la concentración adecuada (Tabla 3.7) a 4°C en agitación constante. Los anticuerpos fueron diluidos en la solución PBS-T-B. Cuando las diluciones eran superiores a 1:10000, se diluían previamente a 1:1000 en el tampón PBS-T y luego se diluían a la concentración final en la solución PBS-T-B. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti GAPA/B (proporcionado por la Dra. Renate Scheibe, Universidad de Osnabruek, Alemania), anti GAPC (Santa Cruz sc-25778), anti GAPCp1 (obtenidos frente al péptido N<sub>terminal</sub>-KGSINVIDDSTLEINC-C<sub>terminal</sub>), anti GFP (Molecular probes, ref. A-11122).

Al final de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 6 veces a temperatura ambiente con el tampón PBS-T, cada lavado de una

duración de 5 min. A continuación, se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente en agitación constante. Para todos los anticuerpos primarios utilizados (obtenidos en conejos), el anticuerpo secundario se utilizó a 1:25000 (*Ac Anti-Rabbit*; RPN2124, GE-Healthcare). Las membranas se volvieron a lavar como se ha comentado anteriormente con el tampón PBS-T, se escurrieron y se incubaron durante 5 min con el agente de detección (ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent, RPN2235, Amersham™, GE Healthcare). Tras los 5 min, se escurrieron las membranas y se eliminó adecuadamente el agente de detección. La señal se detectó mediante el uso de radiografías Amersham Hyperfilm™ ECL (KNO 70243, GE Healthcare). El revelado se realizó en una cámara oscura con líquido revelador (Anatomix Developer Replenisher, 753269, Fuji Hunt) y líquido fijador (X-Fix Fixer & Replenisher, 753277, Fuji Hunt). En función de la intensidad de la señal, la exposición de la membrana a la radiografía varió de entre 5 s a 1 hora.

**Tabla 3.7.** Anticuerpos (Ac) primarios utilizados y concentraciones de uso.

Proteínas	Ac Primario	Concentración
<b>GAPA1</b> (At3g26650)	Ac anti GAPA/B	1:40000
<b>GAPA2</b> (At1g12900)	Ac anti GAPA/B	1:40000
<b>GAPB</b> (At1G42970)	Ac anti GAPA/B	1:40000
<b>GAPC1</b> (At3g04120)	Ac anti GAPC	1:5000
<b>GAPC2</b> (At1g13440)	Ac anti GAPC	1:5000
<b>GAPCp1</b> (At1g79530)	Ac anti GAPCp1	1:40000
<b>GFP</b>	Ac anti GFP	1:25000

#### 3.14.4 Lavado y reutilización de las membranas

Una vez realizado el revelado, las membranas se podían volver a incubar con el mismo anticuerpo o con un anticuerpo distinto.

Para una nueva incubación con el mismo anticuerpo, realizamos 2 lavados de 30 min cada uno con el tampón de lavado PBS-T. Las membranas se volvieron a bloquear con el tampón de bloqueo e incubar con el anticuerpo como se ha descrito en el apartado anterior.

Para una incubación con un anticuerpo distinto, se realizó un lavado que tenía como objetivo eliminar los anticuerpos fijados en las membranas. Para ello, se sumergieron las membranas en un tampón compuesto por 100 mM 2-mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,7 y se incubaron a 50°C durante 30 min con agitación ocasional. Tras esta incubación, las membranas se lavaron 2 veces durante 10 min en PBS-T a temperatura ambiente utilizando grandes volúmenes de tampón de lavado. Para terminar, las membranas se volvieron a incubar con el tampón de bloqueo como se ha descrito anteriormente y se volvieron a incubar con los anticuerpos adecuados.

### 3.15 ANÁLISIS METABOLÓMICO

Las plantas utilizadas para los análisis metabólicos crecieron durante 21 días en condiciones *in vitro* estándar (Apartados 3.2.1.2 y 3.2.1.3). En función de las líneas a analizar, las condiciones de crecimiento pudieron variar (las condiciones exactas se indicarán en los resultados).

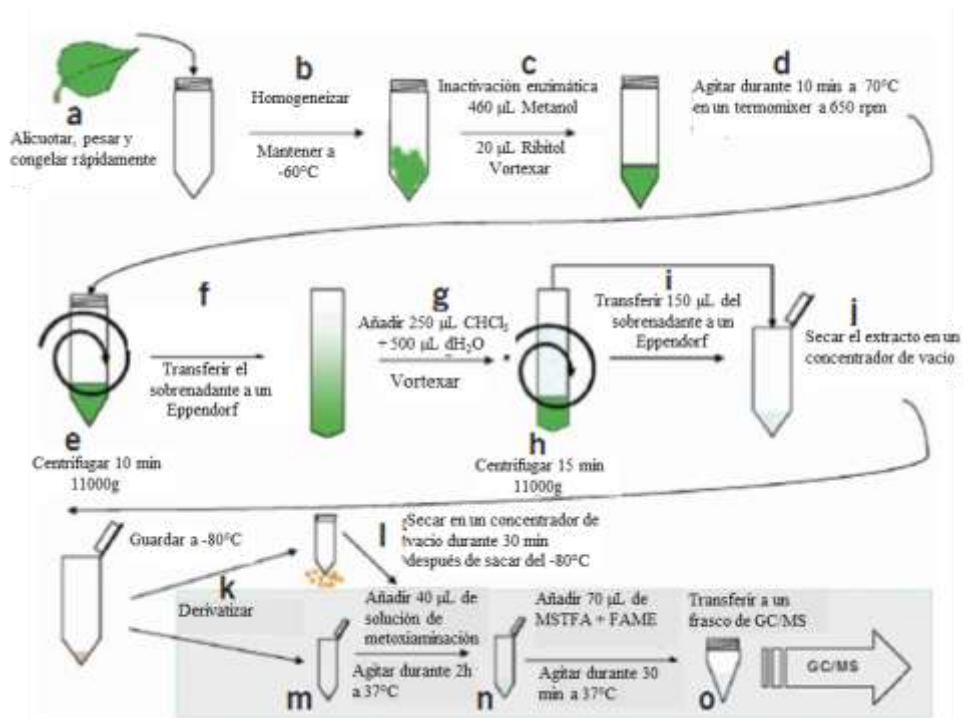
#### 3.15.1 Extracción de los metabolitos

La extracción de los metabolitos y la derivatización se hicieron según el método descrito por Lisec y colaboradores (2006) con algunas modificaciones. El material vegetal se trituró en N<sub>2</sub> líquido y se repartió en alícuotas de aproximadamente 50 mg en tubos de 1,5 ml con tapón de rosca, anotando el peso exacto del material alícuotado. Se realizaron 6 réplicas biológicas por línea a analizar. A cada réplica se le añadieron 0,46 ml de metanol (Merck, cat. N° 1.06007.1000) y 20 µl de ribitol (0,2 mg/ml; Sigma, cat. no. 488-81-3). El metanol permite detener todas las reacciones enzimáticas y el ribitol sirve de control interno para la fase polar. Para disminuir al mínimo la variabilidad debida al pipeteo, se hizo una premezcla con la cantidad total de metanol y de ribitol necesaria para extraer las muestras y sus controles en una misma tanda de extracción. Las muestras se agitaron en un vórtex y se incubaron durante 15 min a 70°C con agitación a 650 rpm en un agitador térmico; a los 2 min de agitación, se

abrieron los tubos para eliminar el exceso de presión. Tras la incubación se centrifugaron los tubos durante 10 min a 14000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. A cada tubo se le añadieron 0,25 ml de cloroformo (Merck, cat. N° 1.02444.1000) y 0,5 ml de agua Milli-Q y se agitó en vórtex durante 15 s. Se centrifugaron los tubos durante 15 min a 4000 rpm y se transfirieron 150 y 300 µl de la fase superior (fase polar) a nuevos tubos Eppendorf. Las muestras se secaron en un concentrador de vacío a temperatura ambiente y se rellenaron con N<sub>2</sub> gaseoso. El N<sub>2</sub> gaseoso permite evitar la oxidación de las muestras y que se produzcan reacciones indeseadas debido a la presencia de contaminantes en el aire. Finalmente, los tubos se almacenaron a -80°C hasta la derivatización de las muestras, proceso en el cual se utilizaron solo las muestras que provenían de 150 µl de muestra (los tubos procedente de 300 µl servirían de alícuota de seguridad por si se perdieran los de 150 µl durante el transporte hasta el laboratorio del Dr. A. Fernie).

### 3.15.2 Derivatización

Antes de proceder a la derivatización, las muestras se volvieron a secar en un concentrador de vacío durante 30 min. Se preparó una solución de metoxiaminación [20 mg/ml de hidrocloreuro de metoxiamina (Merck, Sigma, cat. no. 593-56-6) en piridina pura (Merck, cat. no. 110-86-1)]. Se añadieron 20 µl de esta solución de metoxiaminación a las muestras que se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación continua. Durante la incubación, se preparó una mezcla de N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA; Macherey-Nagel, cat. N° 24589-78-4) con 20 µl/ml de FAMES. Se añadieron 35 µl de la mezcla a las muestras que se volvieron a incubar a 37°C durante 30 min con agitación continua. Finalmente se transfirió todo el volumen de cada muestra a un frasco de cristal y se procedió al análisis por cromatografía de gases - analizador de tiempo de vuelo - espectrometría de masas (GC-TOF-MS).

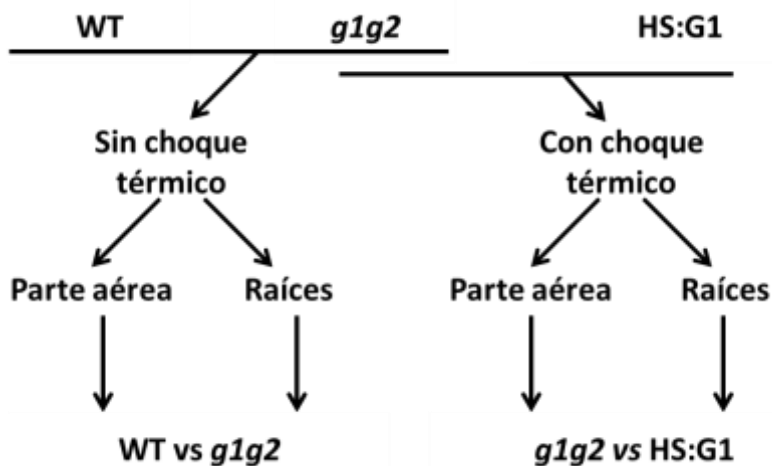


**Figura 3.4.** Protocolo modificado de preparación de los extractos para análisis metabolómico. La extracción de los metabolitos (a-j) se realizó en nuestro laboratorio, la derivatización y la GC/MS (k-o) se realizó en el laboratorio del Doctor A. Fernie. MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos. Esquema modificado de Lisec y colaboradores (2006).

### 3.16 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Para el análisis de la expresión génica (transcriptómica) se utilizaron plantas silvestres, *glg2* y *glg2* HS:G1 que se sembraron y crecieron durante 21 días *in vitro* en condiciones estándar en placas en posición vertical. Las placas se separaron en dos lotes: un lote recibió un choque térmico a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h y el otro no recibió ningún tratamiento. Tras 4 h después del choque térmico, se recogieron y se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido. Se recogieron por separado las partes aéreas y las raíces de las plantas tratadas y no tratadas. Se eligió este tiempo porque determinamos que era el tiempo idóneo para evaluar los cambios en el transcriptoma.

El diseño experimental está indicado en la Figura 3.5, en el que se comparó el genotipo silvestre con el mutante doble *g1g2*, ambos sin tratar. Por otro lado se comparó el mutante doble *g1g2* con el mutante doble complementado con la construcción *ProHS:G1*, ambos sometidos al choque térmico.



**Figura 3.5.** Diseño experimental para el análisis transcriptómico.

### 3.16.1 Extracción del RNA y Síntesis del cDNA

El RNA total se extrajo como se describe en el Apartado 3.3.1.3 y se amplificó utilizando el Amino Allyl MessageAmp<sup>TM</sup> II aRNA Amplification Kit (Ambion Inc., Austin, TX, EE. UU.). Se aplicaron algunas modificaciones al protocolo descrito por el fabricante y solo están mencionados aquí los cambios realizados.

Para la síntesis de la primera hebra de cDNA, 0,5 µg de RNA se mezclaron con 0,5 µl de T7 Oligo(dT) Primer en un volumen total de 6 µl. La mezcla se incubó durante 10 min a 70°C y, tras la incubación, se le añadió la mitad de las cantidades de los reactivos descritos para realizar la transcripción reversa, obteniendo así un volumen final de 10 µl. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 2 h.

A continuación, se preparó la mezcla de los reactivos y enzimas, también reducidos a la mitad del volumen descrito (40  $\mu\text{l}$  en total), para la síntesis de la hebra complementaria del cDNA. A esta mezcla se le añadieron los 10  $\mu\text{l}$  de la reacción anterior para tener un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  que se incubó durante 2 h a 16°C. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de agua Milli-Q a los tubos tras la incubación y el cDNA de doble cadena fue purificado usando el kit DNAClear™ (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El cDNA tras la purificación se eluyó en 24  $\mu\text{l}$  de agua Milli-Q y se redujo este volumen a aproximadamente 8  $\mu\text{l}$  en un concentrador de vacío.

### **3.16.2 Transcripción *in vitro* del amino alil RNA (aRNA) y marcaje fluorescente**

El cDNA se transcribió a aRNA usando la mitad de las cantidades de reactivos y enzimas especificados por el fabricante. Al final de la reacción, se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de agua para detener la reacción y ajustar el volumen a 100  $\mu\text{l}$ . Esta reacción corresponde a la amplificación del RNA de partida. El aRNA sintetizado se purificó con el kit MEGAClear™ (Ambion) y se cuantificó.

A continuación, 7,5  $\mu\text{g}$  de aRNA de cada muestra se secaron en un concentrador de vacío y fueron marcados con los fluoróforos Cy3 o Cy5 (Cy™Dye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham/GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido). Cada vial de fluoróforo se resuspendió en 54  $\mu\text{l}$  de DMSO, de los cuales se usaron 18  $\mu\text{l}$  para cada reacción. Para el marcaje, cada aRNA se mezcló con 10  $\mu\text{l}$  de *Coupling Buffer* y 18  $\mu\text{l}$  del correspondiente fluoróforo y la mezcla se incubó durante 1 h en oscuridad.

El aRNA marcado con el fluoróforo (Cy-Dye-aRNA) se purificó con el kit MEGAClear™ (Ambion), se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua y se cuantificó.

Todas las cuantificaciones se realizaron con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.



### 3.16.3 Hibridación de las micromatrices

Las micromatrices empleadas en este trabajo fueron las micromatrices de oligonucleótidos largos (70-mer) imprimidas en la Universidad de Arizona (<http://ag.arizona.edu/microarray/>) con el set de oligos de Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Array Ready Oligo Set (AROS) Version 1.0.

Antes de su uso, las micromatrices se prepararon y se prehibridaron. Para ello, se hidrataron exponiéndolas al vapor de agua calentada a 60°C durante 10 s y se fijaron los oligonucleótidos por irradiación ultravioleta (UV) a 65 mJ en un *Stratalinker UV Crosslinker* 1800 (Stratagene, La Jolla CA, EE. UU.). Se secaron durante 5 s a 65°C en un horno de hibridación. Esta operación, de la hidratación al secado, se repitió 3 veces, tras lo cual las micromatrices se lavaron 2 veces con una solución de 0,1% SDS y 4 veces con agua Milli-Q. Cada lavado duró 2 min. A continuación las micromatrices se lavaron una vez con etanol absoluto durante 30 s y se secaron centrifugándolas a 2000 rpm durante 1 min. Seguidamente, se prehibridaron a 42°C durante 45 min con una solución de prehibridación (3X SSC; 0,01% BSA; 0,01% SDS). Posteriormente, las micromatrices se lavaron 2 veces con agua Milli-Q (cada lavado durante 2 min) y una vez con isopropanol (durante 30 s), y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. Paralelamente, se preparó la sonda a hibridar.

Cada genotipo (silvestre, *glg2*, y *glg2* HS:G1) estuvo representado por 4 réplicas biológicas independientes, de las cuales 2 se marcaron con el fluoróforo Cy3 y las 2 otras con el fluoróforo Cy5. Este intercambio de fluoróforo se hizo para eliminar la variabilidad debida a la mayor o menor hibridación de los fluoróforos.

A continuación, se utilizó una mezcla equimolar (180 pM de cada Cy-Dye-aRNA) de 2 muestras enfrentadas según el diseño experimental (Figura 3.5), usando para cada mezcla las réplicas que tenían el fluoróforo opuesto. La mezcla se homogeneizó y se redujo su volumen a 5 µl en un concentrador de vacío.

Posteriormente se procedió a la fragmentación del Cy-Dye-aRNA para preparar la sonda usando el *RNA Fragmentation Reagents* (Ambion®) con alguna

modificación: se añadieron a la mezcla homogeneizada 2  $\mu\text{l}$  de *tRNA* (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Ambion), 2  $\mu\text{l}$  de *Poly(A)* (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (ROCHE) y 1  $\mu\text{l}$  de *Fragmentation Buffer* (10x) (Ambion). Se incubó la reacción durante 15 min a 70°C y tras este tiempo, se añadió 1  $\mu\text{l}$  de *Stop Solution* (Ambion).

A la sonda así preparada se añadieron 70  $\mu\text{l}$  del tampón de hibridación (50  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada, 30  $\mu\text{l}$  de SSC 20X, 5  $\mu\text{l}$  SDS 10%, 5  $\mu\text{l}$  de solución *Denhardt's*), se incubó a 95°C durante 5 min y tras enfriarse, se inyectó entre la micromatriz y un cubreobjetos LifterSlip™ (Erie Scientific, Portsmouth NH, EE. UU.). Finalmente la micromatriz con la sonda se colocó en una cámara de hibridación (*ArrayIt Hybridization Cassete*, TeleChem) y se incubó en un baño a 42°C durante 16 h.

#### 3.16.4 Lavado de las micromatrices

Tras la incubación, las micromatrices se lavaron varias veces con soluciones de SSC y SDS de concentración decrecientes. El primer lavado se realizó con una solución de 1X SSC y 0,1 % SDS a 30°C durante 5 min, el segundo con 0,2X SSC y 0,1 % SDS a 30°C durante 5 min, el tercero y el cuarto con 0,1X SSC a temperatura ambiente durante 2 min, y el quinto y el sexto con 0,01X SSC a temperatura ambiente durante 2 min.

Finalmente las micromatrices se secaron por centrifugación a 2000 rpm durante 1 min.

#### 3.16.5 Escaneo y análisis estadístico de las micromatrices

El escaneo se realizó en un escáner Genepix 4000B (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale CA, EE. UU.), usando la aplicación informática Genepix® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices). Las imágenes se escanearon a 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5), ajustando la ganancia de los fotomultiplicadores de modo que el número de pocillos saturados fuese inferior al 0,1% y que el cociente entre el sumatorio de las señales totales para cada fluoróforo tuviese un valor en torno a 1.

Mediante el programa *Acuity*®, se realizó una nueva normalización de los datos (método *Lowess: Locally Weighted Scatter plot Smoother*). Asimismo, se eliminaron aquellos puntos (*spots*) que no estaban representados al menos en 3 de las 4 réplicas, se invirtió el cociente en las 2 réplicas cuyo marcaje se realizó con los fluoróforos invertidos, y se seleccionaron los genes diferencialmente expresados (Sayas, 2014).

El análisis estadístico se realizó con el test estadístico SAM (“*Significant Analysis of Microarrays*”), que permite determinar aquellos genes cuyo nivel de inducción o represión es estadísticamente significativo (considerando un *False Discovery Rate* menor del 10%). Utilizando la página web <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/> se realizaron los análisis funcionales de los listados de genes obtenidos de las micromatrices agrupándolos según su categoría funcional del MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*). La descripción completa de los genes se obtuvo de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>).

El experimento de análisis transcriptómico se realizó en la UPV (Universidad Politécnica de Valencia) con la colaboración del doctor Eduardo Bueso en el laboratorio del Catedrático Ramón Serrano, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV).

### **3.17 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los datos obtenidos en la caracterización genética y fenotípica se analizaron utilizando la 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). 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 el

estadístico Chi-cuadrado. Como nivel de significación, se utilizó un p-valor de 0,05, 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 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 una de probabilidad de 0,05, asumiendo diferencias significativas entre las medias cuando los valores de significación fueron menores a este valor umbral.

Para el análisis de componentes principales (PCA) se utilizó el complemento *Multibase 2014* para Excel. Los valores del componente principal 1, que es el que más contribuye a la varianza, se utilizaron para realizar el test HSD de Tukey para definir los subconjuntos homogéneos utilizando el programa *IBM SPSS Statistics 22*. Como nivel de significación se empleó un alfa igual a 0,05.

Los análisis estadísticos de los resultados de los análisis transcriptómicos se han comentado en el apartado anterior por considerarlo oportuno.

## **4. RESULTADOS**

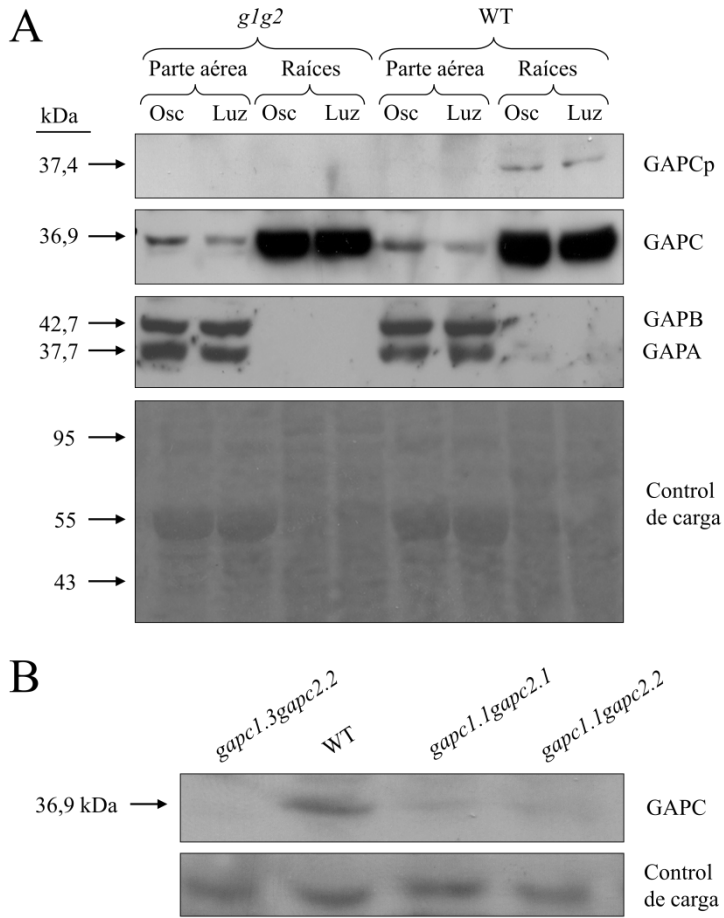
---



#### 4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ISOFORMAS DE LA GAPDH

Con el fin de dilucidar las funciones biológicas de las GAPDHs en *Arabidopsis*, estudiamos las abundancias de sus isoformas fotosintéticas y no fotosintéticas en plantas silvestres durante el periodo luminoso y oscuro, tanto en partes aéreas como en raíces (Figura 4.1A). El western blot realizado utilizando anticuerpos específicos de las distintas isoformas de la GAPDH mostró que las isoformas glicolíticas GAPC y GAPCp estaban presentes principalmente en las raíces, mientras las isoformas fotosintéticas GAPA y GAPB estaban presentes exclusivamente en las partes aéreas. Al contrario de lo esperado, las isoformas glicolíticas no eran más abundantes en oscuridad que durante el periodo luminoso tanto en partes aéreas como en raíces, y las isoformas GAPA y GAPB tenían una abundancia similar durante el periodo luminoso y de oscuridad. La ausencia de señal de GAPCp en la parte aérea no descarta que esta proteína pudiera encontrarse en este órgano, ya que los mRNA *GAPCp1* y *GAPCp2* se encontraron claramente en hojas, tallos y órganos reproductores (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Sin embargo, la mayor abundancia de las isoformas glicolíticas en las raíces sugiere que están más activas en estos órganos que en las hojas de las rosetas.

Estudiamos en paralelo la abundancia de las GAPDHs en las plantas *g1g2*. Este análisis mostró que ninguna de las isoformas, glicolíticas o fotosintéticas eran más abundantes en estos mutantes en comparación con las plantas silvestres (Figura 4.1A). Estos resultados muestran que la ausencia de la enzima GAPCp no está compensada por las otras isoformas a nivel de expresión proteica.



**Figura 4.1.** A, Análisis western blot de las isoformas fosforilativas de la GAPDH en parte aérea y raíz de plantas mutantes *glg2* y plantas silvestres (WT). Como control de carga se muestra en la parte inferior la membrana teñida con rojo Ponceau. Abreviaturas: Osc. = oscuridad. B, Western blot de las plantas mutantes dobles *gapc1.1gapc2.1*, *gapc1.1gapc2.2* y *gapc1.3gapc2.2*. El control de carga es una banda inespecífica.

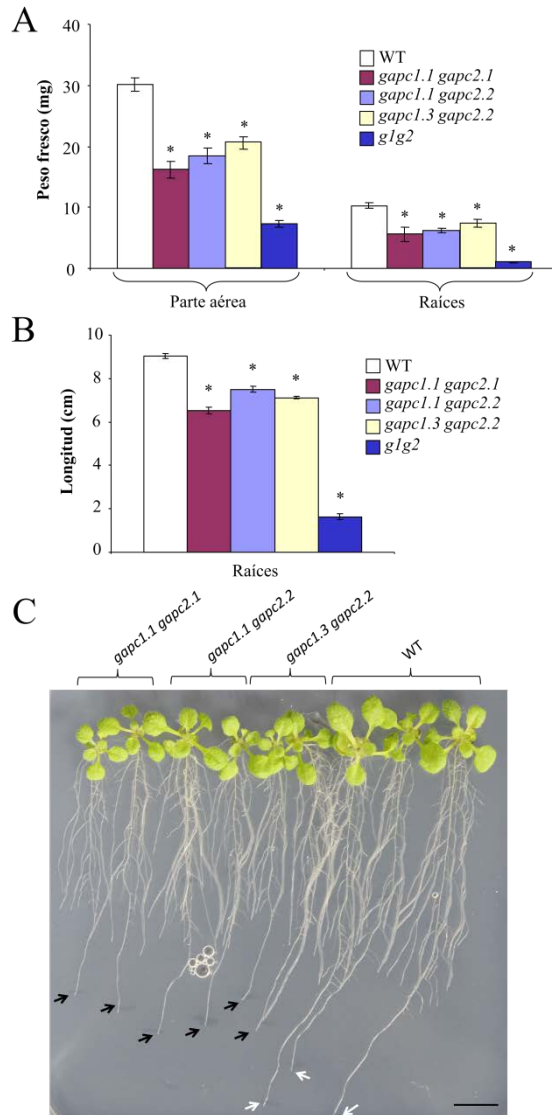


#### 4.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS LÍNEAS MUTANTES DE LAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS Y PLASTIDIALES

Con el fin de estudiar la función *in vivo* de las isoformas glicolíticas de la GAPDH, realizamos una caracterización fenotípica de plantas mutantes. Se caracterizaron tres líneas mutantes dobles de las isoformas citosólicas de la GAPDH (GAPC1 y GAPC2). Análisis previos realizados por Guo y colaboradores (2012) mostraron que los mutantes simples de la GAPC1 (*gapc1.1* y *gapc1.2*) y de la GAPC2 (*gapc2.1* y *gapc2.2*) eran mutantes nulos, y con ellos obtuvieron las líneas mutantes dobles *gapc1.1gapc2.1* y *gapc1.2gapc2.2*. Por otra parte en esta tesis doctoral obtuvimos las plantas mutantes dobles *gapc1.3gapc2.2*.

Para comprobar si la GAPC no estaba presente en los mutantes dobles, realizamos un western blot con proteínas extraídas de estas tres líneas (Figura 4.1B). El resultado mostró que las plantas silvestres tenían GAPC pero las plantas mutantes no, o al menos tenían muy poca proteína, confirmando que los mutantes dobles tenían al menos una expresión reducida.

Siguiendo con la caracterización, los resultados del peso de la parte aérea y raíz, y de la longitud de la raíz principal mostraron que las tres líneas tenían valores significativamente más pequeños que los de las plantas control en condiciones estándar de crecimiento. Sin embargo, el fenotipo observado es menos acentuado que el observado cuando se comparan las plantas *g1g2*, deficientes en las isoformas plastidiales de la GAPDH, respecto al control. Comentar también, que las tres líneas mutantes dobles tuvieron valores significativamente mayores que las plantas *g1g2* para los tres parámetros estudiados (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Caracterización fenotípica de las plantas mutantes dobles *gap1gap2* de las isoformas citosólicas de la GAPDH y de las plantas control (WT). Se muestra el peso fresco de la parte aérea y raíz (A) y la longitud de la raíz principal (B). Tanto en A como en B las barras representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 30$ ) de los parámetros medidos en plantas de 18 días crecidas *in vitro* en condiciones estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plantas control ( $P < 0,05$ ). C, Foto de plántulas de 18 días crecidas *in vitro*. Las flechas negras y blancas indican el final del crecimiento de la raíz primaria para las plantas mutantes dobles y WT, respectivamente. Escala = 1 cm.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE LOS MUTANTES DOBLES DE LAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS DE LA GAPDH

Como hemos visto en el apartado anterior, los mutantes de las isoformas citosólicas (*gapc1gapc2*) presentan un fenotipo menos acentuado que los mutantes de las isoformas plastidiales (*glg2*) tanto a nivel de parte aérea como de raíz (Figura 4.2). Por ello, decidimos realizar un análisis metabolómico para conocer cuáles eran los metabolitos alterados en las plantas mutantes dobles *gapc1gapc2* y *glg2* con respecto a las plantas silvestres. Para estos análisis se utilizaron las partes aéreas de plantas cultivadas en presencia de luz y recogidas al final del periodo luminoso.

A pesar de la baja abundancia de GAPC y GAPCp en la parte aérea, el perfil metabólico de plantas *gapc1gapc2* y *glg2* confirmó que en hojas de roseta estos mutantes presentan cambios significativos en su contenido en metabolitos respecto a las plantas control (Tabla 4.1).

Una vez conocida la existencia de diferencias entre las líneas estudiadas, realizamos un estudio más detallado fijándonos en los 42 metabolitos analizados (Tabla 4.1). Al comparar las plantas silvestres con las plantas mutantes dobles *gapc1gapc2* y *glg2*, pudimos observar cambios significativos en un 31% (13 de 42) o en un 66,7% (28 de 42) de los metabolitos analizados, respectivamente. Si nos fijamos en los metabolitos que cambian significativamente en más de un 40% podemos ver que las diferencias se acentúan, ya que para la línea *gapc1gapc2* solo encontramos 4 metabolitos (menos del 10% del total) y por el contrario para la línea *glg2* encontramos 19 (que representa el 45,2%).

**Tabla 4.1.** Niveles de metabolitos en plantas silvestres (WT), mutantes (*gapc1gapc2* y *g1g2*), y mutantes *g1g2* transformadas (RBCS:G1 y 35S:G1) crecidas en medio de cultivo estándar y recogidas al final del periodo luminoso. Los datos son relativos y normalizados con respecto a la media calculada para el WT. Los valores representan la media  $\pm$  SE de al menos 6 repeticiones independientes y los que están en negrita son significativamente distintos a los valores del WT ( $P < 0,05$ ).

Línea	WT	<i>gapc1gapc2</i>	<i>g1g2</i>	RBCS:G1	35S:G1
<b>Aminoácidos</b>					
Alanina	1 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,06	<b>0,86 <math>\pm</math> 0,03</b>	0,95 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,04
Arginina	1 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,05
Asparagina	1 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,11	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,29</b>	<b>1,83 <math>\pm</math> 0,23</b>	1,16 $\pm$ 0,26
Aspartato	1 $\pm$ 0,04	<b>1,22 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>1,51 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>1,51 <math>\pm</math> 0,06</b>	0,91 $\pm$ 0,04
GABA	1 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,05	<b>1,31 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>1,54 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,03</b>
Glutamato	1 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,07	<b>1,76 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>1,64 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>1,33 <math>\pm</math> 0,03</b>
Glutamina	1 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,07	<b>1,94 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>2,01 <math>\pm</math> 0,08</b>	1,16 $\pm$ 0,07
Glicina	1 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,07	<b>1,40 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>1,30 <math>\pm</math> 0,20</b>	0,87 $\pm$ 0,02
Histidina	1 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,13	<b>1,34 <math>\pm</math> 0,09</b>	0,77 $\pm$ 0,11
Isoleucina	1 $\pm$ 0,05	<b>1,33 <math>\pm</math> 0,07</b>	0,89 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,04	<b>0,59 <math>\pm</math> 0,02</b>
Lisina	1 $\pm$ 0,04	<b>1,24 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>1,19 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,22 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>0,68 <math>\pm</math> 0,03</b>
Metionina	1 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,10	1,13 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,03
Ornitina	1 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,04
Fenilalanina	1 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,07	<b>1,16 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>0,62 <math>\pm</math> 0,02</b>
Prolina	1 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,07	<b>1,23 <math>\pm</math> 0,05</b>	0,93 $\pm$ 0,05
Serina	1 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,05
Treonina	1 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,04	<b>0,87 <math>\pm</math> 0,03</b>
Triptófano	1 $\pm$ 0,09	1,32 $\pm$ 0,15	1,22 $\pm$ 0,14	<b>1,72 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>0,45 <math>\pm</math> 0,03</b>
Tirosina	1 $\pm$ 0,06	<b>1,55 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,30 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,68 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>0,54 <math>\pm</math> 0,03</b>
Valina	1 $\pm$ 0,05	<b>1,19 <math>\pm</math> 0,06</b>	0,96 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,04	<b>0,70 <math>\pm</math> 0,02</b>

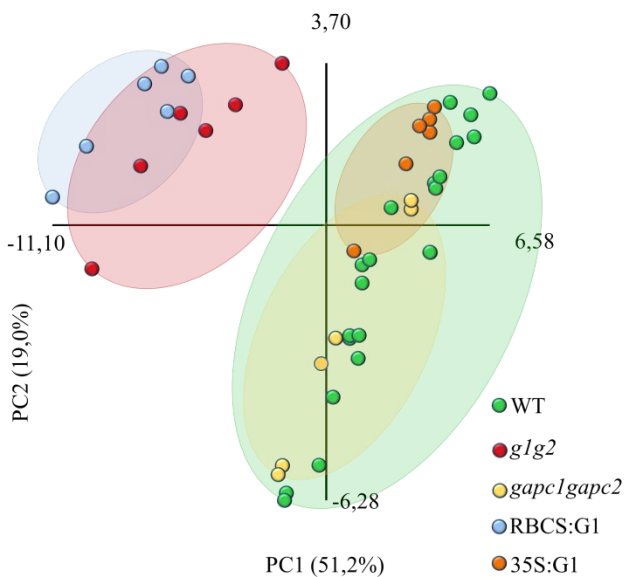
Tabla 4.1. Continuación.

Línea	WT	<i>gapc1gapc2</i>	<i>glg2</i>	RBCS:G1	35S:G1
<b>Ácidos orgánicos</b>					
Citrato	1 ± 0,05	<b>1,25 ± 0,10</b>	<b>2,57 ± 0,23</b>	<b>3,12 ± 0,19</b>	1,12 ± 0,08
Dehidroascorbato	1 ± 0,07	<b>0,75 ± 0,09</b>	1,16 ± 0,22	0,69 ± 0,13	1,03 ± 0,15
Fumarato	1 ± 0,04	1,06 ± 0,07	<b>1,71 ± 0,07</b>	<b>2,00 ± 0,30</b>	0,96 ± 0,04
Glicerato	1 ± 0,05	1,21 ± 0,08	<b>3,18 ± 0,30</b>	<b>2,85 ± 0,21</b>	<b>1,60 ± 0,07</b>
Malato	1 ± 0,03	1,13 ± 0,07	<b>1,20 ± 0,07</b>	<b>1,33 ± 0,05</b>	<b>0,87 ± 0,04</b>
Piruvato	1 ± 0,04	1,20 ± 0,08	<b>1,33 ± 0,07</b>	<b>1,28 ± 0,07</b>	1,07 ± 0,04
Succinato	1 ± 0,04	<b>1,46 ± 0,09</b>	<b>1,20 ± 0,07</b>	<b>1,15 ± 0,04</b>	<b>1,22 ± 0,05</b>
<b>Azúcares y alcoholes de azúcar</b>					
Eritritol	1 ± 0,04	1,00 ± 0,06	<b>0,58 ± 0,03</b>	<b>0,59 ± 0,03</b>	<b>0,75 ± 0,02</b>
Fucosa	1 ± 0,03	1,09 ± 0,06	<b>1,77 ± 0,10</b>	<b>1,87 ± 0,08</b>	1,04 ± 0,03
Fructosa	1 ± 0,06	<b>1,26 ± 0,07</b>	<b>2,71 ± 0,16</b>	<b>2,64 ± 0,08</b>	<b>1,46 ± 0,06</b>
Galactinol	1 ± 0,11	1,09 ± 0,07	<b>8,86 ± 0,46</b>	<b>26,63 ± 1,18</b>	<b>0,53 ± 0,02</b>
Glicerol-3-P	1 ± 0,05	1,16 ± 0,08	0,94 ± 0,05	<b>0,86 ± 0,03</b>	1,11 ± 0,05
Glucosa	1 ± 0,05	<b>1,45 ± 0,11</b>	<b>2,92 ± 0,13</b>	<b>3,15 ± 0,11</b>	1,30 ± 0,13
Glucosa-6-P	1 ± 0,04	1,02 ± 0,08	<b>0,68 ± 0,06</b>	<b>0,38 ± 0,02</b>	<b>1,34 ± 0,07</b>
Mioinositol	1 ± 0,03	1,13 ± 0,07	<b>2,61 ± 0,13</b>	<b>3,10 ± 0,30</b>	1,06 ± 0,04
Rafinosa	1 ± 0,09	<b>1,57 ± 0,10</b>	<b>8,33 ± 0,45</b>	<b>19,07 ± 0,78</b>	<b>1,22 ± 0,11</b>
Ramnosa	1 ± 0,03	0,97 ± 0,05	<b>1,24 ± 0,07</b>	<b>1,37 ± 0,06</b>	<b>0,84 ± 0,03</b>
Sacarosa	1 ± 0,03	1,13 ± 0,07	1,04 ± 0,05	1,10 ± 0,05	<b>1,21 ± 0,04</b>
Trehalosa	1 ± 0,03	1,05 ± 0,07	<b>1,47 ± 0,09</b>	<b>1,41 ± 0,06</b>	1,04 ± 0,04
Xilosa	1 ± 0,03	<b>1,21 ± 0,07</b>	<b>2,38 ± 0,13</b>	<b>2,57 ± 0,09</b>	<b>1,13 ± 0,03</b>
<b>Otros</b>					
Ácido fosfórico	1 ± 0,06	<b>0,65 ± 0,05</b>	<b>0,13 ± 0,01</b>	<b>0,06 ± 0,02</b>	0,99 ± 0,07
Tiramina	1 ± 0,07	0,84 ± 0,10	<b>1,89 ± 0,21</b>	<b>2,16 ± 0,19</b>	1,25 ± 0,09

Para evaluar la importancia de estas diferencias encontradas se realizó en segundo lugar un PCA, mostrando que el perfil metabólico de los mutantes dobles *gapc1gapc2* es muy parecido al perfil de las plantas silvestres. Por otro lado, el análisis muestra que los mutantes dobles *g1g2* están bastante separados respecto al control y a *gapc1gapc2* (Figura 4.3).

Una vez obtenido el PCA realizamos un análisis estadístico mediante el test de Tukey del componente principal 1 (PC1). Este análisis definió dos subconjuntos homogéneos, el primero formado por las plantas *g1g2* y el segundo formado por las plantas silvestres y *gapc1gapc2* (Tabla 4.2).

Estos resultados indican que las funciones de la GAPC y de la GAPCp no son redundantes y que no pueden complementarse entre sí totalmente. Indican también la importancia de la GAPCp para el metabolismo de la parte aérea.



**Figura 4.3.** Categorización según el análisis de componentes principales (PCA) de las líneas analizadas por metabolómica *gapc1gapc2*, *g1g2*, *g1g2* RBCS:G1 (RBCS:G1), *g1g2* 35S:G1 (35S:G1) y plantas silvestres (WT). Cada punto representa el conjunto de metabolitos de una repetición y cada línea está formada de 6 repeticiones. Los componentes principales 1 y 2 (PC1 y PC2, respectivamente) representan juntos el 70,2% de la varianza observada.

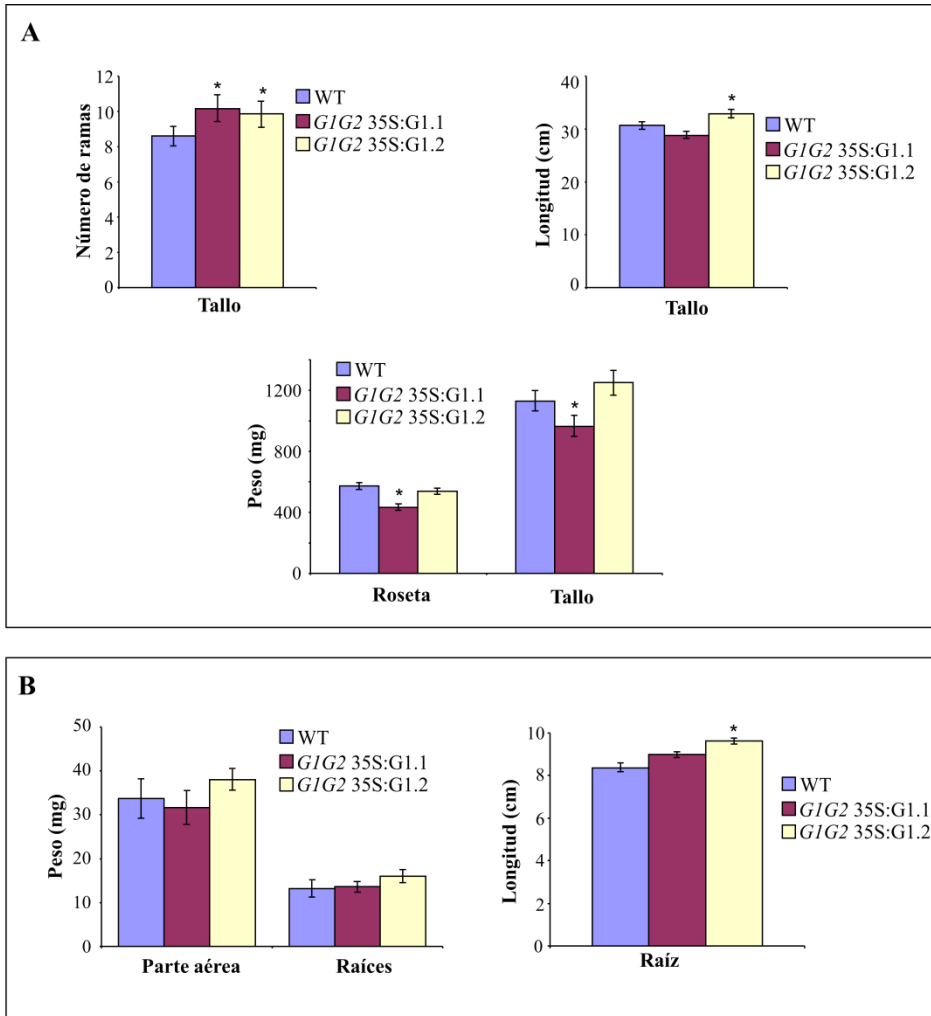
**Tabla 4.2.** Análisis del componente principal 1 (PC1) según el test HSD de Tukey en las líneas ensayadas *gapc1gapc2*, *g1g2*, RBCS:G1, 35S:G1 y plantas silvestres (WT). El PC1 representa el 51,2% de la varianza en el análisis de los componentes principales. La significación indica que no hay diferencia entre los miembros de un mismo grupo (alfa = 0,05). n representa el número de repeticiones.

Línea	n	Subconjunto	
		a	b
WT	22	2,62	
<i>gapc1 gapc2</i>	6	0,49	
35S:G1	6	3,42	
<i>g1g2</i>	6		-5,62
RBCS:G1	6		-7,90

Además de estos análisis metabolómicos con *gapc1gapc2* y *g1g2*, se sembraron y analizaron al mismo tiempo otras líneas (*g1g2* 35S:G1 y *g1g2* RBCS:G1) cuyos resultados se analizarán más adelante.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS LÍNEAS SOBREEXPRESORAS DE LA GAPCP1.

Para determinar si la sobreexpresión del gen *GAPCp1* tenía efectos en el fenotipo se caracterizaron plantas silvestres y sobreexpresoras [plantas silvestres que tenían el gen *GAPCp1* bajo el control del *Pro35S* (*GIG2* 35S:G1.1 y *GIG2* 35S:G1.2)], tanto en condiciones estándar de crecimiento *in vitro* como en invernadero. Estas plantas transgénicas fueron obtenidas por Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009). Los resultados obtenidos en invernadero mostraron en algunos parámetros medidos unas diferencias significativas de las líneas sobreexpresoras con respecto a los controles (Figura 4.4A). En condiciones *in vitro* estas líneas no mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas control para los parámetros medidos, salvo en el caso de la longitud de la raíz principal donde la línea *GIG2* 35S:G1.2 tuvo un valor significativamente superior al de las plantas control (Figura 4.4B).



**Figura 4.4.** Parámetros fenotípicos de plantas sobreexpresoras del gen *GAPCp1* (*GIG2* 35S:G1.1 y *GIG2* 35S:G1.2) y de las plantas control (WT). A, Plantas de 50 días crecidas en invernadero. B, Plantas de 21 días crecidas *in vitro*. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 30$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plantas WT ( $P < 0,05$ ).



#### 4.5. EXPRESIÓN DE LA GAPCp1 EN PARTES AÉREAS DE ARABIDOPSIS

Como acabamos de ver, la ausencia de GAPCp1 en las plantas *g1g2* provoca una alteración profunda en los niveles en azúcares y ácidos orgánicos de la parte aérea (Tabla 4.1). Debido a estos cambios tan drásticos, quisimos investigar el papel específico de la GAPCp1 en la parte aérea utilizando promotores específicos de este órgano (*ProRBCS* y *ProCAB*). Seleccionamos los dos promotores porque según las bases de datos (<http://bar.utoronto.ca/>) permiten una expresión elevada en los órganos de la parte aérea, pero muy poca o nula en raíces.

Nuestra hipótesis utilizando estos promotores sería que la sobreexpresión de la GAPCp1, en las células fotosintéticas de las plantas mutantes dobles, debería de permitir el restablecimiento de un balance en azúcares idéntico a las plantas silvestres y complementar el fenotipo de las plantas *g1g2*. Para obtener estas líneas transgénicas, y dado que las plantas mutantes dobles *g1g2* son estériles, se transformaron plantas heterocigotas *g1g1 G2g2* con las construcciones génicas *ProRBCS:GAPCp1* y *ProCAB:GAPCp1* para obtener las líneas *g1g1 RBCS:GAPCp1* (RBCS:G1) y *g1g1 CAB:GAPCp1* (CAB:G1) respectivamente, mediante selección en la descendencia de los individuos doble mutantes homocigotos.

La Tabla 4.3 presenta las líneas transformantes obtenidas en cada etapa del proceso de selección de líneas homocigotas y de una sola inserción para el transgén. En la generación T<sub>3</sub> se obtuvieron 10 y 5 líneas transgénicas *g1g1 G2g2 RBCS:G1* y *g1g1 G2g2 CAB:G1*, respectivamente.

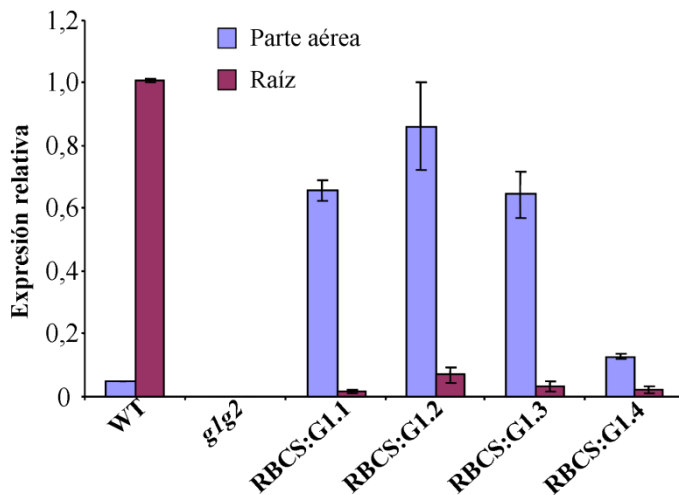
Dado que el *ProCAB* está sujeto al ritmo circadiano y que las líneas *g1g1 G2g2 CAB:G1* siempre producían plantas *g1g2 CAB:G1* estériles, seguimos el estudio con las plantas *g1g1 G2g2 RBCS:G1*. De estas últimas, 4 líneas transgénicas produjeron plantas *g1g2 RBCS:G1* fértiles; nombramos a estas líneas RBCS:G1.1 a RBCS:G1.4.

**Tabla 4.3.** Líneas transgénicas obtenidas tras transformar las plantas *g1g1 G2g2* con las construcciones *ProRBCS:G1* (líneas RBCS:G1) y *ProCAB:G1* (líneas CAB:G1).

Generación	RBCS:G1			CAB:G1		
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Número de plantas transformantes	49	12	10	17	11	5

#### 4.5.1. Patrón de expresión de *GAPCp1* en las plantas *g1g2 RBCS:G1*.

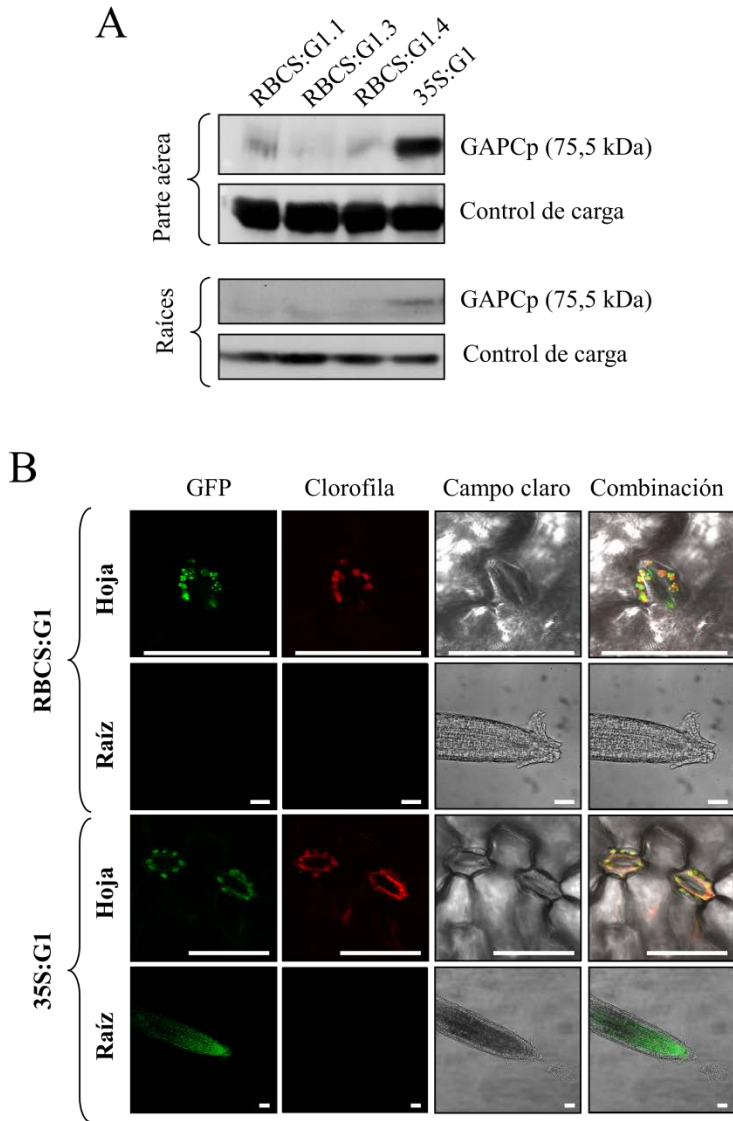
Con el fin de seleccionar las mejores líneas *g1g2 RBCS:G1* para su posterior caracterización, se cuantificó la expresión relativa del gen *GAPCp1* en las partes aéreas y raíces mediante RT-qPCR (Figura 4.5). Las cuatro líneas evaluadas tenían niveles superiores de expresión en las partes aéreas cuando se compararon con las plantas control, desde 2,6 a 17 veces más en las líneas RBCS:G1.4 y RBCS:G1.2, respectivamente. En raíces las líneas RBCS:G1.1 y RBCS:G1.4 mostraron los valores más reducidos de expresión con respecto al control, entre un 98% y un 93% de reducción respectivamente. Con estos resultados, los niveles de expresión reflejaban una sobreexpresión específica de la *GAPCp1* en las partes aéreas. Dado que nuestro objetivo era estudiar el papel de la *GAPCp1* en la parte aérea, seleccionamos para el resto de los análisis las líneas RBCS:G1.1, RBCS:G1.3 y RBCS:G1.4 por tener valores bajos de expresión en las raíces.



**Figura 4.5.** Expresión relativa del gen *GAPCp1* en las partes aéreas y en las raíces de las líneas *glg2*, *glg2* RBCS:G1 y control (WT). El nivel de expresión en las raíces del WT se usó como referencia. La RT-qPCR se realizó con material de plántulas de 21 días. Se representa el valor medio  $\pm$  SE;  $n = 3$  réplicas biológicas independientes.

#### 4.5.2. Expresión de la proteína GAPCp1 en las líneas transformantes

En el apartado anterior, hemos demostrado que las líneas *glg2* RBCS:G1 seleccionadas sobreexpresan el gen *GAPCp1* en la parte aérea. Para saber si los transcritos presentes en hojas y raíces se traducen a proteínas, hemos realizado un western blot con muestras de plántulas de 21 días (Figura 4.6A). Los resultados muestran que en las plantas *glg2* RBCS:G1 la enzima GAPCp1 está presente en parte aérea pero ausente en raíces en nuestras condiciones experimentales. Como control positivo se utilizó una línea *glg2* 35S:G1, caracterizada previamente en nuestro grupo, que mostraba la presencia de la proteína tanto en parte aérea como en raíces. Recordamos que en todas las construcciones empleadas la GAPCp1 está fusionada a la proteína GFP, motivo por el cual las bandas obtenidas tienen un tamaño de 75,5 kDa, superior al tamaño 37,4 kDa de la GAPCp1.



**Figura 4.6.** A, Abundancia de la GAPCp1 en partes aéreas y raíces de plantas *glg2* RBCS:G1 y *glg2* 35S:G1. El anticuerpo usado es específico de la GFP. El control de carga es una banda inespecífica. B, Localización subcelular de la GAPCp1 en plantas *glg2* BCS:G1 y *glg2* 35S:G1. Escala = 50µm.

#### **4.5.3. Localización subcelular de la proteína GAPCp1 bajo el control del *ProRBCS*.**

La fusión de la GAPCp1 con la GFP en las líneas *glg2 RBCS:G1* nos permitió analizar la localización subcelular de la GAPCp1. Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal muestran que en estas líneas la GAPCp1 está localizada específicamente en los cloroplastos (Figura 4.6B). Las plantas *glg2 35S:G1* se usaron como control, ya que se había descrito previamente que expresan la GAPCp1-GFP no solo en los cloroplastos sino también en los plastos de la raíz (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Este experimento nos permitió también confirmar la ausencia de la GAPCp1 en las raíces de las plantas *glg2 RBCS:G1* como se indicó anteriormente con el análisis western blot.

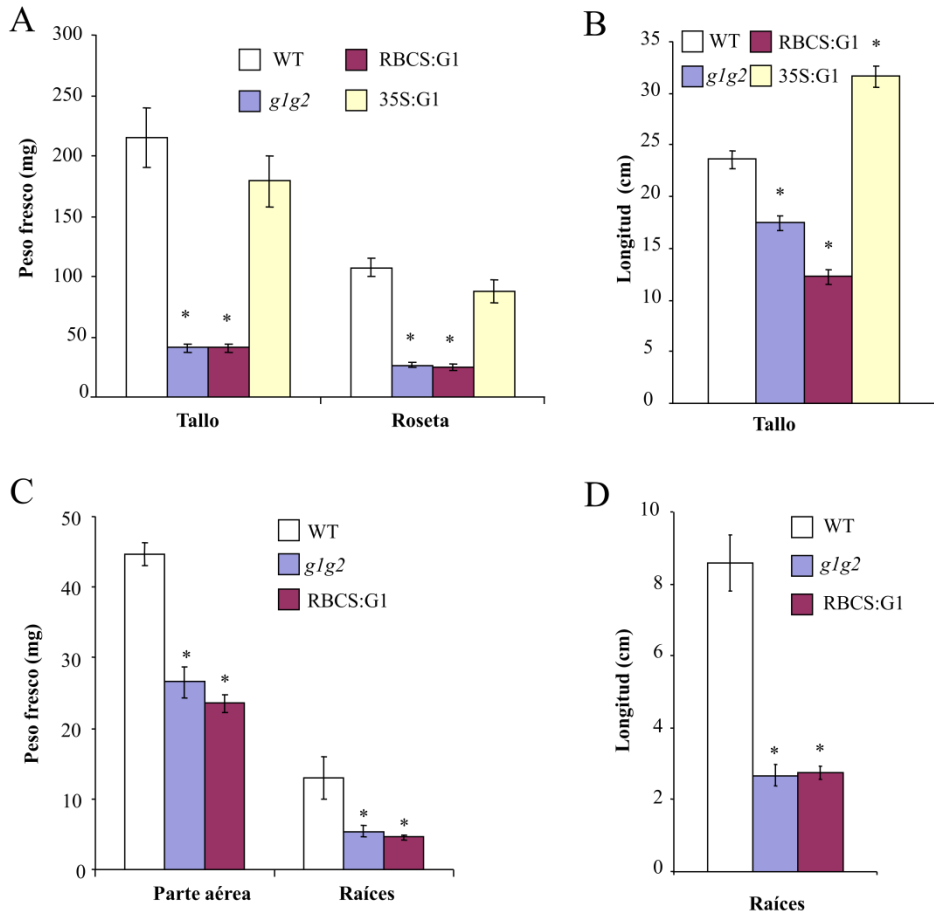
#### **4.5.4. Caracterización fenotípica de las plantas que expresan la GAPCp1 en las partes aéreas.**

Tras demostrar que la proteína de fusión GAPCp1-GFP estaba presente en las hojas y ausente en raíces de las líneas *glg2 RBCS:G1*, procedimos a su caracterización. Esta caracterización se realizó *in vitro* y en el invernadero. Las plantas *glg2 RBCS:G1* presentaban un fenotipo visual idéntico a las plantas *glg2* en el estadio de plántula. Estas plantas eran enanas y tenían un peso idéntico al de las plantas *glg2*, tanto en el estadio de plántulas como en el estadio de plantas adultas. Sin embargo, las plantas *glg2 RBCS:G1* eran fértiles, tenían un tallo más corto y menos ramas que las plantas *glg2* (Figura 4.7 y Figura 4.8). Lo mismo ocurría entre las plantas silvestres y las plantas *glg2 35S:G1* que tenían un peso de tallo y de roseta estadísticamente idéntico, pero las plantas silvestres tenían un tallo más corto que las plantas *glg2 35S:G1* que eran estériles (Figura 4.7 y Figura 4.8A y B). Estos resultados corroboran que la expresión de la GAPCp1 en los tejidos no fotosintéticos de la parte aérea es necesaria para la fertilidad de *Arabidopsis* (Muñoz-Bertomeu y col., 2010) y confirman que la GAPCp1 es activa en las líneas *glg2 RBCS:G1*. Nuestros resultados indican también que la presencia de la

GAPCp en las células fotosintéticas bajo el promotor RBCS no permitió una complementación del fenotipo de retraso en el crecimiento que presentan la roseta y las raíces cuando las plantas se cultivaron en placas o en macetas.



**Figura 4.7.** Fotografía de silicuas y de plantas control (WT) y líneas *glg2* 35S:G1, *glg2* y *glg2* RBCS:G1 de 50 días de edad crecidas en invernadero.



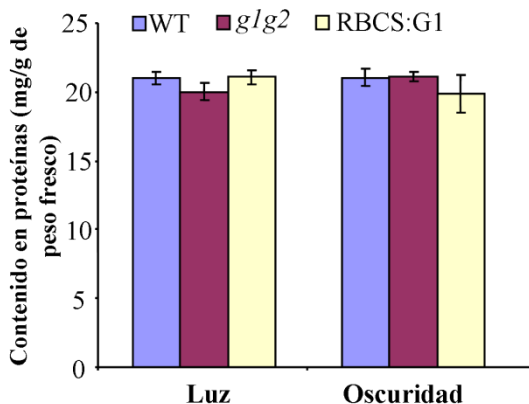
**Figura 4.8.** Caracterización fenotípica de plantas crecidas en invernadero (A y B) e *in vitro* (C y D). Se ensayaron plantas control (WT), *glg2*, *glg2* RBCS:G1 y *glg2* 35S:G1. En invernadero, el peso fresco del tallo y de la roseta y la longitud del tallo se midieron en plantas de 50 días. *In vitro*, el peso fresco de la parte aérea, de la raíz y la longitud de la raíz se midieron en plántulas de 21 días. Los valores son la media por planta  $\pm$  SE ( $n \geq 30$ ). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto a las plantas WT ( $P < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta que en trabajos previos se determinó que los mutantes *glg2* tenían un contenido en proteína total similar al de los controles (Muñoz-Bertomeu y col., 2009), y que nuestras plantas *glg2* RBCS:G1 que sobreexpresan la GAPCp1 en las partes aéreas tienen un fenotipo en estadio de plántula similar a *glg2*, fue de interés evaluar si esta sobreexpresión permitía tener un contenido en proteína más elevado que en las plantas control.

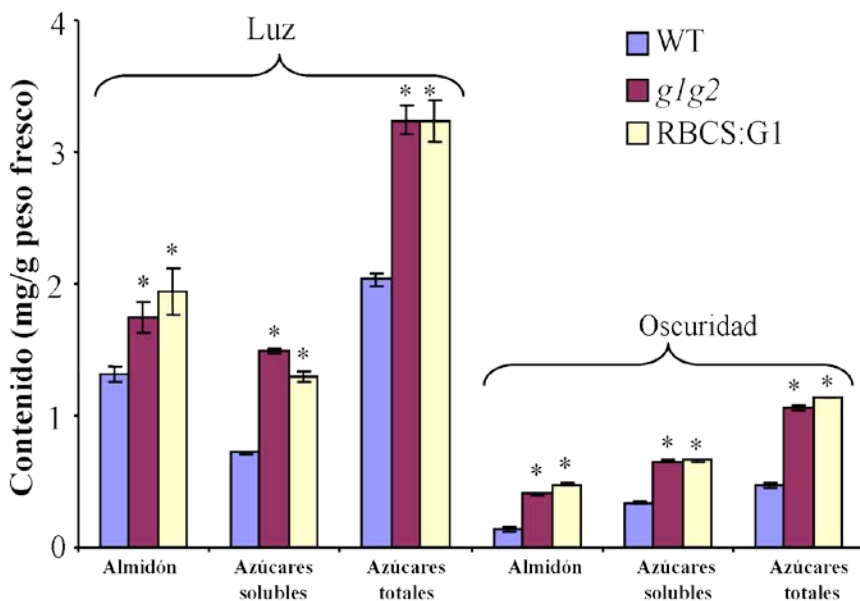
Nuestros resultados muestran que tanto en presencia de luz como en oscuridad, no hay ninguna diferencia significativa en cuanto al contenido en proteínas entre las plantas silvestres y las plantas *glg2* y *glg2* RBCS:G1 (Figura 4.9).

Los valores obtenidos del contenido en almidón y en azúcares solubles en los mutantes *glg2* mostraron que éstos eran superiores a los de las plantas control (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Dado que las plantas *glg2* RBCS:G1 sobreexpresan la GAPCp1 implicada en la glicólisis y podrían tener unos contenidos en azúcares más bajos, evaluamos los contenidos en almidón, en azúcares solubles y en azúcares totales tanto en presencia de luz como en oscuridad. Los resultados muestran que en los tres parámetros medidos las plantas *glg2* y *glg2* RBCS:G1 tenían valores significativamente más elevados que las plantas control (Figura 4.10).



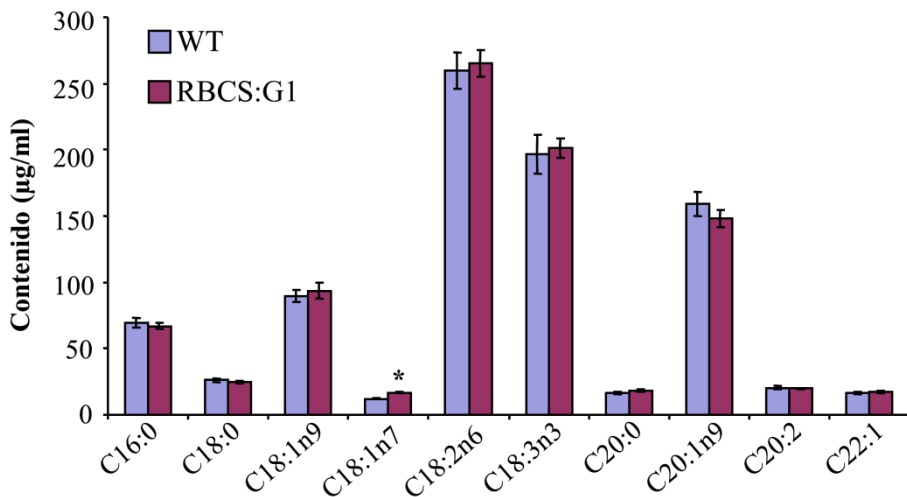


**Figura 4.9.** Evaluación del contenido en proteínas en las partes aéreas de plántulas de 21 días crecidas *in vitro* de líneas control (WT), *glg2* y *glg2* RBCS:G1. Los valores representan la media  $\pm$  SE (n = 3).



**Figura 4.10.** Contenido en almidón, en azúcares solubles y en azúcares totales en partes aéreas de plántulas de 21 días crecidas *in vitro* de líneas control (WT), *glg2* y *glg2* RBCS:G1. La determinación del contenido (mg/g de peso fresco) se ha hecho a mitad del periodo de luz y al final del periodo oscuro. Los valores representan la media  $\pm$  SE (n  $\geq$  6). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto a las plantas WT (P < 0,05).

Dado que el contenido en azúcares puede tener una influencia sobre la producción de aceites en las semillas, fue de interés medir el contenido en ácidos grasos y en aceites en las líneas *g1g2* RBCS:G1. Los resultados del análisis de las semillas mostraron que los valores en ácidos grasos totales fueron significativamente inferiores en las plantas *g1g2* RBCS:G1 con respecto a las plantas silvestres ( $230 \pm 7$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso fresco con respecto a  $263 \pm 10$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso fresco, respectivamente). Sin embargo, los contenidos en la mayoría de los ácidos grasos medidos individualmente eran similares en las plantas *g1g2* RBCS:G1 con respecto a las plantas silvestres (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Contenido en ácidos grasos medidos en semillas de plantas control (WT) y *g1g2* RBCS:G1. Los valores representan la media  $\pm$  SE (n=3). Los asteriscos representan valores significativamente distintos de las plantas WT ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5.5. Perfil metabólico

Los análisis metabólicos de las plantas *g1g2* RBCS:G1 se realizaron conjuntamente con los realizados para las líneas *g1g2*, *g1g2* 35S:G1 y plantas control para poder ser comparados entre sí (Tabla 4.1). Al igual que las plantas *g1g2*, el perfil metabólico de las líneas *g1g2* RBCS:G1 estuvo profundamente alterado con respecto a los controles. Casi todos los cambios significativos en las plantas *g1g2* lo eran también en las plantas *g1g2* RBCS:G1 (27 de 28 metabolitos). En estas plantas el 76% de los metabolitos (32 de 42) estaba significativamente alterado con respecto a las plantas control. Además, el 52% de los metabolitos medidos (22 de 42) estaba alterado en más de un 40% respecto a los controles. El PCA confirmó que las líneas *g1g2* RBCS:G1 son similares a los mutantes dobles *g1g2* (Figura 4.3), y el análisis estadístico del PC1 (que representa el 51,2 % de la varianza) también lo confirma (Tabla 4.2).

En los apartados anteriores hemos podido demostrar que las líneas *g1g2* RBCS:G1 sobreexpresan la enzima GAPCp1 en las células fotosintéticas (Figura 4.5 y Figura 4.6). Para saber si la GAPCp1 puede tener una función en estas células fotosintéticas en otras condiciones ambientales, como por ejemplo cuando la actividad fotosintética está inhibida y la actividad glicolítica por tanto sería mayor, determinamos los niveles de metabolitos al final del periodo oscuro o en presencia de sacarosa en el periodo luminoso en plantas *g1g2*, *g1g2* RBCS:G1 y plantas silvestres (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Niveles de metabolitos en plantas control (WT), *g/g2* y RBCS:G1 crecidas en varios medios de cultivo y recogidas al final del periodo oscuro (Oscuridad) o al final del periodo luminoso (Luz). Los datos son relativos y normalizados con respecto a la media calculada para el WT. Los valores representan la media  $\pm$  SE de 6 repeticiones independientes. Los valores en **negrita** indican que son significativamente distintos a los valores del WT ( $P < 0,05$ ).

	Luz											
	Oscuridad					Medio estándar + 2% Sacarosa					Medio estándar + 0,1mM serina	
	WT	Medio estándar <i>g/g2</i>	RBCS:G1	WT	Medio estándar <i>g/g2</i>	RBCS:G1	WT	Medio estándar + 2% Sacarosa <i>g/g2</i>	RBCS:G1	WT	Medio estándar + 0,1mM serina <i>g/g2</i>	
<b>Aminoácidos</b>												
Alanina	1 $\pm$ 0,02	<b>1,58 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,35 <math>\pm</math> 0,06</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>1,47 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,48 <math>\pm</math> 0,08</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>1,48 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,48 <math>\pm</math> 0,08</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>0,91 <math>\pm</math> 0,03</b>	
Arginina	1 $\pm$ 0,03	<b>1,29 <math>\pm</math> 0,09</b>	1,08 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,04	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>2,00 <math>\pm</math> 0,12</b>	-	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>2,00 <math>\pm</math> 0,12</b>	-	-	
Asparagina	1 $\pm$ 0,12	1,34 $\pm$ 0,17	1,21 $\pm$ 0,20	1 $\pm$ 0,17	<b>3,19 <math>\pm</math> 0,50</b>	<b>3,88 <math>\pm</math> 0,48</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>3,19 <math>\pm</math> 0,50</b>	<b>3,88 <math>\pm</math> 0,48</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>1,28 <math>\pm</math> 0,07</b>	
Aspartato	1 $\pm$ 0,03	<b>1,92 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>1,84 <math>\pm</math> 0,11</b>	1 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,05	1 $\pm$ 0,07	1,13 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,05	1 $\pm$ 0,07	<b>1,42 <math>\pm</math> 0,14</b>	
Beta-Alanina	-	-	-	1 $\pm$ 0,03	<b>2,20 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>2,19 <math>\pm</math> 0,10</b>	1 $\pm$ 0,03	<b>2,20 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>2,19 <math>\pm</math> 0,10</b>	1 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,05	
GABA	1 $\pm$ 0,04	<b>1,31 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,28 <math>\pm</math> 0,06</b>	1 $\pm$ 0,03	<b>3,17 <math>\pm</math> 0,17</b>	<b>3,07 <math>\pm</math> 0,12</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>3,17 <math>\pm</math> 0,17</b>	<b>3,07 <math>\pm</math> 0,12</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>1,15 <math>\pm</math> 0,03</b>	
Glutamato	1 $\pm$ 0,03	<b>1,50 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,37 <math>\pm</math> 0,08</b>	1 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,06	1,09 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,06	<b>1,32 <math>\pm</math> 0,05</b>	
Glutamina	1 $\pm$ 0,04	<b>1,46 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>1,37 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,03	<b>1,23 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>1,32 <math>\pm</math> 0,08</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>1,23 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>1,32 <math>\pm</math> 0,08</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>1,39 <math>\pm</math> 0,09</b>	
Glicina	1 $\pm$ 0,05	<b>0,50 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,03</b>	1 $\pm$ 0,03	<b>1,42 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,44 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>1,42 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,44 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,04	
Hidroxiprolina	-	-	-	1 $\pm$ 0,05	<b>2,16 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,12</b>	-	<b>2,16 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,12</b>	-	-	
Histidina	1 $\pm$ 0,07	<b>1,53 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>1,54 <math>\pm</math> 0,16</b>	-	-	-	1 $\pm$ 0,05	-	-	1 $\pm$ 0,05	<b>1,29 <math>\pm</math> 0,10</b>	
Isoleucina	1 $\pm$ 0,04	<b>1,37 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>1,19 <math>\pm</math> 0,05</b>	-	-	-	1 $\pm$ 0,03	-	-	1 $\pm$ 0,03	<b>1,13 <math>\pm</math> 0,03</b>	
Lisina	1 $\pm$ 0,04	<b>1,48 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>1,26 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>2,49 <math>\pm</math> 0,27</b>	<b>2,26 <math>\pm</math> 0,17</b>	1 $\pm$ 0,05	<b>2,49 <math>\pm</math> 0,27</b>	<b>2,26 <math>\pm</math> 0,17</b>	1 $\pm$ 0,05	<b>1,28 <math>\pm</math> 0,07</b>	
Metionina	1 $\pm$ 0,06	<b>1,53 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,45 <math>\pm</math> 0,11</b>	1 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,07	1 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,07	1 $\pm$ 0,06	<b>1,35 <math>\pm</math> 0,07</b>	
Ornitina	1 $\pm$ 0,06	<b>1,34 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>1,31 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>1,56 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>1,69 <math>\pm</math> 0,09</b>	1 $\pm$ 0,06	<b>1,56 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>1,69 <math>\pm</math> 0,09</b>	1 $\pm$ 0,06	<b>1,39 <math>\pm</math> 0,08</b>	
Fenilalanina	1 $\pm$ 0,04	<b>1,64 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>1,67 <math>\pm</math> 0,08</b>	-	-	-	1 $\pm$ 0,04	-	-	1 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,05	
Prolina	1 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,96	<b>1,32 <math>\pm</math> 0,08</b>	1 $\pm$ 0,16	<b>3,74 <math>\pm</math> 0,28</b>	<b>2,32 <math>\pm</math> 0,39</b>	1 $\pm$ 0,01	<b>3,74 <math>\pm</math> 0,28</b>	<b>2,32 <math>\pm</math> 0,39</b>	1 $\pm$ 0,01	1,06 $\pm$ 0,04	
Serina	1 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,30	1,98 $\pm$ 0,98	1 $\pm$ 0,04	<b>1,18 <math>\pm</math> 0,05</b>	1,14 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,03	<b>1,18 <math>\pm</math> 0,05</b>	1,14 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,14	
Treonina	1 $\pm$ 0,03	<b>1,32 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>1,20 <math>\pm</math> 0,04</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>1,62 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,52 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,03	<b>1,62 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,52 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,03	
Triptófano	1 $\pm$ 0,06	<b>1,75 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>2,04 <math>\pm</math> 0,22</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>3,72 <math>\pm</math> 0,46</b>	<b>2,23 <math>\pm</math> 0,17</b>	1 $\pm$ 0,04	<b>3,72 <math>\pm</math> 0,46</b>	<b>2,23 <math>\pm</math> 0,17</b>	1 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,07	
Tirosina	1 $\pm$ 0,05	<b>1,75 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,42 <math>\pm</math> 0,08</b>	-	-	-	1 $\pm$ 0,04	-	-	1 $\pm$ 0,04	<b>1,39 <math>\pm</math> 0,14</b>	
Valina	1 $\pm$ 0,03	<b>1,37 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>1,23 <math>\pm</math> 0,06</b>	1 $\pm$ 0,02	<b>1,74 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,55 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,03	<b>1,74 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,55 <math>\pm</math> 0,07</b>	1 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,03	

**Tabla 4.4.** Continuación

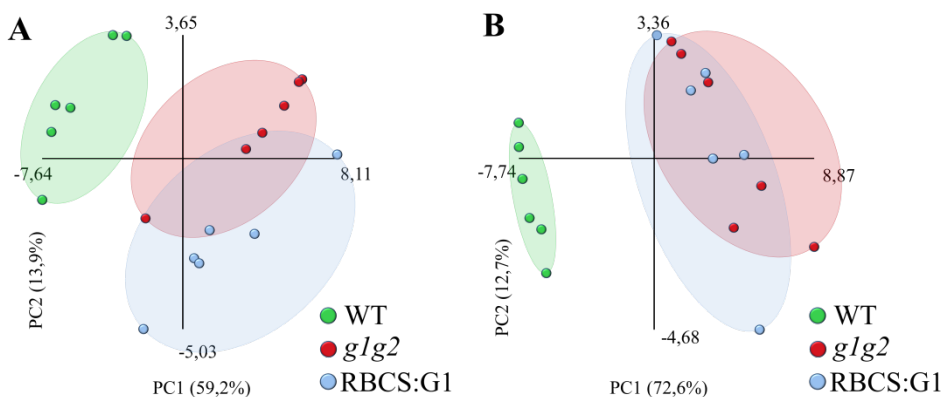
	Oscuridad				Luz				
	Medio estándar		RBCS:G1		Medio estándar + 2% Sacarosa		RBCS:G1		
	WT	<i>g/g</i> <sub>2</sub>	WT	<i>g/g</i> <sub>2</sub>	WT	<i>g/g</i> <sub>2</sub>	WT	<i>g/g</i> <sub>2</sub>	
<b>Ácidos orgánicos</b>									
Ácido galacturónico	-	-	-	-	1 ± 0,02	<b>3,24 ± 0,31</b>	2,83 ± 0,14	-	-
Ácido octadecanoico	-	-	-	-	1 ± 0,08	<b>3,32 ± 0,25</b>	<b>3,30 ± 0,17</b>	-	-
Citrato	1 ± 0,04	<b>3,07 ± 0,22</b>	-	<b>3,46 ± 0,26</b>	-	-	-	1 ± 0,07	1,31 ± 0,13
Dehidroascorbato	1 ± 0,08	1,01 ± 0,15	<b>0,67 ± 0,20</b>	<b>0,79 ± 0,08</b>	1 ± 0,21	<b>3,24 ± 0,47</b>	1,93 ± 0,38	1 ± 0,19	1,22 ± 0,19
Fumarato	1 ± 0,03	<b>1,55 ± 0,07</b>	<b>1,79 ± 0,08</b>	<b>1,59 ± 0,09</b>	1 ± 0,03	<b>0,79 ± 0,03</b>	<b>0,77 ± 0,05</b>	1 ± 0,05	<b>1,22 ± 0,04</b>
Glicerato	1 ± 0,04	<b>2,59 ± 0,24</b>	<b>3,37 ± 0,37</b>	<b>1,52 ± 0,13</b>	1 ± 0,07	<b>1,42 ± 0,14</b>	<b>1,59 ± 0,09</b>	1 ± 0,05	1,09 ± 0,07
Malato	1 ± 0,04	<b>1,57 ± 0,08</b>	<b>1,52 ± 0,13</b>	<b>1,63 ± 0,10</b>	1 ± 0,03	0,95 ± 0,07	<b>0,85 ± 0,03</b>	1 ± 0,03	1,08 ± 0,05
Piruvato	1 ± 0,04	<b>1,76 ± 0,06</b>	<b>1,63 ± 0,10</b>	<b>1,67 ± 0,11</b>	1 ± 0,08	<b>1,68 ± 0,19</b>	<b>1,49 ± 0,07</b>	1 ± 0,07	1,14 ± 0,05
Succinato	1 ± 0,05	<b>1,47 ± 0,06</b>	<b>1,67 ± 0,11</b>		-	-	-	1 ± 0,03	1,12 ± 0,07
<b>Azúcares y alcoholes de azúcar</b>									
Eritritol	1 ± 0,03	<b>0,73 ± 0,03</b>	<b>0,70 ± 0,04</b>	<b>0,76 ± 0,07</b>	1 ± 0,02	<b>0,76 ± 0,07</b>	<b>0,54 ± 0,02</b>	1 ± 0,03	0,98 ± 0,04
Fucosa	1 ± 0,05	<b>3,10 ± 0,16</b>	<b>1,96 ± 0,14</b>	<b>1,25 ± 0,10</b>	1 ± 0,02	<b>2,32 ± 0,13</b>	<b>2,25 ± 0,10</b>	1 ± 0,04	<b>1,20 ± 0,06</b>
Fructosa	1 ± 0,03	<b>1,83 ± 0,08</b>	<b>1,61 ± 0,10</b>	<b>1,17 ± 0,06</b>	1 ± 0,03	<b>1,14 ± 0,04</b>	<b>1,17 ± 0,06</b>	1 ± 0,05	<b>1,34 ± 0,05</b>
Galactinol	-	-	-	<b>10,61 ± 0,56</b>	1 ± 0,03	<b>17,96 ± 1,23</b>	<b>10,61 ± 0,56</b>	1 ± 0,03	0,86 ± 0,06
Glicerol-3-P	1 ± 0,04	1,09 ± 0,06	<b>0,84 ± 0,05</b>		-	-	-	1 ± 0,03	0,94 ± 0,05
Glucosa	1 ± 0,10	<b>2,40 ± 0,33</b>	<b>2,01 ± 0,20</b>	<b>1,53 ± 0,04</b>	1 ± 0,04	<b>1,46 ± 0,02</b>	<b>1,53 ± 0,04</b>	1 ± 0,06	<b>1,25 ± 0,08</b>
Glucosa-6-P	1 ± 0,07	<b>0,74 ± 0,05</b>	<b>0,53 ± 0,04</b>	<b>0,47 ± 0,04</b>	1 ± 0,05	<b>0,60 ± 0,08</b>	<b>0,47 ± 0,04</b>	1 ± 0,03	0,92 ± 0,07
Glucuheptosa	-	-	-	<b>2,90 ± 0,16</b>	1 ± 0,05	<b>3,40 ± 0,29</b>	<b>2,90 ± 0,16</b>	-	-
Mioinositol	1 ± 0,02	<b>2,54 ± 0,11</b>	<b>2,30 ± 0,13</b>	<b>2,22 ± 0,10</b>	1 ± 0,03	<b>2,34 ± 0,09</b>	<b>2,22 ± 0,10</b>	1 ± 0,04	<b>1,37 ± 0,06</b>
Maltitol	-	-	-	<b>2,41 ± 0,23</b>	1 ± 0,12	<b>3,11 ± 0,29</b>	<b>2,41 ± 0,23</b>	-	-
Maltosa	-	-	-	<b>2,55 ± 0,11</b>	1 ± 0,02	<b>2,76 ± 0,25</b>	<b>2,55 ± 0,11</b>	-	-
Rafinosa	1 ± 0,05	0,87 ± 0,09	<b>0,82 ± 0,04</b>	<b>9,61 ± 0,36</b>	1 ± 0,09	<b>15,99 ± 1,12</b>	<b>9,61 ± 0,36</b>	1 ± 0,06	0,99 ± 0,07
Ramnosa	1 ± 0,03	<b>1,49 ± 0,06</b>	<b>1,42 ± 0,08</b>		-	-	-	1 ± 0,04	1,12 ± 0,07
Sacarosa	1 ± 0,04	<b>1,22 ± 0,06</b>	1,12 ± 0,08	0,97 ± 0,05	1 ± 0,04	0,95 ± 0,03	0,97 ± 0,05	1 ± 0,02	1,03 ± 0,03
Trehalosa	1 ± 0,03	<b>1,45 ± 0,05</b>	<b>1,33 ± 0,07</b>	<b>4,25 ± 0,27</b>	1 ± 0,03	<b>5,18 ± 0,36</b>	<b>4,25 ± 0,27</b>	1 ± 0,03	1,14 ± 0,07
Xilosa	1 ± 0,05	<b>2,13 ± 0,10</b>	<b>2,39 ± 0,11</b>	<b>4,59 ± 0,34</b>	1 ± 0,05	<b>4,89 ± 0,47</b>	<b>4,59 ± 0,34</b>	1 ± 0,04	<b>1,32 ± 0,08</b>

**Tabla 4.4.** Continuación

	Oscuridad				Luz			
	Medio estándar		Medio estándar + 2% Sacarosa		Medio estándar + 0,1mM serina			
	WT	g/lg2	RBCS:G1	WT	g/lg2	RBCS:G1	WT	g/lg2
<b>Otros</b>								
Acido fosfórico	1 ± 0,12	<b>0,17 ± 0,01</b>	<b>0,09 ± 0,01</b>	1 ± 0,02	<b>0,12 ± 0,01</b>	<b>0,10 ± 0,01</b>	1 ± 0,03	<b>0,55 ± 0,05</b>
Putrescina	-	-	-	1 ± 0,03	<b>4,84 ± 0,31</b>	<b>5,14 ± 0,34</b>	1 ± 0,08	1,21 ± 0,09
Tiramina	1 ± 0,07	1,68 ± 0,34	1,60 ± 0,34	-	-	-	1 ± 0,14	<b>1,45 ± 0,13</b>

Los resultados obtenidos muestran que en estas dos condiciones, la gran mayoría de los metabolitos significativamente diferentes entre las plantas control y las plantas *glg2*, también lo son respecto a las plantas *glg2* RBCS:G1. Esta diferencia entre las plantas control y los otros dos genotipos se refleja también con el PCA y el análisis estadístico del PC1 (Figura 4.12, Tabla 4.5, Tabla 4.6).

La ausencia de complementación en las líneas *glg2* RBCS:G1, tanto a nivel fenotípico como metabólico, sugiere que la expresión de la GAPCp en las células fotosintéticas no afecta a estos dos parámetros.



**Figura 4.12.** Categorización según el análisis de componentes principales (PCA) de las líneas analizadas por metabolómica *glg2*, *glg2* RBCS:G1 (RBCS:G1), y plantas control (WT). A, En oscuridad en medio estándar. B, en el periodo de luz en medio estándar suplementado con 2% de sacarosa. Cada punto representa el conjunto de metabolitos de una repetición y cada línea está formada de 6 repeticiones. Los componentes principales PC1 y PC2 representan juntos el 73,1% y el 85,3% de la varianza observada en (A) y en (B), respectivamente.

**Tabla 4.5.** Análisis del componente principal 1 (PC1) según el test HSD de Tukey en las líneas *g1g2*, RBCS:G1, y plantas control (WT), ensayadas en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media para los grupos en los subconjuntos. (alfa = 0,05). n representa el número de repeticiones.

Línea	n	Subconjunto	
		a	b
WT	6	-6,99	
RBCS:G1	6		2,69
<i>g1g2</i>	6		4,29

**Tabla 4.6.** Análisis del componente principal 1 (PC1) según el test HSD de Tukey en las líneas *g1g2*, RBCS:G1, y plantas control (WT), ensayadas en presencia de luz y en medio estándar suplementado con 2% de sacarosa. Los valores representan la media para los grupos en los subconjuntos. (alfa = 0,05). n representa el número de repeticiones.

Línea	n	Subconjunto	
		a	b
WT	6	-7,14	
RBCS:G1	6		3,10
<i>g1g2</i>	6		4,04

Además de los análisis con plantas *g1g2*, *g1g2* RBCS:G1 y silvestres, también se realizó el análisis metabolómico con plantas *g1g2* 35S:G1 que expresan el gen *GAPCp1* tanto en parte aérea como en raíz (Tabla 4.1). El perfil metabólico de la parte aérea de plantas *g1g2* expresando la *GAPCp1* bajo el control del promotor 35S era similar al de las plantas silvestres y distinto al de las plantas *g1g2* y *g1g2* RBCS:G1 según el Test de Tukey y el PCA (Tabla 4.2 y Figura 4.3).

En el Apartado 4.3 comentamos que 28 metabolitos estaban alterados en las plantas *g1g2* con respecto a las plantas control y transformando plantas *g1g2* con la construcción *Pro35S:G1* esperamos que estos cambios se reviertan. De los 28 metabolitos alterados en *g1g2*, por un lado 14 de ellos (50%) volvieron a tener niveles similares a las plantas control; y por otro lado 7 de ellos cambiaron en sentido opuesto, lo que sugeriría un efecto de la sobreexpresión. Dado que la



*GAPCp1* en estas líneas se expresa tanto en parte aérea como en raíces, postulamos que la falta de actividad de la *GAPCp1* en las raíces podría estar afectando el metabolismo en la parte aérea.

#### 4.6. EXPRESIÓN DE LA *GAPCp1* EN LAS RAÍCES DE *ARABIDOPSIS*

Como hemos observado en el apartado anterior, la sobreexpresión específica de la *GAPCp1* en células fotosintéticas de las plantas *glg2* RBCS:G1 no permite revertir el perfil metabólico en la parte aérea de estos mutantes dobles. Previamente en nuestro grupo se había demostrado que la *GAPCp1* estaba implicada en el suministro del aminoácido serina a las raíces y que la suplementación con serina en el medio de cultivo revertía el fenotipo de enanismo de éstas. Por estas dos observaciones quisimos investigar el efecto de la expresión específica en raíz de la enzima.

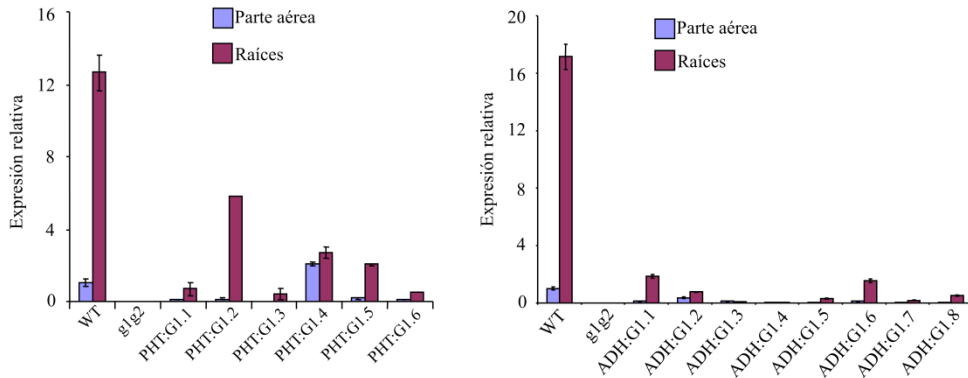
Para este fin, elegimos dos promotores, *ProPHT1.2* y *ProADH*, que permitirían dirigir la expresión de la *GAPCp1* únicamente en las raíces y realizamos las construcciones génicas *ProPHT:G1* y *ProADH:G1* con las cuales transformamos plantas heterocigotas *glg1 G2g2*. En la generación T<sub>3</sub> pudimos obtener 16 líneas independientes *glg1 G2g2* PHT:G1 que generaban plantas *glg2* estériles y 2 líneas independientes *glg2* PHT:G1 fértiles. Obtuvimos también 10 líneas independientes *glg1 G2g2* ADH:G1 y 3 de ellas generaron plantas *glg2* fértiles (Tabla 4.7). Todas las líneas independientes obtenidas eran de una sola inserción.

**Tabla 4.7.** Líneas transgénicas obtenidas tras transformar las plantas *glg1 G2g2* con las construcciones *ProPHT:G1* (líneas PHT:G1) y *ProADH:G1* (líneas ADH:G1).

Generación	PHT:G1			ADH:G1		
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Número de plantas transformantes	36	20	18	23	14	10

#### 4.6.1. Patrón de expresión de la GAPCp1 en las plantas transformadas con las construcciones génicas *ProPHT:G1* y *ProADH:G1*

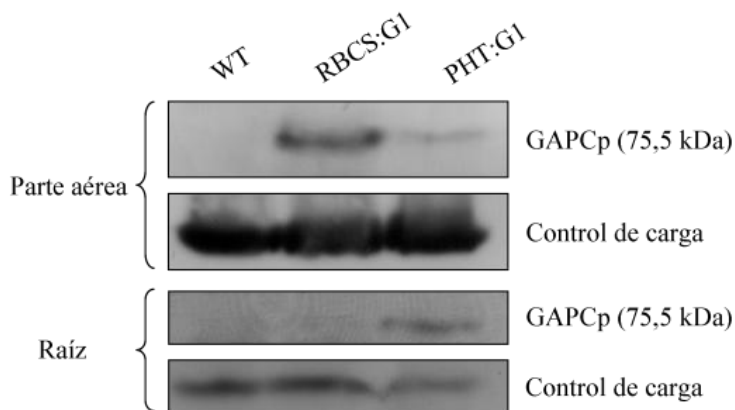
De entre las líneas obtenidas en la generación T<sub>3</sub> se eligieron varias para evaluar la expresión relativa de la GAPCp1 mediante RT-qPCR. La Figura 4.13 muestra que las líneas *glg2* PHT:G1 (o PHT:G1) y *glg2* ADH:G1 (o ADH:G1) ensayadas tenían una expresión mayoritaria de la GAPCp1 en las raíces. Las líneas PHT:G1.2, PHT:G1.5, ADH:G1.1 y ADH:G1.6 mostraron una expresión más específica de raíz que las demás líneas ensayadas. Además, la expresión relativa de las líneas PHT:G1 (5,79 y 2,04 para PHT:G1.2 y PHT:G1.5, respectivamente) fue mayor que la expresión relativa de las líneas ADH:G1 (1,86 y 1,56 para ADH:G1.1 y ADH:G1.6, respectivamente). Por este motivo, decidimos realizar los análisis posteriores únicamente con las líneas PHT:G1.2 y PHT:G1.5 de las cuales hicimos una mezcla.



**Figura 4.13.** Expresión relativa del gen *GAPCp1* en partes aéreas y raíces de las líneas *glg2* PHT:G1, *glg2* ADH:G1, *glg2* y plantas control (WT). Los valores están expresados con respecto a los valores de la parte aérea del WT. Los valores representan la media  $\pm$  SE (n=3). La RT-qPCR se realizó en plántulas de 21 días crecidas *in vitro*.

#### 4.6.2. Expresión de la proteína GAPCp1 en las líneas transformantes

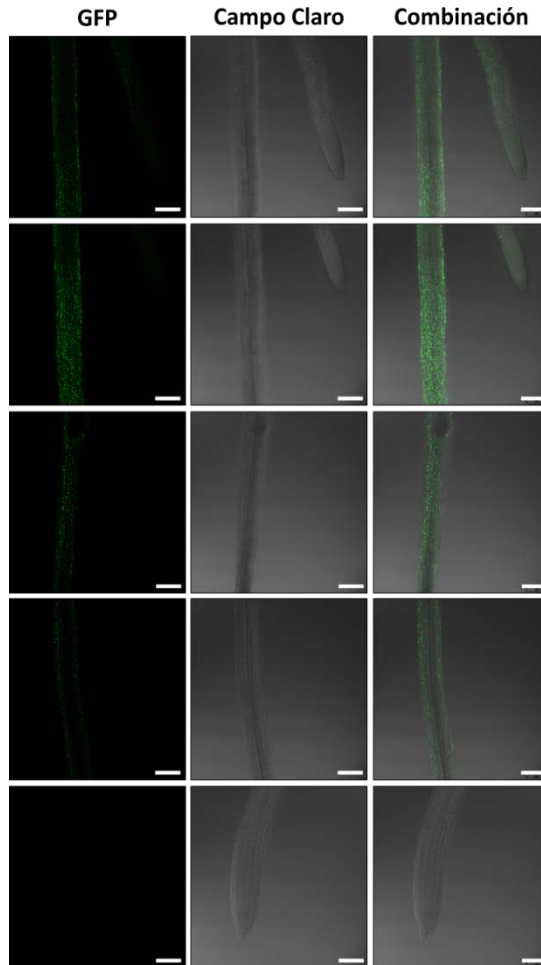
Para confirmar la presencia de la proteína GAPCp1 en las líneas *glg2* PHT:G1 realizamos un western blot utilizando parte aérea o raíces de estas plantas (Figura 4.14). Para este análisis se analizó una muestra compuesta por una mezcla de las dos líneas *glg2* PHT:G1 seleccionadas (PHT:G1.2 y PHT:G1.5). Debido a que en las plantas *glg2* RBCS:G1 la proteína GAPCp1 (fusionada a la GFP) estaba presente en la parte aérea y ausente en las raíces utilizamos estas líneas como control de la presencia de la proteína (la muestra estaba compuesta por las tres líneas *glg2* RBCS:G1 seleccionadas). El resultado mostró que la proteína GAPCp1 está presente en las raíces y que en la parte aérea de las líneas *glg2* PHT:G1 se podía detectar, aunque en muy poca cantidad. En todo caso, el contenido de la GAPCp en la parte aérea de las plantas *glg2* PHT:G1 era muy inferior al de la parte aérea de las plantas *glg2* RBCS:G1.



**Figura 4.14.** Western blot en las líneas *glg2* PHT:G1 (PHT:G1), *glg2* RBCS:G1 (RBCS:G1) y plantas control (WT). La banda observada corresponde a la proteína de fusión GAPCp1-GFP. Las plantas WT sirven de control negativo dado que no tienen la proteína GFP. El control de carga está representado por bandas inespecíficas.

#### 4.6.3. Localización subcelular de GAPCp1 bajo el control del *ProPHT*.

Para conocer la localización celular de la GAPCp1 en las raíces de las líneas *glg2* PHT:G1, analizamos en estos órganos la fluorescencia de la proteína de fusión GAPCp1-GFP revelando que la proteína se localiza a lo largo de toda la raíz a excepción de la porción apical (Figura 4.15).



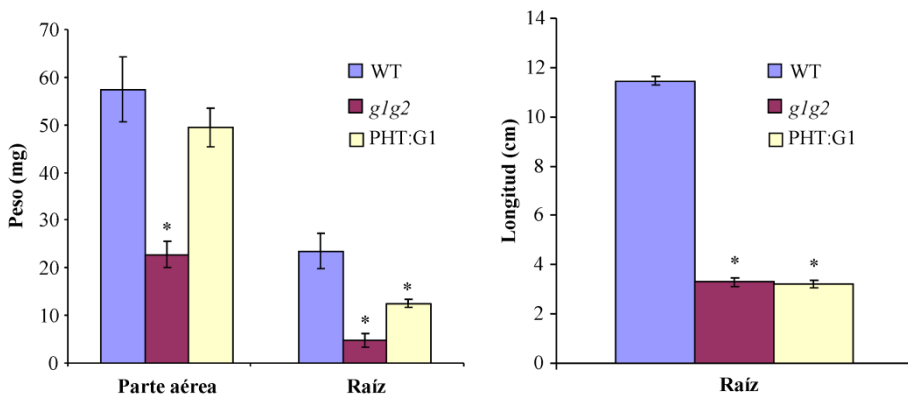
**Figura 4.15.** Expresión de la proteína de fusión GAPCp1-GFP en las raíces de las líneas *glg2* PHT:G1. Las fotos se tomaron con un microscopio confocal en plántulas de 8 días. Escala = 100  $\mu$ m.

#### 4.6.4. Caracterización fenotípica de las plantas expresando la GAPCp1 en las raíces

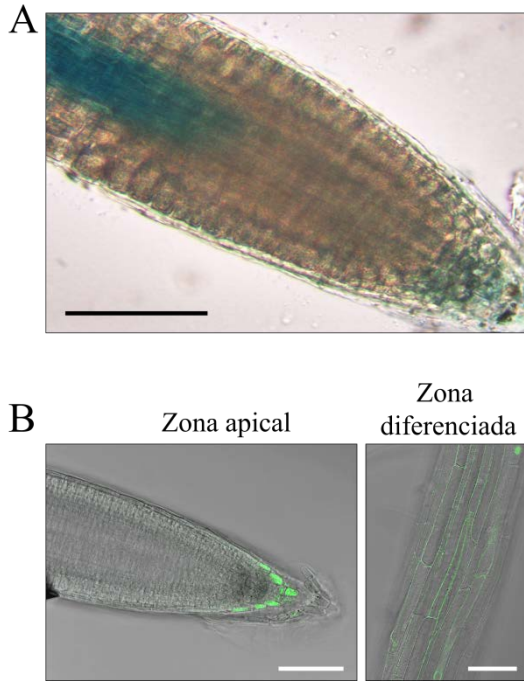
Procedimos a continuación a la caracterización morfológica de las plantas *g1g2* PHT:G1. La apariencia visual en invernadero nos mostraba que el tamaño de las plántulas *g1g2* PHT:G1 seguía siendo más pequeño respecto a las plantas control, aunque el tamaño era bastante más grande que el de las plantas *g1g2* (Figura 4.16). En condiciones *in vitro*, las plantas *g1g2* PHT:G1 de 21 días mostraron un peso de roseta igual que el de las plantas silvestres y superior al peso de las plantas *g1g2* (Figura 4.17). El peso de las raíces de las plantas *g1g2* PHT:G1 fue también superior al de las plantas *g1g2*, aunque inferior al de las plantas control. A pesar de este último hecho, la longitud de las raíces de las plantas *g1g2* PHT:G1 y de las plantas *g1g2* fue similar e inferior a la de las plantas control, hecho que se entiende porque las plantas *g1g2* PHT:G1 tienen más raíces laterales (Figura 4.17). La falta de recuperación del crecimiento de las raíces en las plantas *g1g2* PHT:G1 podría estar debido a que la GAPCp en estas líneas no se expresa en tipos celulares concretos del ápice de la raíz primaria, como lo muestra la Figura 4.15, ya que el análisis del promotor nativo *ProGAPCp1* fusionado a los genes reporteros *GUS* y *GFP* indicaron que la GAPCp1 se expresa en células maduras de la vasculatura de la raíz (Muñoz-Bertomeu y col., 2009), pero también en el meristemo, y en células laterales de la caliptra (Figura 4.18).



**Figura 4.16.** Fenotipo de plántulas silvestres (WT), *glg2* PHT:G1 (PHT:G1) y *glg2* de 30 días de edad crecidas en invernadero. Escala = 5 cm.



**Figura 4.17.** Caracterización fenotípica de las líneas *glg2* PHT:G1 (PHT:G1), *glg2* y plantas control (WT). Las plantas crecieron en condiciones estándar y se evaluaron el peso fresco de la roseta y de las raíces, y la longitud de la raíz principal en plántulas de 21 días. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 14$ ). Los asteriscos representan valores significativamente distintos al WT ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4.18.** Patrón de expresión de la GAPCp en raíces de plantas silvestres usando plantas G1G2 GAPCp1:GUS-GFP en las cuales el gen *GUS* fusionado al gen de la GFP está bajo el control de promotor *GAPCp1*. A, localización tisular usando el gen reportero *GUS*; B, localización subcelular mediante microscopía confocal. Escala = 75  $\mu$ m.

#### 4.6.5. Perfil metabólico de las líneas *glg2* PHT:GAPCp1

Como acabamos de ver en el apartado anterior, las plantas *glg2* PHT:G1 que sobreexpresan la GAPCp1 en sus raíces son similares a las plantas *glg2* en lo que se refiere a la longitud de la raíz pero similares a las plantas silvestres en lo que se refiere al peso de la roseta *in vitro*. Por este motivo, quisimos conocer los metabolitos responsables o afectados por estos cambios. Como podemos ver en la Tabla 4.8 existieron diferencias en los niveles de metabolitos en las partes aéreas y raíces de las plantas *glg2* PHT:G1 con respecto a las plantas *glg2*. En la parte aérea de las plantas *glg2* PHT:G1 observamos que el 62% de los metabolitos (26 de 42) era significativamente distinto respecto a las plantas *glg2*, y la mayoría de ellos fue similar a las plantas silvestres (62%; 16 de 26). Los cambios más importantes con respecto a las plantas *glg2* fueron la reducción de los niveles de los aminoácidos asparagina y glutamina que pasaron de valores de incremento relativo de más de 2 a niveles similares cuando se comparan con las plantas control. También los azúcares se redujeron, fundamentalmente la fructosa, la glucosa, la maltosa y la trehalosa.



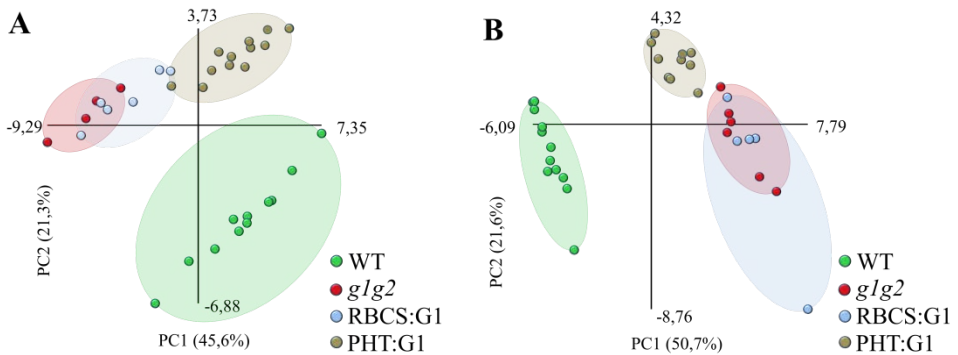
**Tabla 4.8.** Niveles de metabolitos en parte aérea y raíces de plantas silvestres (WT), mutantes (*g1g2*), y mutantes *g1g2* transformadas (RBCS:G1 y PHT:G1). Los metabolitos se midieron en plántulas de 21 días tras 8 h en el periodo de luz. Los datos son relativos y normalizados con respecto a la media calculada para el WT. Los valores representan la media  $\pm$  SE de 6 repeticiones independientes. Los valores que están en negrita son significativamente distintos a los valores de las plantas *g1g2*; los valores con un asterisco son significativamente distintos a los valores del WT ( $P < 0,05$ ).

	Parte aérea				Raíces			
	WT	<i>g1g2</i>	RBCS:G1	PHT:G1	WT	<i>g1g2</i>	RBCS:G1	PHT:G1
<b>Aminoácidos</b>								
Alanina	1 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,07	<b>1 <math>\pm</math> 0,10</b>	1,94 $\pm$ 0,07*	2,15 $\pm$ 0,15*	1,76 $\pm$ 0,07*
Arginina	1 $\pm$ 0,22	1,28 $\pm$ 0,08	1,60 $\pm$ 0,26	<b>0,83 <math>\pm</math> 0,07</b>	-	-	-	-
Asparagina	<b>1 <math>\pm</math> 0,20</b>	2,77 $\pm$ 0,40	2,21 $\pm$ 0,38*	<b>0,94 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,18</b>	2,71 $\pm$ 0,29*	3,50 $\pm$ 1,00*	<b>1,44 <math>\pm</math> 0,12</b>
Aspartato	<b>1 <math>\pm</math> 0,04</b>	1,60 $\pm$ 0,04	<b>1,44 <math>\pm</math> 0,02*</b>	<b>1,11 <math>\pm</math> 0,02*</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,03</b>	1,16 $\pm$ 0,03*	1,19 $\pm$ 0,04*	<b>0,90 <math>\pm</math> 0,03*</b>
Beta-Alanina	<b>1 <math>\pm</math> 0,07</b>	1,87 $\pm$ 0,06	<b>1,54 <math>\pm</math> 0,04*</b>	<b>1,12 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,08</b>	3,05 $\pm$ 0,13*	2,60 $\pm$ 0,20*	<b>2,27 <math>\pm</math> 0,06*</b>
GABA	-	-	-	-	<b>1 <math>\pm</math> 0,08</b>	1,86 $\pm$ 0,04*	1,82 $\pm$ 0,07*	<b>1,29 <math>\pm</math> 0,03*</b>
Glutamato	1 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,07	<b>0,88 <math>\pm</math> 0,05</b>	1 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,08	<b>0,68 <math>\pm</math> 0,03*</b>
Glutamina	<b>1 <math>\pm</math> 0,23</b>	2,64 $\pm$ 0,15	2,26 $\pm$ 0,33*	<b>0,92 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,16</b>	1,91 $\pm$ 0,11*	2,23 $\pm$ 0,22*	1,86 $\pm$ 0,10*
Glicina	<b>1 <math>\pm</math> 0,06</b>	0,75 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,02*	0,71 $\pm$ 0,01*	<b>1 <math>\pm</math> 0,04</b>	1,36 $\pm$ 0,05*	1,40 $\pm$ 0,09*	<b>1,08 <math>\pm</math> 0,03</b>
Isoleucina	<b>1 <math>\pm</math> 0,06</b>	1,34 $\pm$ 0,05	1,31 $\pm$ 0,03*	<b>1,11 <math>\pm</math> 0,02*</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,03</b>	1,14 $\pm$ 0,04*	1,13 $\pm$ 0,04*	1,12 $\pm$ 0,02*
Metionina	<b>1 <math>\pm</math> 0,07</b>	1,27 $\pm$ 0,02	<b>1,16 <math>\pm</math> 0,03*</b>	<b>0,92 <math>\pm</math> 0,03</b>	1 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,12	<b>0,91 <math>\pm</math> 0,02*</b>
Ornitina	1 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,02*	1,09 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
Fenilalanina	1 $\pm$ 0,09	1,19 $\pm$ 0,06	1,09 $\pm$ 0,05	<b>1,02 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,02</b>	0,78 $\pm$ 0,02*	0,87 $\pm$ 0,05*	<b>0,89 <math>\pm</math> 0,02*</b>
Prolina	<b>1 <math>\pm</math> 0,07</b>	1,44 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,09	<b>0,83 <math>\pm</math> 0,03*</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,06</b>	1,57 $\pm$ 0,12*	1,17 $\pm$ 0,13	<b>1,05 <math>\pm</math> 0,06</b>
Serina	1 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,02	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,02*</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,02</b>	0,76 $\pm$ 0,01*	0,72 $\pm$ 0,02*	<b>0,83 <math>\pm</math> 0,02*</b>
Treonina	<b>1 <math>\pm</math> 0,06</b>	1,19 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,03*	<b>0,95 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,01</b>	1,08 $\pm$ 0,02*	1,08 $\pm$ 0,01*	1,05 $\pm$ 0,01*
Tirosina	1 $\pm$ 0,37	1,92 $\pm$ 0,33	2,35 $\pm$ 0,91	<b>0,58 <math>\pm</math> 0,12</b>	1 $\pm$ 0,37	1,32 $\pm$ 0,09*	1,51 $\pm$ 0,17*	<b>0,75 <math>\pm</math> 0,03</b>
Valina	<b>1 <math>\pm</math> 0,08</b>	1,32 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,06*	<b>0,98 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>1 <math>\pm</math> 0,04</b>	1,23 $\pm$ 0,04*	1,20 $\pm$ 0,03*	1,14 $\pm$ 0,02*

Tabla 4.8 (continuación)

	Parte aérea				Raíces			
	WT	g/g2	RBCS:G1	PHT:G1	WT	g/g2	RBCS:G1	PHT:G1
<b>Ácidos orgánicos</b>								
Ácido benzóico	-	-	-	-	1 ± 0,10	0,91 ± 0,03	1,10 ± 0,14	<b>0,72 ± 0,04*</b>
Ácido treónico	-	-	-	-	<b>1 ± 0,07</b>	1,34 ± 0,06*	1,48 ± 0,06*	1,27 ± 0,03*
Ascorbato	1 ± 0,09	0,90 ± 0,10	0,59 ± 0,14*	0,83 ± 0,03*	<b>1 ± 0,05</b>	1,21 ± 0,30	0,88 ± 0,05	<b>0,99 ± 0,05</b>
Fumarato	<b>1 ± 0,06</b>	1,31 ± 0,09	1,36 ± 0,07*	1,26 ± 0,03*	<b>1 ± 0,04</b>	0,70 ± 0,02*	0,72 ± 0,06*	0,65 ± 0,01*
Glicerato	<b>1 ± 0,07</b>	1,36 ± 0,07	1,40 ± 0,07*	1,12 ± 0,09	<b>1 ± 0,02</b>	3,89 ± 0,17*	<b>5,59 ± 0,21*</b>	<b>3,25 ± 0,08*</b>
Malato	1 ± 0,04	0,90 ± 0,04	1,04 ± 0,08	1,00 ± 0,03	1 ± 0,02	0,97 ± 0,02	1,10 ± 0,09	<b>0,89 ± 0,01*</b>
Nicotinato	1 ± 0,12	1,20 ± 0,06	<b>1,40 ± 0,06*</b>	1,16 ± 0,04	1 ± 0,10	1,11 ± 0,09	1,22 ± 0,16	1,10 ± 0,05
<b>Azúcares y alcoholes de azúcar</b>								
Fructosa	<b>1 ± 0,03</b>	2,14 ± 0,08	<b>1,62 ± 0,03*</b>	<b>1,11 ± 0,03*</b>	<b>1 ± 0,04</b>	2,38 ± 0,06*	<b>2,70 ± 0,01*</b>	<b>1,69 ± 0,07*</b>
Fructosa-6-P	1 ± 0,08	0,86 ± 0,03	<b>0,69 ± 0,02*</b>	<b>0,55 ± 0,03*</b>	<b>1 ± 0,03</b>	0,68 ± 0,04*	0,60 ± 0,07*	<b>0,47 ± 0,03*</b>
Galactinol	1 ± 0,06	1,26 ± 0,11	1,17 ± 0,07	<b>0,81 ± 0,05*</b>	<b>1 ± 0,03</b>	2,69 ± 0,07*	2,99 ± 0,18*	<b>2,31 ± 0,04*</b>
Glicerol	1 ± 0,15	1,17 ± 0,14	1,16 ± 0,12	0,97 ± 0,07	1 ± 0,15	1,10 ± 0,16	1,10 ± 0,10	1,04 ± 0,13
Glucosa	<b>1 ± 0,08</b>	2,21 ± 0,02	<b>1,66 ± 0,04*</b>	<b>1,00 ± 0,05</b>	1 ± 0,11	1,26 ± 0,08*	0,91 ± 0,23	<b>0,97 ± 0,05</b>
Glucosa-6-P	1 ± 0,08	0,83 ± 0,04	<b>0,65 ± 0,03*</b>	<b>0,52 ± 0,03*</b>	<b>1 ± 0,03</b>	0,54 ± 0,02*	0,67 ± 0,08*	0,48 ± 0,02*
Maltosa	<b>1 ± 0,07</b>	2,21 ± 0,17	<b>1,67 ± 0,05*</b>	<b>0,92 ± 0,03</b>	1 ± 0,06	1,07 ± 0,04	1,04 ± 0,08	<b>0,85 ± 0,02*</b>
Micrositol	<b>1 ± 0,04</b>	1,62 ± 0,07	<b>1,35 ± 0,03*</b>	<b>1,06 ± 0,03</b>	<b>1 ± 0,04</b>	1,75 ± 0,07*	1,72 ± 0,07*	<b>1,43 ± 0,03*</b>
Rafinosa	<b>1 ± 0,05</b>	1,75 ± 0,16	1,57 ± 0,08*	1,66 ± 0,16*	<b>1 ± 0,05</b>	1,87 ± 0,05*	<b>2,09 ± 0,09*</b>	1,91 ± 0,03*
Ribosa	1 ± 0,04	1,08 ± 0,05	1,00 ± 0,02	1,06 ± 0,03	-	-	-	-
Sacarosa	<b>1 ± 0,02</b>	0,87 ± 0,03	0,91 ± 0,02*	<b>0,78 ± 0,02*</b>	1 ± 0,11	0,86 ± 0,05	0,90 ± 0,04	0,81 ± 0,03
Treitol	<b>1 ± 0,06</b>	0,64 ± 0,03	0,70 ± 0,02*	0,63 ± 0,01*	<b>1 ± 0,01</b>	0,20 ± 0,02*	0,23 ± 0,01*	<b>0,37 ± 0,01*</b>
Trehalosa	<b>1 ± 0,05</b>	3,28 ± 0,16	<b>2,33 ± 0,05*</b>	<b>1,33 ± 0,05*</b>	<b>1 ± 0,03</b>	3,58 ± 0,16*	3,17 ± 0,26*	<b>2,14 ± 0,10*</b>
<b>Otros</b>								
Ácido fosfórico	<b>1 ± 0,04</b>	0,33 ± 0,01	0,29 ± 0,02*	0,37 ± 0,02*	<b>1 ± 0,08</b>	0,60 ± 0,03*	0,59 ± 0,04*	<b>0,48 ± 0,02*</b>
Putrescina	<b>1 ± 0,08</b>	1,45 ± 0,01	1,31 ± 0,05*	<b>1,00 ± 0,03</b>	-	-	-	-
Urea	1 ± 0,10	0,91 ± 0,08	<b>0,75 ± 0,01*</b>	0,86 ± 0,03	-	-	-	-

El PCA mostró esta diferencia del perfil de metabolitos de las plantas *glg2* PHT:G1 al resto de líneas (Figura 4.19A). Además, el análisis estadístico del PC1 que representa el 45,6% de la varianza agrupó las plantas *glg2* y *glg2* RBCS:G1 por una parte, y las plantas *glg2* PHT:G1 y control silvestre por otra, en dos subconjuntos homogéneos distintos (Tabla 4.9).



**Figura 4.19.** Categorización en parte aérea (A) y raíces (B) según el análisis de componentes principales (PCA) de las líneas analizadas por metabolómica *glg2*, *glg2* RBCS:G1 (RBCS:G1), *glg2* PHT:G1 (PHT:G1) y plantas control (WT). Cada punto representa el conjunto de metabolitos de una repetición. Los componentes principales PC1 y PC2 representan el 66,9% en (A) y el 72,3% en (B) de la varianza observada.

**Tabla 4.9.** Análisis del componente principal 1 (PC1) según el test HSD de Tukey en las partes aéreas de las líneas *g1g2*, RBCS:G1, PHT:G1 y plantas control (WT). El material para realizar la metabolómica fue recogido a la mitad del periodo luminoso. Los valores representan la media para los grupos en los subconjuntos (alfa = 0,05). n representa el número de repeticiones.

Línea	n	Subconjunto	
		a	b
WT	11	2,62	
PHT:G1	12	2,16	
<i>g1g2</i>	4		-6,85
RBCS:G1	6		-4,55

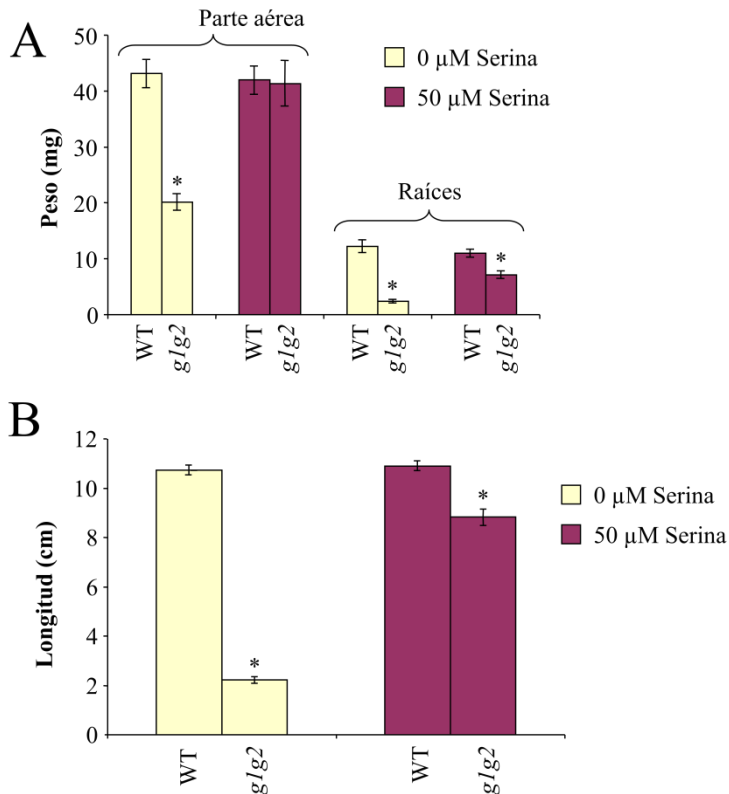
Las raíces de las plantas *g1g2* PHT:G1 presentaron un perfil metabólico intermedio entre las plantas *g1g2* y las plantas control (Tabla 4.8). Los resultados mostraron que un 68% de los metabolitos analizados (25 de 37) eran significativamente distintos cuando se compararon con las plantas *g1g2* y 6 de ellos (24%) eran similares respecto a las plantas control. Los cambios de metabolitos más importantes en las plantas *g1g2* PHT:G1 con respecto a las plantas *g1g2* WT eran una reducción del nivel de algunos aminoácidos (asparagina, glutamato y prolina) y azúcares (fructosa, maltosa y glucosa). Este perfil metabólico intermedio entre las plantas silvestres y las plantas *g1g2* podría indicar una complementación parcial del fenotipo de las plantas *g1g2* y podría reflejar la ausencia de recuperación del crecimiento de la raíz primaria.

En las raíces el PCA también muestra una diferencia del perfil de las líneas analizadas (Figura 4.19B). El análisis estadístico agrupa las plantas *g1g2* PHT:G1 en un subconjunto homogéneo distinto al subconjunto de las plantas *g1g2* (Tabla 4.10). Resaltamos que como en la parte aérea, el perfil metabólico de las raíces de las plantas *g1g2* RBCS:G1 es muy similar al perfil de las plantas *g1g2* y los cambios observados respecto a éstas no son relevantes.

**Tabla 4.10.** Análisis del componente principal 1 (PC1) según el test HSD de Tukey en las raíces de las líneas *g1g2*, RBCS:G1, PHT:G1 y plantas control (WT). El material para realizar la metabolómica fue recogido a la mitad del periodo luminoso. Los valores representan la media para los grupos en los subconjuntos (alfa = 0,05). n representa el número de repeticiones.

Línea	n	Subconjunto		
		a	b	c
WT	12	-5,24		
<i>g1g2</i>	6		4,40	
RBCS:G1	5		5,15	
PHT:G1	10			1,07

Como hemos comentado anteriormente se ha sugerido que una de las principales funciones de la GAPCp en las raíces es proporcionar 3-PGA, el precursor de la biosíntesis de serina para la RFBS. En este sentido, la serina proporcionada al medio de cultivo es capaz de restablecer en parte el crecimiento de las raíces en las plantas mutantes *g1g2* (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Estos autores solo cuantificaron el crecimiento de las raíces, por ello en esta tesis se han repetido estos experimentos para poder ampliar esta caracterización midiendo los pesos de la parte aérea y de las raíces. Los resultados muestran que la suplementación con serina al medio de cultivo permite una mejora de los pesos, tanto de la parte aérea como de la raíz de las líneas *g1g2* pero mientras el peso de la parte aérea es similar al de los controles silvestres, el de la raíz es todavía significativamente inferior (Figura 4.20). Lo mismo sucede con el crecimiento de la raíz principal.

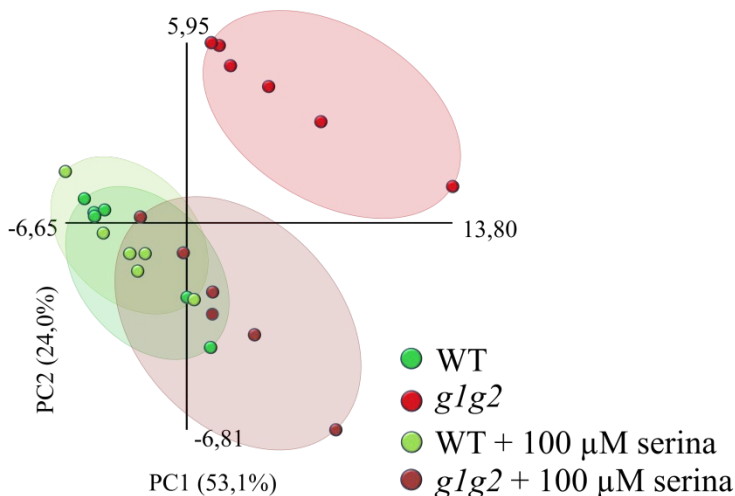


**Figura 4.20.** Caracterización fenotípica de las plantas *glg2* y plantas control (WT) en ausencia y en presencia de serina. A, peso de la parte aérea y de las raíces. B, Longitud de la raíz primaria. Las plántulas crecieron durante 21 días *in vitro* en medio estándar (0  $\mu$ M de serina) o en medio estándar suplementado con 50  $\mu$ M de serina. Los valores representan la media  $\pm$  SE (n  $\geq$  30). Los asteriscos representan valores significativamente distintos del WT en cada condición (P < 0,05).

Tras cuantificar y determinar que existe una mejora en el peso de la parte aérea se evaluó el perfil metabólico de ésta en plantas crecidas en presencia de serina (**Tabla 4.4**). Los resultados mostraron mediante el PCA la similitud de las plantas crecidas en presencia de serina con las plantas control (Figura 4.21).

El análisis estadístico del PC1 muestra que las plantas *glg2* crecidas en presencia de serina son similares a las plantas control, pero también a las plantas *glg2* crecidas en condiciones estándar sin serina (Tabla 4.11) lo que indica que el

perfil metabólico de la parte aérea de las plantas *glg2* no se complementa perfectamente tras cultivarlas en un medio con el aminoácido. En la Tabla 4.4 podemos ver que varios metabolitos en las plantas *glg2* crecidas con serina están todavía alterados significativamente con respecto a las plantas control.



**Figura 4.21.** Categorización según el análisis de los componentes principales (PCA) de las líneas *glg2* y plantas control (WT) analizadas mediante metabolómica. Se analizaron plantas crecidas en medio estándar o en medio estándar suplementado con 100 μM serina. Se analizó el perfil metabólico de las partes aéreas. Cada punto representa el conjunto de metabolitos de una repetición. Los componentes principales PC1 y PC2 representan el 77,1% de la varianza observada.

**Tabla 4.11.** Análisis del componente principal 1 (PC1) según el test HSD de Tukey en las partes aéreas de plantas silvestres (WT) o *glg2* crecidas en condiciones estándar o en medio estándar suplementado con 100 μM serina. Los valores representan la media para los grupos en los subconjuntos. (alfa = 0,05). n representa el número de repeticiones.

Línea	n	Subconjunto	
		a	b
WT	6	-3,28	
<i>glg2</i>	6		4,88
WT + 100 μM serina	6	-3,28	
<i>glg2</i> + 100 μM serina	6	1,68	1,68

#### **4.6.6. Alteración del metabolismo del carbono, nitrógeno y nutrición mineral por la ausencia de la actividad GAPCp1**

Con el fin de encontrar aquellos mecanismos y rutas afectados por la falta de actividad de la GAPCp1 en las partes aéreas y en raíces, hemos seguido una aproximación metabólica y transcriptómica.

##### **Aproximación metabólica**

La falta de actividad de la GAPCp1 afectó claramente al metabolismo de la parte aérea y de las raíces. Además de la alteración del metabolismo de los aminoácidos (Muñoz-Bertomeu y col., 2009), también se alteraron el metabolismo de los azúcares y de los ácidos orgánicos (Tabla 4.1). Dado que el metabolismo es un proceso dinámico, una búsqueda de los metabolitos que cambian de forma sistemática en todas las condiciones ensayadas nos puede ayudar a encontrar rutas importantes y mecanismos afectados por la actividad de la GAPCp1. Así pues, nos centramos en estos metabolitos que cambiaron en las plantas *g1g2* independientemente de las condiciones de crecimiento.

En la parte aérea dos aminoácidos, el ácido gamma aminobutírico (GABA) y glutamina, ambos relacionados con el metabolismo del glutamato aumentaron (Tabla 4.12).

Con respecto a los azúcares hubo un incremento en muchos de ellos (fructosa, mioinositol, fucosa, galactinol, glucosa, trehalosa, xilosa) en las plantas *g1g2* con respecto a las plantas control. Sin embargo, los azúcares fosfato, Glu-6P y fructosa-6-fosfato (Fru-6P) disminuyeron en las plantas *g1g2* en comparación a las plantas control en todos los experimentos en los cuales se cuantificaron. Dos ácidos orgánicos, citrato y fumarato del ciclo de Krebs aumentaron en las plantas *g1g2* en todos los experimentos, indicando que esta ruta respiratoria estaba claramente afectada por la falta de actividad de la GAPCp1. El glicerato también aumentó en las plantas *g1g2* con respecto a los controles; este metabolito podría sintetizarse a partir del 3-PGA a través de una reacción catalizada por la 3-PGA fosfatasa (PGAP) o formar 3-PGA través de una reacción catalizada por la



glicerato quinasa (GK). Finalmente, en todos los casos, el ácido fosfórico se redujo drásticamente (más de 90% en algunas condiciones).

**Tabla 4.12.** Lista de los metabolitos que cambiaron de forma sistemática de forma significativa en la parte aérea de las plantas *glg2* con respecto a las plantas silvestres en todas las condiciones ensayadas. Anotamos también los cambios ocurridos en las plantas HS:G1, RBCS:G1, PHT:G1 y 35S:G1, al igual que los cambios en las plantas *glg2* suplementadas con 100 µM de serina. Las letras "D", "I", "ND" y "NC" indican "Decrecimiento", "Incremento", "No Determinado" y "No Cambiado", respectivamente.

	<i>glg2</i>	RBCS:G1	PHT:G1	35S:G1	<i>glg2</i> + 100 µM serina
<b>Metabolitos</b>					
Ácido fosfórico	D	D	D	NC	D
Citrato	I	I	ND	NC	NC
Fructosa	I	I	I	I	I
Fructosa-6P	D	D	D	ND	ND
Fucosa	I	I	ND	NC	I
GABA	I	I	ND	D	I
Galactinol	I	I	D	D	NC
Glicerato	I	I	NC	I	NC
Glucosa	I	I	NC	NC	I
Glucosa-6P	D	D	D	I	NC
Glutamina	I	I	NC	NC	I
Mioinositol	I	I	NC	NC	I
Succinato	I	I	ND	I	NC
Trehalosa	I	I	I	NC	NC
Xilosa	I	I	ND	I	I
<b>Tendencia</b>					
Cambiados	15	15	5	4	8
No cambiados / dirección opuesta a <i>glg2</i>	0	0	5	10	6
No determinados	0	0	5	1	1

La totalidad de los metabolitos que cambiaron de forma sistemática en la parte aérea de las plantas *g1g2* (15 metabolitos) también fueron modificados en el mismo sentido en las partes aéreas de las plantas *g1g2* RBCS:G1 y *g1g2* HS:G1 cuando se determinaron (Tabla 4.12). Sin embargo, la mayoría de estos cambios se revirtieron en las plantas *g1g2* 35S:G1 y algunos de ellos en las plantas *g1g2* PHT:G1 o en las plantas *g1g2* crecidas en presencia de serina. Estos resultados corroboran la falta de complementación de la expresión de la *GAPCp1* en las células fotosintéticas.

En raíces, se realizaron únicamente dos condiciones experimentales con las plantas mutantes *g1g2* o con las plantas mutantes condicionales. Con el objetivo de filtrar los resultados nos centramos sobre todo en los metabolitos que cambiaron en 1,5 veces al menos en una de las dos condiciones ensayadas (Tabla 4.13). En general, los aminoácidos aumentaron en las plantas *g1g2* con respecto a las plantas control, pero únicamente la alanina, la beta-alanina, el GABA, y los dos aminoácidos que participan en el transporte del nitrógeno orgánico, la glutamina y la asparagina, aumentaron más del 50% (Tabla 4.8). Con respecto a los azúcares, la fructosa, el galactinol, el mioinositol, la rafinosa y la trehalosa aumentaron más del 50% mientras el treitol disminuyó en más de un 50% con respecto a las plantas control. El ácido orgánico glicerato aumentó más de tres veces en los mutantes *g1g2*. Al igual que en la parte aérea, el ácido fosfórico disminuyó en las raíces de las plantas *g1g2* pero la reducción era solo de 40% aproximadamente (Tabla 4.8).

Los cambios en todos estos metabolitos también se observaron en las plantas *g1g2* RBCS:G1 y *g1g2* PHT:G1 con respecto a las plantas silvestres. Sin embargo los niveles de algunos de ellos (9 de 12) se revirtieron parcialmente de forma significativa en las plantas *g1g2* PHT:G1 con respecto a las plantas *g1g2*, lo que confirma la idea de que la expresión de la *GAPCp1* bajo el control del *ProPHT* complementa parcialmente los mutantes *g1g2* (Tabla 4.13).

Siete de los metabolitos cuyos niveles cambiaron en las raíces de las plantas *glg2* (GABA, glutamina, mioinositol, galactinol, fructosa, trehalosa y glicerato) estaban también modificados en la parte aérea (Tabla 4.12 y Tabla 4.13).

**Tabla 4.13.** Metabolitos en raíces de plantas *glg2*, RBCS:G1 y PHT:G1 que cambiaron de forma significativa con respecto a las plantas silvestres (WT), o de plantas RBCS:G1 y PHT:G1 que cambiaron de forma significativa con respecto a las plantas *glg2*. Las letras "D", "I" y "NC" indican un "Decrecimiento", "Incremento" y "No Cambiado", respectivamente.

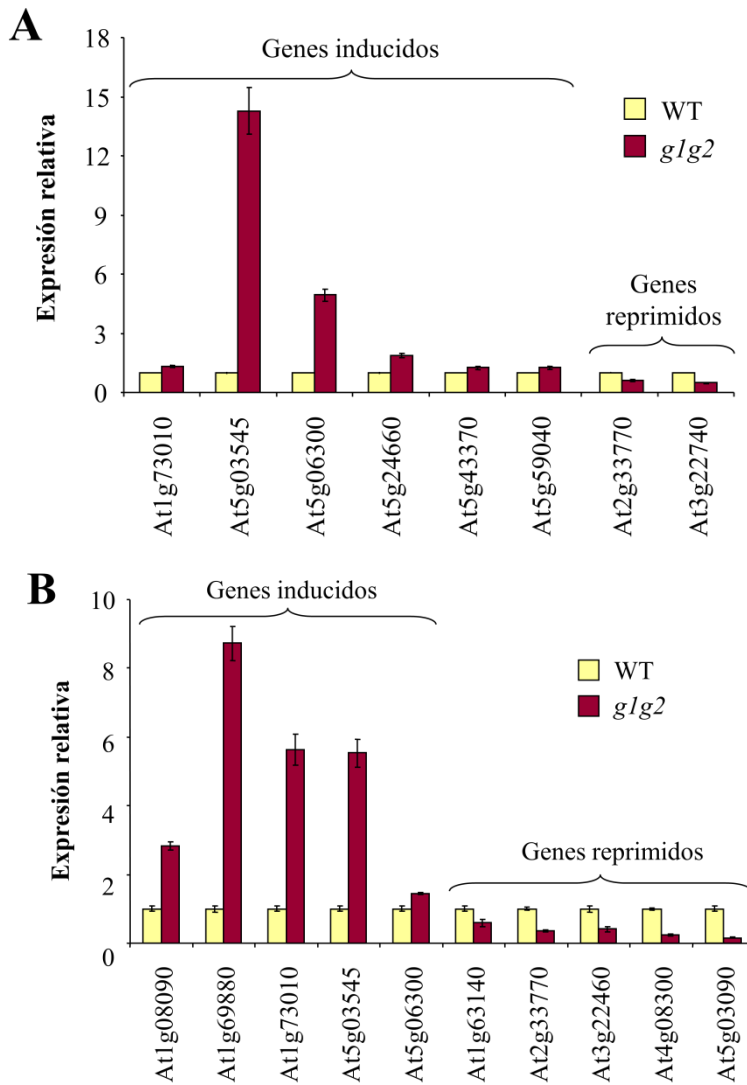
Metabolitos	Con respecto al WT			Con respecto al <i>glg2</i>	
	<i>glg2</i>	RBCS:G1	PHT:G1	RBCS:G1	PHT:G1
Treitol	D	D	D	NC	I
Alanina	I	I	I	NC	NC
Asparagina	I	I	I	NC	D
beta-Alanina	I	I	I	NC	D
Fructosa	I	I	I	I	D
GABA	I	I	I	NC	D
Galactinol	I	I	I	NC	D
Glutamina	I	I	I	NC	NC
Glicerato	I	I	I	I	D
Mioinositol	I	I	I	NC	D
Rafinosa	I	I	I	I	NC
Trehalosa	I	I	I	NC	D
Tendencia					
Cambiados	12	12	12	3	9
No cambiados	0	0	0	9	3

### Aproximación transcriptómica

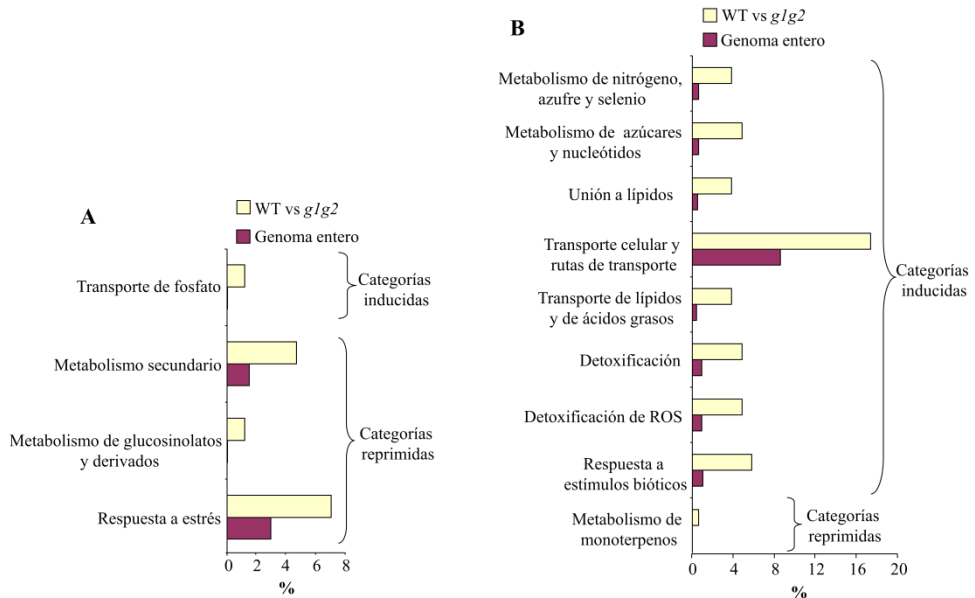
Además de los estudios metabolómicos, quisimos estudiar también cuáles eran los genes afectados en las plantas *g1g2* que serían responsables del fenotipo observado. Para ello realizamos un análisis transcriptómico comparando las partes aéreas y las raíces de plántulas *g1g2* respecto al control silvestre. El diseño experimental se describe en detalle en el Apartado 2.15.1. Se eligieron los genes que presentaban valores de inducción o represión superiores a 1,5 veces con respecto al control. Para validar el experimento, elegimos varios genes inducidos y reprimidos en las partes aéreas y en las raíces y comparamos por RT-qPCR su expresión relativa con respecto a las plantas silvestres (Figura 4.22).

El estudio de las categorías funcionales se realizó utilizando la página web <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/> y anotamos la función de cada gen según la página [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org).

Utilizando el programa "*MIPS FUNCAT FUNCTIONAL ANNOTATION*" (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>) pudimos comprobar que en la parte aérea la única categoría inducida fue la relacionada con el transporte del fosfato, en la que encontramos los genes At2g38940 (*PHT1.4*) y At5g43370 (*PHT1.2*). En lo que se refiere a categorías reprimidas, nos encontramos varios genes implicados en el metabolismo secundario y en la respuesta al estrés. En concreto 8 genes implicados en el metabolismo secundario como por ejemplo el metabolismo de las auxinas (At5g25620, *YUCCA6*) o del etileno (At2g19590, *ACO1*), y de forma más específica en el metabolismo de los glucosinolatos y derivados (At1g16410, *CYP79F1*; At3g19710, *BCAT4*; At5g67520, *APK4*). Otros genes reprimidos estaban implicados en la respuesta al estrés. Algunos ejemplos representativos de estos genes son por ejemplo At2g33770 (*PHO2* o *UBC24*) que codifica una enzima ubiquitina de conjugación implicada en la homeostasis del fosfato; At3g03190, que codifica una glutatión S-transferasa implicada en la respuesta al estrés oxidativo, y At1g19640 que codifica la enzima ácido jasmónico carboxilo metiltransferasa (*JMT*) implicada en el metabolismo del ácido jasmónico.



**Figura 4.22.** Cuantificación de los niveles de transcritos usando la RT-qPCR para validar el análisis transcriptómico WT vs *glg2*. A, Expresión de genes en la parte aérea. B, expresión de genes en la raíz. Los valores de expresión de cada gen en WT se usaron como referencia ( $n \geq 3$ ).



**Figura 4.23.** Categorías funcionales enriquecidas en las plantas *glg2* con respecto a las plantas silvestres (WT) en la parte aérea (A) o en la raíz (B). Los valores representan el porcentaje de genes presentes en cada categoría con respecto al número total de genes en la comparación “WT vs *glg2*” y en el genoma entero de *Arabidopsis*. Todas las categorías están enriquecidas significativamente ( $P < 0,005$ ) y los genes presentes en cada categoría presentan una alteración de 1,5 veces con respecto al WT.

En las raíces de las plántulas *glg2*, se indujeron categorías funcionales implicadas en el metabolismo (del nitrógeno, del azufre y de los nucleótidos), proteínas con función de unión o que requieren un cofactor (unión a lípidos), transporte celular (*At1g58360*, *AAP1*, permeasa de aminoácidos) y transportadores de iones (*At1g08090*, *NRT2*, transportador de nitrato de alta afinidad; *At3g51860*, *CAX3*, intercambiador de cationes), respuestas bióticas y abióticas (peroxidasas como *At1g49570* y *At5g51890*, tioredoxinas como *At4g32580* y *At1g69880*, o genes que responden a ataques de patógenos como *At4g12470* (*AZII*). Por el contrario, solamente se encontró una categoría reprimida, que estaba relacionada con el metabolismo de los monoterpenos (Figura 4.23B).

Con el objetivo de ir más allá en la caracterización de los genes que podrían estar afectados por la ausencia de la actividad de la GAPCp1, comparamos los genes desregulados en este estudio con un análisis previo realizado por nuestro grupo en el cual se analizaron plántulas enteras (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Encontramos solo dos genes comunes a todos los análisis (WT vs *glg2*-plántulas enteras; WT vs *glg2*-parte aérea; WT vs *glg2*-raíces; *glg2* vs *glg2* HS:G1-parte aérea, con tratamiento; *glg2* vs *glg2* HS:G1-raíz, con tratamiento; ver la sección siguiente) los cuales eran At5g06300 y At1g73010. Ambos genes estaban inducidos en los mutantes *glg2* y esta inducción se confirmó por RT-qPCR (Figura 4.22).

At5g06300 (*LOG7*, *Lonely guy 7*) codifica una lisina descarboxilasa que se ha implicado en el mantenimiento del meristemo apical del tallo y que juega un papel en el crecimiento correcto de la raíz principal (Tokunaga y col., 2012). At1g73010 codifica una fosfatasa específica de pirofosfato (PPsPasa1) que cataliza la escisión específica de éste. Su expresión está inducida en el tallo del mutante *cax1/cax3* (Liu y col., 2011) y se ha sugerido que juega un papel importante en la respuesta a una deficiencia en fosfato proporcionando Pi a partir de sustratos fosforilados (May y col., 2011). Dado que el análisis metabolómico en la parte aérea indicó una reducción drástica del nivel de ácido fosfórico en los mutantes *glg2* buscamos en el análisis transcriptómico otros genes desregulados que estarían implicados en la homeostasis y en el metabolismo del fosfato. Encontramos 4 genes que estaban inducidos [At1g23140, At3g17790 (*PAP17*), At5g20150 y At2g38940 (codifica el PHT1.4, ya descrito anteriormente)]. La expresión de estos genes estaba también inducida en la parte aérea de los mutantes *cax1/cax3*, que son transportadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  cuya actividad está requerida para la homeostasis sistémica del fosfato implicando la señalización tallo/raíces en *Arabidopsis* (Liu y col., 2011). Otros dos genes, At2g01890 (*PAP8*, codifica una fosfatasa ácida púrpura) y At5g43370 (*PHT1.2*) estaban también inducidos en la parte aérea de los mutantes *glg2*. Las fosfatasas ácidas púrpura (PAPs) son ATPasas no específicas que

hidrolizan el Pi de un amplio rango de monoésteres de fosfato inorgánico para proporcionar Pi en situaciones de deficiencia de fosfato (Plaxton y Tran, 2011).

Finalmente, de los 16 genes desregulados tanto en la parte aérea y en las raíces de los mutantes *g1g2*, tres de ellos estaban relacionados con la homeostasis del fosfato. Además de la PPsPasa1 mencionada anteriormente, un segundo gen At5g03545 (*ATIPS2*) que se expresa en respuesta a una deficiencia en fosfato estaba también inducido en los mutantes *g1g2* en comparación con los controles. El tercer gen encontrado es *UBC24* que era el único gen relacionado con el fosfato que estaba reprimido en la parte aérea y en las raíces de los mutantes *g1g2*. *UBC24* funciona en condiciones de abundancia de Pi para promover la degradación proteolítica de los genes que se inducen en condiciones de deficiencia de fosfato incluyendo los transportadores de alta afinidad a Pi de la membrana citoplasmática (Plaxton y Tran, 2011).

#### **4.6.7. Evaluación del contenido en macronutrientes y micronutrientes.**

Dado que los análisis metabolómicos y transcriptómicos indicaron una alteración de la homeostasis del fosfato, medimos el contenido en minerales en las plantas *g1g2*, *g1g2* PHT:G1 y silvestres (Tabla 4.14).

Los contenidos en varios minerales disminuyeron en la parte aérea de las plantas *g1g2* con respecto a las plantas silvestres, pero la mayor deficiencia observada fue la del fosfato.

En raíces, a pesar de que algunos nutrientes (potasio, cobre, hierro) fueron menores en las plantas *g1g2* con respecto a las plantas silvestres, no se observó una deficiencia en fosfato, y algunos nutrientes (nitrógeno, manganeso y zinc) estaban incluso aumentados.



**Tabla 4.14.** Concentración de macronutrientes y micronutrientes en las plantas silvestres (WT), *g/g2* y PHT:G1. Los valores (media ± SE; n = 3) se expresan en mg/100 mg de peso seco para los macronutrientes y en mg/kg de peso seco para los micronutrientes. Los valores en negrita son significativamente distintos a los valores de las plantas WT ( $P < 0,05$ ).

	Parte aérea			Raíces		
	WT	<i>g/g2</i>	PHT:G1	WT	<i>g/g2</i>	PHT:G1
<b>Macronutrientes</b>						
N	7,44 ± 0,18	<b>6,21 ± 0,13</b>	<b>6,03 ± 0,10</b>	3,43 ± 0,12	<b>7,24 ± 0,48</b>	<b>4,19 ± 0,15</b>
P	1,07 ± 0,02	<b>0,40 ± 0,01</b>	<b>0,38 ± 0,02</b>	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,03	<b>0,36 ± 0,01</b>
K	5,23 ± 0,05	<b>3,57 ± 0,00</b>	<b>3,84 ± 0,01</b>	3,11 ± 0,15	<b>2,25 ± 0,22</b>	<b>1,57 ± 0,09</b>
Ca	0,80 ± 0,01	<b>0,58 ± 0,00</b>	<b>0,58 ± 0,00</b>	0,34 ± 0,03	0,32 ± 0,00	0,37 ± 0,04
Mg	0,24 ± 0,00	<b>0,17 ± 0,00</b>	<b>0,18 ± 0,00</b>	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00
S	0,91 ± 0,01	<b>0,59 ± 0,00</b>	<b>0,56 ± 0,00</b>	0,47 ± 0,04	0,51 ± 0,08	<b>0,36 ± 0,03</b>
Na	0,51 ± 0,01	<b>0,37 ± 0,00</b>	<b>0,36 ± 0,01</b>	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,03
<b>Micronutrientes</b>						
B	69,70 ± 0,37	<b>76,10 ± 1,77</b>	<b>83,40 ± 0,42</b>	28,50 ± 1,02	31,15 ± 1,17	27,60 ± 2,12
Cu	2,50 ± 0,09	<b>1,39 ± 0,00</b>	<b>1,30 ± 0,01</b>	4,46 ± 0,09	<b>2,77 ± 0,00</b>	<b>2,94 ± 0,00</b>
Fe	72,20 ± 1,44	<b>58,65 ± 0,88</b>	<b>55,80 ± 0,62</b>	270,50 ± 3,50	<b>136,65 ± 2,93</b>	<b>120,30 ± 1,25</b>
Mn	153,17 ± 1,49	<b>134,75 ± 0,60</b>	<b>143,50 ± 0,55</b>	90,60 ± 4,33	<b>261,70 ± 31,47</b>	<b>177,30 ± 15,35</b>
Zn	143,87 ± 5,18	<b>95,40 ± 1,70</b>	<b>94,40 ± 1,43</b>	216,00 ± 15,34	<b>368,65 ± 52,57</b>	218,80 ± 12,64

**4.6.8. Suplementación del medio de cultivo con minerales.**

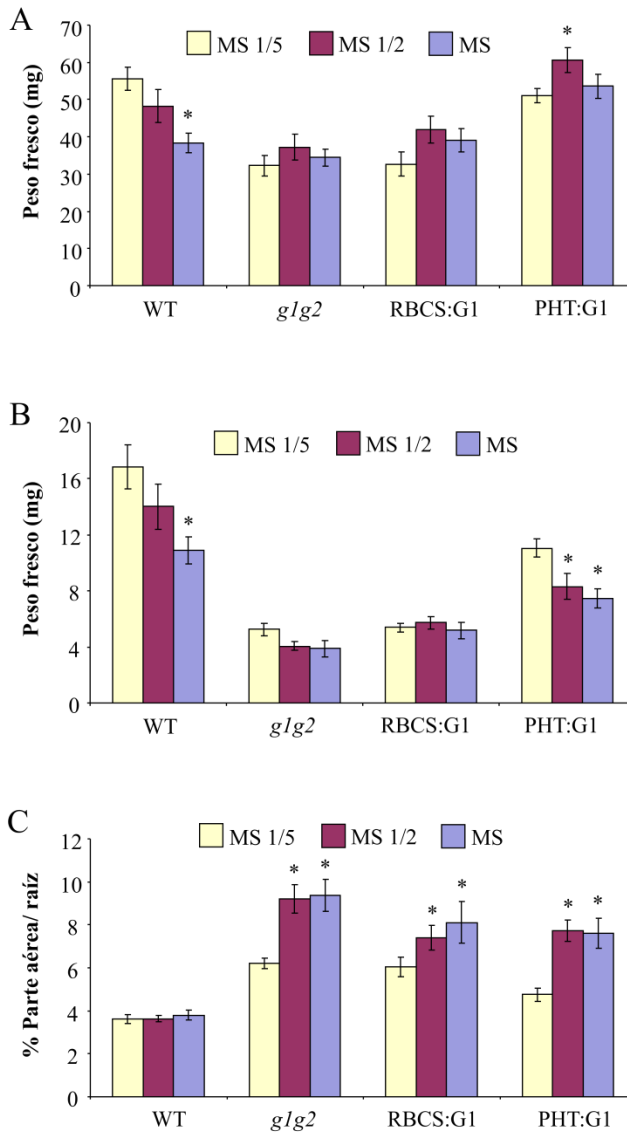
Con el objetivo de estudiar si la nutrición mineral estaría afectando al desarrollo de los mutantes *g1g2*, ensayamos el crecimiento de éstos en medios con un mayor suministro de minerales (Figura 4.24). A pesar de que el crecimiento de los mutantes *g1g2* en MS 1/2 y MS incrementó de forma significativa el ratio parte aérea/raíz en comparación con plantas crecidas en medio estándar (MS 1/5), el crecimiento de la parte aérea no aumentó de forma significativa, indicando que la deficiencia en nutrientes no era al menos la única causa de las alteraciones del desarrollo de las plantas *g1g2*.

**4.6.9. Medidas de actividades enzimáticas**

El análisis metabólico indicó un aumento de metabolitos del ciclo de Krebs y por ello realizamos un análisis de las actividades enzimáticas de dos enzimas de este ciclo en partes aéreas y raíces, además de otras dos enzimas glicolíticas (Tabla 4.16). En parte aérea la actividad de la fumarasa aumentó y sin embargo la actividad de la enzima glicolítica piruvato quinasa (PK) disminuyó. En raíces no se mantuvo el mismo patrón y solo se redujo la actividad de la enzima glicolítica fosfoglicerato quinasa (PGK).

**Tabla 4.15.** Medida de la actividad de la citrato sintasa, fumarasa, piruvato quinasa y fosfoglicerato quinasa en plántulas de las líneas *g1g2* y silvestres (WT). Los valores representan la media ± SE (n=3). Los valores en negrita son significativamente distintos de los valores de las plantas WT (P < 0,05). La actividad está expresada en nmol NADH.g<sup>-1</sup> de peso fresco.min<sup>-1</sup>.

Enzimas	Parte Aérea		Raíz	
	WT	<i>g1g2</i>	WT	<i>g1g2</i>
Citrato sintasa	3104 ± 721	4081 ± 515	1095 ± 273	1519 ± 337
Fumarasa	17362 ± 1643	<b>20782 ± 1611</b>	1016 ± 192	1195 ± 112
Piruvato quinasa	122,8 ± 3,6	<b>90,8 ± 3,4</b>	83,5 ± 6,83	81 ± 7
Fosfoglicerato quinasa	247,6 ± 14,6	260,9 ± 11,4	33,6 ± 2,1	<b>59,9 ± 2,5</b>



**Figura 4.24.** Caracterización fenotípica de plantas crecidas *in vitro* en medio estándar (MS 1/5) y en medio con mayor suministro de minerales (MS 1/2 y MS). Se analizaron plantas control (WT), *glg2*, *glg2* RBCS:G1 (RBCS:G1) y *glg2* PHT:G1 (PHT:G1). Los pesos frescos de la parte aérea y de la raíz se midieron en plántulas de 20 días. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 30$ ). Los asteriscos representan valores significativamente distintos a las medidas de las plantas crecidas en medio MS 1/5 ( $P < 0,05$ ).

#### **4.7. DIANAS METABÓLICAS Y GENÓMICAS PRIMARIAS DE LA ACTIVIDAD DE LA GAPCp1**

Como hemos visto anteriormente, la expresión específica de la GAPCp1 en las células fotosintéticas de la parte aérea no permite revertir el fenotipo de las plantas *g1g2*. En cambio, la expresión específica de la GAPCp1 en las raíces complementa parcialmente el fenotipo de las plantas *g1g2*, en concreto en la parte aérea que se asemeja más al fenotipo de las plantas silvestres. Estos resultados sugieren la necesidad de una señal que comunique la ausencia de actividad de la GAPCp1 en las raíces, y por ello buscamos las dianas primarias de la actividad de la GAPCp1 en raíces y partes aéreas utilizando para ello mutantes condicionales.

##### **4.7.1. Obtención de mutantes condicionales de la GAPCp1.**

La expresión condicional de genes es una potente herramienta en la biotecnología y en la investigación en general, ya que permite la producción de una proteína de interés en el organismo objeto del estudio solo en un momento preciso. La gama de agentes que permiten una expresión inducible es muy variada pero tienen que ser inocuos para el organismo, deben provocar una fuerte expresión del gen de interés en función de su dosis, y esta expresión tiene que ser mínima sin inducción. En la literatura, se ha demostrado que el promotor de la proteína de choque térmico HSP18.2 y el sistema *AlcA* inducido por el etanol cumplen estos requisitos (Matsuhara y col., 2000; Roslan y col., 2001; Garoosi y col., 2005), por lo que fueron elegidos para obtener mutantes *g1g2* condicionales.

Para obtener plantas *g1g2* expresando la GAPCp1 de forma condicional se transformaron plantas *g1g1 G2g2* con las construcciones génicas *ProHS:G1* y *ProAlcA:G1* para generar respectivamente las líneas transgénicas *g1g1 G2g2 HS:G1* y *g1g1 G2g2 AlcA:G1* (Apartado 2.4). De forma resumida, la inducción en las líneas *g1g1 G2g2 HS:G1* se realizaría con choques térmicos de una hora a 37°C, y para las líneas *g1g1 G2g2 AlcA:G1*, la inducción se realizaría regando las plantas con una solución de 0,1% de etanol o en presencia continua de vapor de etanol.

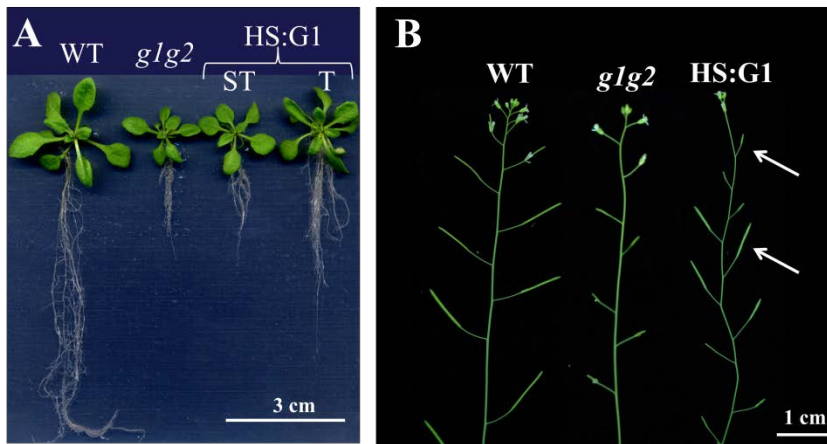
En la Tabla 4.16, se puede ver el número de líneas obtenidas en estas transformaciones, mostrando que al final del proceso (generación T<sub>3</sub>) se obtuvieron 7 líneas *g1g1 G2g2 HS:G1* y 22 líneas *g1g1 G2g2 AlcA:G1*, todas ellas homocigotas y de una sola inserción para el T-DNA. Para elegir las líneas que mejor respondían al agente inductor, nos centramos en aquellas que producían plantas *g1g2* fértiles tras un tratamiento con el agente inductor (recordamos que las plantas *g1g2* son estériles y que se obtienen por segregación de las plantas *g1g1 G2g2*). En las líneas *g1g1 G2g2 HS:G1* nos encontramos que 2 de ellas producían plantas homocigotas fértiles sin tratamiento de calor, otras dos producían plantas estériles a pesar del tratamiento, y las 3 restantes producían plantas homocigotas estériles sin tratamiento y fértiles tras el choque térmico. Las plantas homocigotas *g1g2* procedentes de estas 3 últimas líneas heterocigotas se denominaron HS:G1.4, HS:G1.5 y HS:G1.7 y fueron las únicas que se pudieron utilizar para los sucesivos experimentos, ya que las líneas *g1g2 AlcA:G1* mostraron esterilidad con y sin tratamiento de inducción.

**Tabla 4.16.** Líneas transgénicas obtenidas tras transformar las plantas *g1g1 G2g2* con las construcciones que dirigen la expresión de la GAPCp1 de forma condicional.

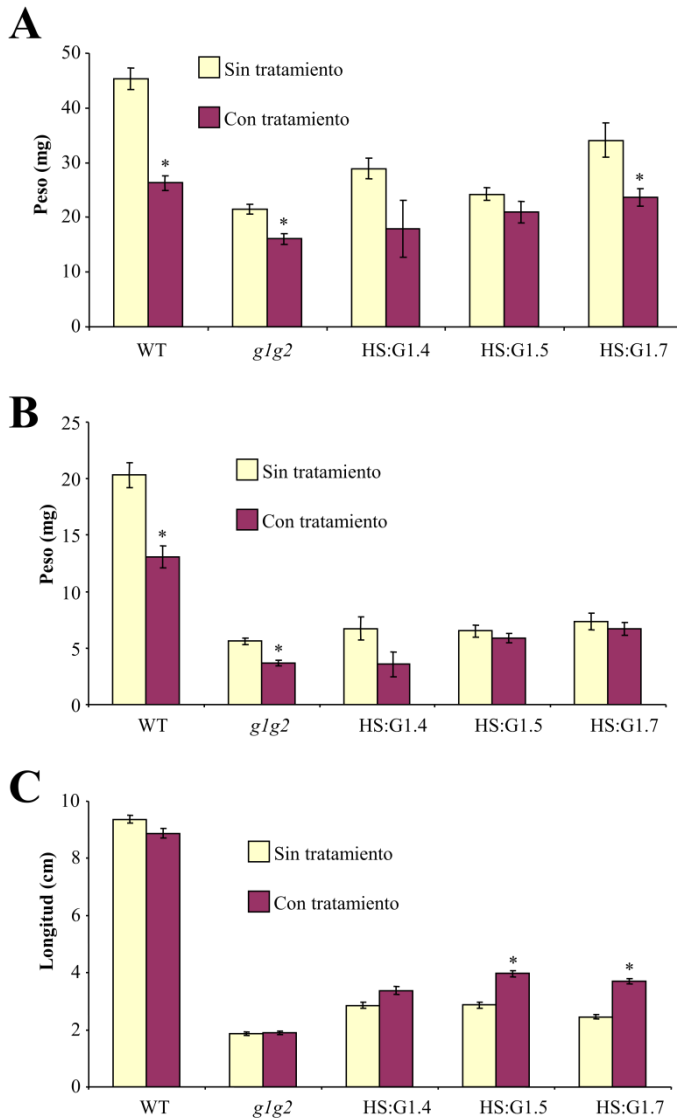
Generación	HS:G1			Alc:G1		
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Número de plantas transformantes	18	7	7	105	47	22

#### 4.7.2. Caracterización fenotípica de las plantas *glg2* HS:G1

Con el objetivo de determinar si existían diferencias entre las plantas *glg2* HS:G1 respecto a las plantas *glg2* procedimos a su evaluación morfológica. Los resultados mostraron que con respecto a las líneas *glg2* HS:G1 sin tratamiento, las líneas *glg2* HS:G1 tratadas tenían una longitud de raíz primaria mayor. Sin embargo, el peso fresco de la parte aérea y de las raíces era menor al igual que sucedía con las plantas silvestres (Figura 4.25A y Figura 4.26) probablemente por el efecto negativo del choque térmico. Las plantas *glg2* HS:G1 que eran estériles sin tratamiento se volvían fértiles tras un tratamiento diario de una hora a 37°C. Estas mismas plantas dejaban de producir silicuas fértiles cuando ya no eran sometidas al tratamiento (Figura 4.25B).



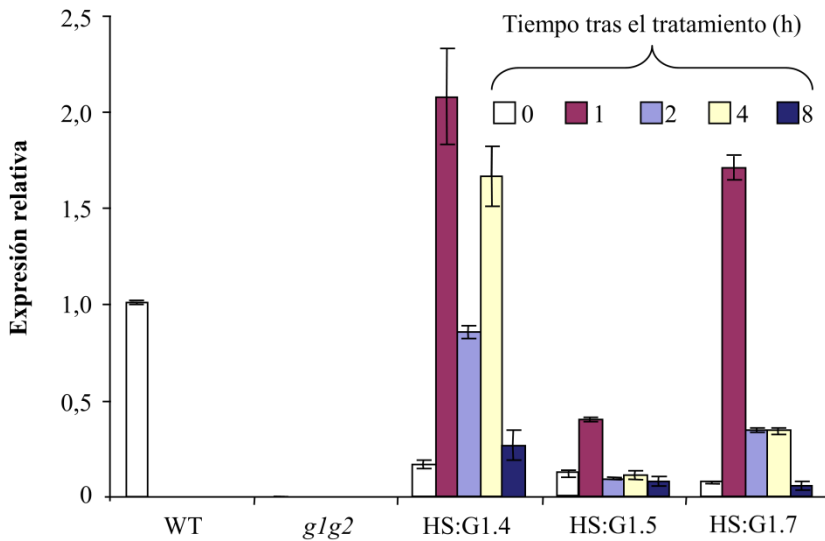
**Figura 4.25.** Fotografías de las plantas silvestres (WT), *glg2* y *glg2* HS:G1. A, Plántulas de 21 días crecidas *in vitro*. B, Silicuas de plantas adultas crecidas en invernadero. Las flechas indican silicuas estériles sin tratamiento y fértiles tras el tratamiento en las líneas HS:G1. Abreviaturas, ST= sin tratamiento; T=con tratamiento.



**Figura 4.26.** Caracterización fenotípica de las plantas silvestres (WT), *glg2* y *glg2* HS:G1. A, Peso fresco de la parte aérea. B, Peso fresco de la raíz. C, Longitud de la raíz primaria. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n > 30$ ). Los plántulas crecieron *in vitro* durante 21 días. Los asteriscos representan valores significativos con respecto a las plantas sin tratar ( $P < 0,05$ ).

### 4.7.3. Expresión del gen *GAPCp1* tras el tratamiento de inducción en los mutantes condicionales

La expresión a lo largo del tiempo del gen *GAPCp1* tras su inducción en los mutantes condicionales se realizó con el fin de decidir el mejor tiempo para los análisis de transcriptómica y metabolómica. Los niveles de expresión relativa se midieron por RT-qPCR y mostraron una inducción de la *GAPCp1* tras el tratamiento, cuyos transcritos alcanzaban el máximo nivel de expresión tras una hora del tratamiento (Figura 4.27).

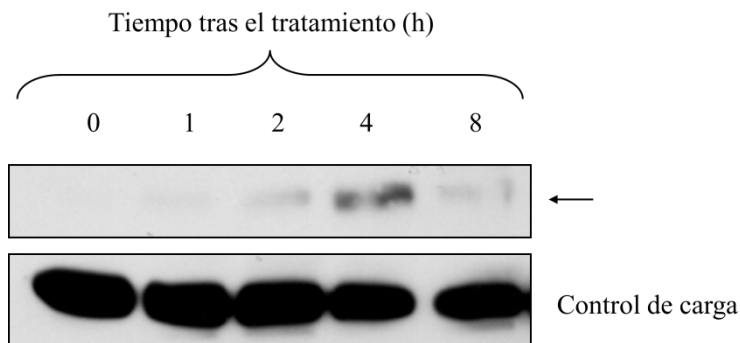


**Figura 4.27.** Expresión relativa de los mRNA del gen *GAPCp1* en la parte aérea de varias líneas transgénicas *glg2* HS:G1 antes el choque térmico y a distintos tiempos tras incubar las plantas durante una hora a 37°C. La expresión relativa en las plantas *glg2* y silvestres (WT) solo se evaluó sin choque. El material para hacer los análisis se recogió de plántulas *in vitro* de 21 días.



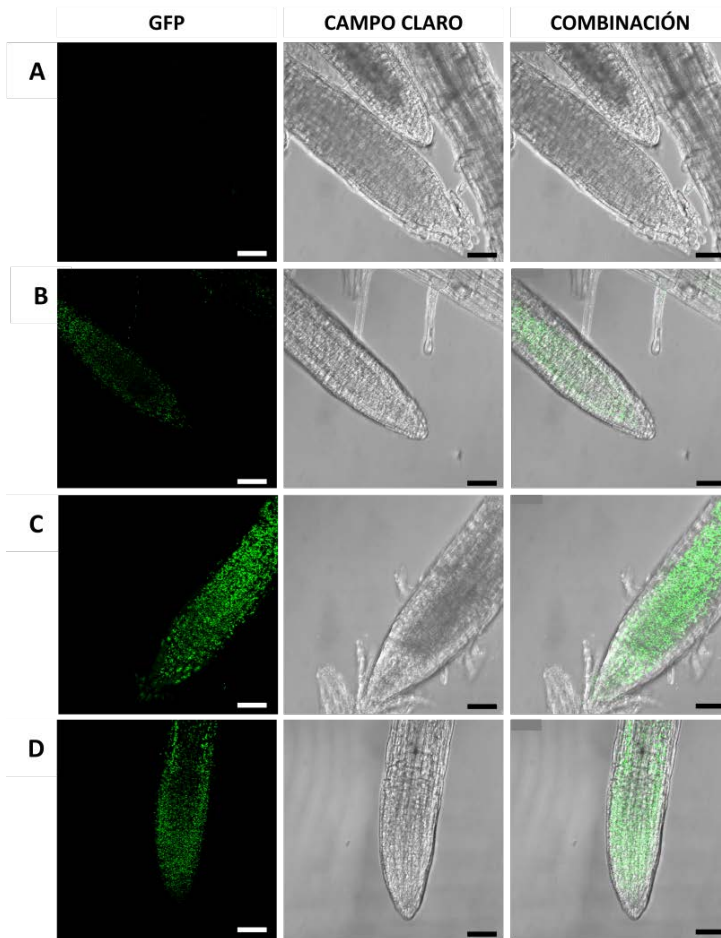
#### 4.7.4. Expresión de la proteína de fusión GAPCp1-GFP en las líneas transformantes con el transcurso del tiempo

Para evaluar la abundancia de la proteína de fusión GAPCp1-GFP en los mutantes condicionales *glg2* HS:G1 tras el tratamiento realizamos un western blot (Figura 4.28). Al igual que el experimento anterior, realizamos esta evaluación con el transcurso del tiempo en plántulas enteras *glg2* HS:G1 (en este experimento se hizo una mezcla de las tres líneas seleccionadas). El resultado muestra que la proteína está ausente o no se detecta sin tratamiento, pero su contenido aumenta con el tiempo para alcanzar un máximo de abundancia 4 h tras el tratamiento. Después de 8 h todavía se puede detectar la proteína aunque con menor señal que tras 4 horas.



**Figura 4.28.** Abundancia de la proteína GAPCp1-GFP en las líneas *glg2* HS:G1 con el transcurso del tiempo tras el choque térmico. Como controles se utilizaron plantas *glg2* o silvestres (WT). Los análisis se realizaron con plántulas enteras de 21 días. Como anticuerpo se utilizó el Anti-GFP.

El resultado del western Blot se confirmó observando las raíces de plántulas de 8 días al microscopio confocal tras la inducción de la GAPCp1 (Figura 4.29). La fluorescencia de las raíces aumentaba gradualmente para alcanzar un máximo 4 h después el tratamiento, y como ocurría en el análisis western blot la proteína seguía presente 8 h tras la inducción.



**Figura 4.29.** Expresión de la GAPCp1-GFP en raíces de plántulas *glg2* HS::G1 de 8 días de edad con el transcurso del tiempo tras 1 h de choque térmico. Imágenes de microscopía confocal de plántulas sin choque (A), o con choque térmico tras 2 h (B), 4 h (C) y 8 h (D). Escala = 100  $\mu$ m.

Los resultados de la abundancia del mRNA y de la proteína tras la inducción del gen *GAPCp1* en los mutantes condicionales nos permitieron elegir el tiempo idóneo para realizar los experimentos de metabolómica y de transcriptómica. Dado que para que la GAPCp1 produjera un efecto sobre la transcripción, primero tendría que ser transcrito el mRNA y luego traducido, las muestras para los experimentos de transcriptómica se recogieron 4 h después del tratamiento. Para

los experimentos de metabolómica la toma de muestras se realizó a las 8 h tras el tratamiento.

#### **4.7.5. Dianas metabólicas y transcriptómicas primarias de la actividad de la GAPCp1**

##### **4.7.5.1. Dianas metabólicas**

Para comprobar la correcta elección del tiempo de toma de muestras tras la inducción para realizar el análisis metabolómico (8 h), decidimos hacer una evaluación previa del efecto del choque térmico en las plantas *g1g2*. De esta manera podríamos descartar los cambios en metabolitos que no estarían producidos por la actividad de la GAPCp1, sino por el choque térmico.

Para este análisis plantas *g1g2* se sometieron o no a un choque térmico y se realizaron dos tomas de muestras a las 4 h y 8 h tras el tratamiento. Los resultados de esta evaluación previa muestran que con respecto a las plantas sin tratar, el perfil de metabolitos está más alterado tras 4 h que tras 8 h, tanto en las partes aéreas como en las raíces. En las plantas *g1g2* tratadas y recogidas tras 8 h solo cambia un metabolito (tirosina) de los 42 medidos en la parte aérea, y en raíces solo cambian cuatro metabolitos (prolina, Glu-6P, Fru-6P y trehalosa) de los 37 medidos, cuando se comparan con las plantas *g1g2* sin tratar (Tabla 4.17).

Estos metabolitos estarían entonces descartados de la interpretación de los resultados en el caso de que aparecieran alterados en los mutantes condicionales *g1g2* HS:G1.

Tras definir el tiempo tras el cual se podía determinar con exactitud las dianas metabólicas primarias de la actividad de la GAPCp1, sometimos plántulas *g1g2* HS:G1 (mezcla de las líneas *g1g2* HS:G1.4 y *g1g2* HS:G1.7) de 20 días, que habían crecido en condiciones no inductoras, a un choque térmico de una hora a 37°C. Estas plantas se recogieron 8 h tras el tratamiento, se analizaron y los resultados se muestran en la Tabla 4.18.

**Tabla 4.17.** Niveles de metabolitos en parte aérea y raíces de plantas *g/ig2* sin tratamiento y tras un tratamiento de 1 h a 37 °C. Los metabolitos se midieron en plántulas de 21 días y se recogieron por separado las partes aéreas y las raíces 4 h (4 h tras ch.) u 8 h (8 h tras ch.) tras el tratamiento de choque térmico y en las plantas sin tratar (sin ch.) al mismo tiempo. Los valores de las plantas tratadas se han normalizado con respecto a los valores de las plantas sin tratar en cada condición experimental. Los valores en negrita son significativamente distintos de las plantas sin tratar en cada condición ( $P < 0,05$ ;  $n \geq 4$ )

	Parte aérea			Raíces				
	S.T. 4h	T. 4h	S.T. 8h	T. 8h	S.T. 4h	T. 4h	S.T. 8h	T. 8h
<b>Aminoácidos</b>								
Ácido piroglutámico	1 ± 0,10	1,03 ± 0,13	1 ± 0,07	1,22 ± 0,19	1 ± 0,04	0,94 ± 0,03	1 ± 0,04	1,04 ± 0,07
Alanina	-	-	-	-	1 ± 0,14	0,71 ± 0,03	1 ± 0,07	1,08 ± 0,17
Arginina	1 ± 0,16	0,72 ± 0,07	1 ± 0,12	1,10 ± 0,19	-	-	-	-
Asparagina	-	-	-	-	1 ± 0,25	1,04 ± 0,19	1 ± 0,19	1,17 ± 0,27
Aspartato	1 ± 0,10	1,07 ± 0,12	1 ± 0,08	1,00 ± 0,18	1 ± 0,17	1,00 ± 0,06	1 ± 0,08	0,99 ± 0,09
Beta-Alanina	1 ± 0,13	0,94 ± 0,14	1 ± 0,07	0,75 ± 0,15	1 ± 0,09	1,21 ± 0,04	1 ± 0,04	1,00 ± 0,07
GABA	1 ± 0,13	0,97 ± 0,16	1 ± 0,10	1,25 ± 0,28	1 ± 0,07	<b>0,75 ± 0,03</b>	1 ± 0,08	0,88 ± 0,07
Glicina	1 ± 0,12	<b>2,33 ± 0,32</b>	1 ± 0,10	2,08 ± 0,43	-	-	-	-
Glutamina	-	-	-	-	1 ± 0,19	0,97 ± 0,08	1 ± 0,08	1,01 ± 0,14
Hidroxiprolina	1 ± 0,10	1,07 ± 0,16	1 ± 0,08	1,24 ± 0,23	1 ± 0,12	0,94 ± 0,07	1 ± 0,03	0,97 ± 0,10
Isoleucina	1 ± 0,11	<b>2,37 ± 0,35</b>	1 ± 0,09	0,74 ± 0,14	-	-	-	-
Lisina	1 ± 0,11	1,01 ± 0,12	1 ± 0,08	0,88 ± 0,16	-	-	-	-
Metionina	1 ± 0,09	1,30 ± 0,17	1 ± 0,07	0,99 ± 0,19	1 ± 0,05	<b>1,31 ± 0,07</b>	1 ± 0,05	0,96 ± 0,06
Fenilalanina	1 ± 0,10	<b>1,77 ± 0,19</b>	1 ± 0,09	0,88 ± 0,16	1 ± 0,05	<b>1,48 ± 0,04</b>	1 ± 0,05	1,12 ± 0,08
Prolina	-	-	-	-	1 ± 0,15	0,65 ± 0,05	1 ± 0,15	<b>0,54 ± 0,10</b>
Serina	1 ± 0,11	1,03 ± 0,14	1 ± 0,08	1,10 ± 0,23	1 ± 0,10	1,06 ± 0,04	1 ± 0,05	0,86 ± 0,06
Treonina	1 ± 0,11	1,33 ± 0,17	1 ± 0,08	1,01 ± 0,19	1 ± 0,07	1,08 ± 0,04	1 ± 0,04	0,94 ± 0,06
Tirosina	1 ± 0,13	1,17 ± 0,16	1 ± 0,05	<b>0,69 ± 0,12</b>	-	-	-	-
Triptófano	1 ± 0,11	0,80 ± 0,07	1 ± 0,10	1,05 ± 0,20	1 ± 0,07	<b>0,72 ± 0,04</b>	1 ± 0,05	0,83 ± 0,09
Valina	1 ± 0,10	<b>2,12 ± 0,32</b>	1 ± 0,10	0,88 ± 0,19	-	-	-	-

Tabla 4.17 (continuación)

	Parte aérea			Raíces				
	S.T. 4h	T. 4h	S.T. 8h	T. 8h	S.T. 4h	T. 4h	S.T. 8h	T. 8h
<b>Ácidos orgánicos</b>								
Ácido galacturónico	1 ± 0,08	1,00 ± 0,11	1 ± 0,07	1,06 ± 0,17	-	-	-	-
Citrato	1 ± 0,08	1,06 ± 0,12	1 ± 0,08	1,11 ± 0,25	-	-	-	-
Dehidroascorbato	-	-	-	-	1 ± 0,22	0,80 ± 0,11	1 ± 0,13	1,01 ± 0,09
Fumarato	1 ± 0,10	1,06 ± 0,14	1 ± 0,07	1,19 ± 0,22	1 ± 0,12	0,99 ± 0,05	1 ± 0,07	0,89 ± 0,07
Glicerato	1 ± 0,12	1,31 ± 0,20	1 ± 0,12	1,36 ± 0,26	1 ± 0,09	0,76 ± 0,07	1 ± 0,06	1,19 ± 0,26
Malato	1 ± 0,08	1,04 ± 0,11	1 ± 0,07	1,18 ± 0,20	1 ± 0,08	1,09 ± 0,06	1 ± 0,05	1,10 ± 0,12
Nicotinato	-	-	-	-	1 ± 0,09	0,95 ± 0,03	1 ± 0,05	0,91 ± 0,07
Succinato	1 ± 0,10	<b>0,65 ± 0,10</b>	1 ± 0,07	1,27 ± 0,24	1 ± 0,08	0,80 ± 0,04	1 ± 0,15	1,08 ± 0,07
<b>Azúcares y alcoholes de azúcar</b>								
Eritritol	1 ± 0,09	1,31 ± 0,16	1 ± 0,08	1,21 ± 0,21	1 ± 0,06	1,11 ± 0,02	1 ± 0,04	1,16 ± 0,07
Fructosa	1 ± 0,11	0,90 ± 0,09	1 ± 0,10	1,04 ± 0,17	1 ± 0,07	<b>0,68 ± 0,04</b>	1 ± 0,15	0,81 ± 0,04
Fructosa-6-P	1 ± 0,13	1,27 ± 0,16	1 ± 0,10	1,26 ± 0,16	1 ± 0,08	1,09 ± 0,06	1 ± 0,05	<b>1,40 ± 0,14</b>
Fucosa	1 ± 0,09	0,95 ± 0,12	1 ± 0,10	1,16 ± 0,23	1 ± 0,09	0,91 ± 0,03	1 ± 0,06	0,86 ± 0,09
Galactinol	1 ± 0,08	<b>1,87 ± 0,28</b>	1 ± 0,11	1,07 ± 0,23	1 ± 0,20	1,06 ± 0,11	1 ± 0,11	1,03 ± 0,09
Glicerol-3-P	1 ± 0,10	<b>2,23 ± 0,25</b>	1 ± 0,10	1,10 ± 0,20	1 ± 0,07	<b>1,65 ± 0,07</b>	1 ± 0,06	1,18 ± 0,13
Glucosa	1 ± 0,10	1,04 ± 0,13	1 ± 0,09	1,32 ± 0,23	1 ± 0,04	<b>0,74 ± 0,09</b>	1 ± 0,07	1,11 ± 0,24
Glucosa-6-P	-	-	-	-	1 ± 0,10	1,23 ± 0,05	1 ± 0,05	<b>1,38 ± 0,09</b>
Inositol	1 ± 0,10	1,04 ± 0,10	1 ± 0,09	0,93 ± 0,17	-	-	-	-
Maltitol	-	-	-	-	1 ± 0,10	0,86 ± 0,15	1 ± 0,09	1,26 ± 0,31
Maltosa	1 ± 0,15	1,26 ± 0,18	1 ± 0,10	0,93 ± 0,17	1 ± 0,12	0,82 ± 0,09	1 ± 0,18	0,85 ± 0,13
Maltotriosa	-	-	-	-	<b>1 ± 0,29</b>	0,91 ± 0,21	1 ± 0,13	0,94 ± 0,15
Manosa/Galactosa	1 ± 0,10	0,83 ± 0,09	1 ± 0,10	1,05 ± 0,18	-	-	-	-
Mioinositol	-	-	-	-	1 ± 0,05	0,87 ± 0,03	1 ± 0,04	0,89 ± 0,10
Rafinosa	1 ± 0,11	1,66 ± 0,30	1 ± 0,11	1,05 ± 0,23	1 ± 0,32	0,73 ± 0,17	1 ± 0,27	1,09 ± 0,16
Ramnosa	1 ± 0,11	1,16 ± 0,16	1 ± 0,10	1,11 ± 0,22	-	-	-	-
Sacarosa	1 ± 0,10	0,86 ± 0,11	1 ± 0,08	0,99 ± 0,17	1 ± 0,09	0,86 ± 0,08	1 ± 0,21	1,91 ± 0,67
Trehalosa	1 ± 0,10	0,77 ± 0,10	1 ± 0,10	0,96 ± 0,18	1 ± 0,13	0,78 ± 0,03	1 ± 0,10	<b>0,75 ± 0,04</b>

Tabla 4.17 (continuación)

	Parte aérea			Raíces				
	S.T. 4h	T. 4h	S.T. 8h	T. 8h	S.T. 4h	T. 4h	S.T. 8h	T. 8h
<b>Otros</b>								
Ácido fosfórico	1 ± 0,08	<b>2,12 ± 0,27</b>	1 ± 0,08	1,31 ± 0,24	1 ± 0,06	<b>1,22 ± 0,07</b>	1 ± 0,13	1,33 ± 0,34
Putrescina	1 ± 0,13	<b>0,61 ± 0,05</b>	1 ± 0,15	1,04 ± 0,18	1 ± 0,09	1,08 ± 0,06	1 ± 0,07	0,93 ± 0,13
Tiramina	1 ± 0,12	0,94 ± 0,12	1 ± 0,08	0,93 ± 0,18	-	-	-	-
Urea	1 ± 0,10	1,03 ± 0,17	1 ± 0,09	1,03 ± 0,19	-	-	-	-

**Tabla 4.18.** Niveles de metabolitos en parte aérea y en raíces de plantas silvestres (WT) y mutantes *g1g2* transformadas (HS:G1) sin tratamiento y tras un tratamiento de 1 h a 37 °C. Las plántulas de 21 días tratadas y no tratadas se recogieron al mismo tiempo 8 h tras el tratamiento de choque térmico a las plantas tratadas. Los datos son relativos y normalizados con respecto a la media calculada para el control silvestre. Los valores representan la media ± SE de 6 repeticiones independientes y los que están en negrita son significativamente distintos a los valores del control silvestre; los valores con un asterisco son significativamente distintos a los valores de las plantas HS:G1 no tratadas ( $P < 0,05$ ).

	Parte aérea						Raíces					
	Sin tratar			Tratadas			Sin tratar			Tratadas		
	WT	HS:G1		WT	HS:G1		WT	HS:G1		WT	HS:G1	
<b>Aminoácidos</b>												
Alanina	1 ± 0,06	<b>0,82 ± 0,04</b>		1 ± 0,05	<b>0,79 ± 0,04</b>		1 ± 0,09	<b>2,01 ± 0,20</b>		1 ± 0,29	<b>1,47 ± 0,11*</b>	
Arginina	1 ± 0,09	1,01 ± 0,06		1 ± 0,14	0,80 ± 0,05*		-	-		-	-	
Asparagina	1 ± 0,12	<b>1,42 ± 0,12</b>		1 ± 0,13	1,17 ± 0,12		1 ± 0,17	<b>2,79 ± 0,40</b>		1 ± 0,19	<b>1,82 ± 0,21*</b>	
Aspartato	1 ± 0,02	<b>1,17 ± 0,03</b>		1 ± 0,06	0,98 ± 0,04*		1 ± 0,02	<b>1,35 ± 0,06</b>		1 ± 0,03	<b>0,88 ± 0,01*</b>	
Beta-Alanina	1 ± 0,03	<b>1,27 ± 0,07</b>		1 ± 0,12	1,06 ± 0,05*		1 ± 0,08	<b>2,33 ± 0,15</b>		1 ± 0,22	1,43 ± 0,10*	
GABA	-	-		-	-		1 ± 0,05	<b>1,62 ± 0,12</b>		1 ± 0,24	<b>1,41 ± 0,07</b>	
Glutamato	1 ± 0,10	1,01 ± 0,06		1 ± 0,06	1,03 ± 0,05		1 ± 0,10	1,17 ± 0,09		1 ± 0,07	0,84 ± 0,05*	
Glutamina	1 ± 0,13	<b>1,53 ± 0,11</b>		1 ± 0,15	1,05 ± 0,08*		1 ± 0,09	<b>2,30 ± 0,23</b>		1 ± 0,18	1,26 ± 0,12*	
Glicina	1 ± 0,02	<b>0,79 ± 0,03</b>		1 ± 0,04	0,98 ± 0,03*		1 ± 0,05	1,17 ± 0,05		1 ± 0,13	1,21 ± 0,05	
Isoleucina	1 ± 0,02	<b>0,87 ± 0,02</b>		1 ± 0,07	0,96 ± 0,03*		1 ± 0,02	0,96 ± 0,03		1 ± 0,06	1,01 ± 0,02	
Metionina	1 ± 0,03	1,01 ± 0,04		1 ± 0,08	0,97 ± 0,04		1 ± 0,04	1,16 ± 0,07		1 ± 0,07	0,96 ± 0,02*	
Omitina	1 ± 0,01	<b>1,09 ± 0,02</b>		1 ± 0,06	0,93 ± 0,03*		-	-		-	-	
Fenilalanina	1 ± 0,05	<b>0,85 ± 0,03</b>		1 ± 0,07	0,94 ± 0,05		1 ± 0,03	<b>0,80 ± 0,04</b>		1 ± 0,04	0,94 ± 0,02*	
Prolina	1 ± 0,04	1,05 ± 0,07		1 ± 0,04	0,97 ± 0,04		1 ± 0,08	1,11 ± 0,09		1 ± 0,06	1,23 ± 0,10	
Serina	1 ± 0,03	<b>0,90 ± 0,02</b>		1 ± 0,04	0,92 ± 0,02		1 ± 0,02	<b>0,85 ± 0,04</b>		1 ± 0,03	<b>0,91 ± 0,03</b>	
Treonina	1 ± 0,01	0,99 ± 0,02		1 ± 0,06	0,98 ± 0,03		1 ± 0,02	1,07 ± 0,04		1 ± 0,09	1,03 ± 0,03	
Tirosina	1 ± 0,13	1,04 ± 0,11		1 ± 0,34	0,56 ± 0,05*		1 ± 0,05	1,16 ± 0,07		1 ± 0,11	1,06 ± 0,05	
Valina	1 ± 0,03	0,91 ± 0,02		1 ± 0,06	0,98 ± 0,03		1 ± 0,03	1,09 ± 0,05		1 ± 0,07	1,06 ± 0,03	

**Tabla 4.18.** (Continuación)

	Parte aérea									
	Sin tratar			Tratadas						
	WT	HS:G1	WT	HS:G1	WT	HS:G1				
			Sin tratar			Raíces				
			WT	HS:G1	WT	HS:G1	WT	HS:G1	WT	HS:G1
<b>Ácidos orgánicos</b>										
Ácido benzóico	-	-	-	-	-	-	1 ± 0,03	<b>0,78 ± 0,06</b>	1 ± 0,07	1,02 ± 0,04*
Ácido treónico	-	-	-	-	-	-	1 ± 0,04	<b>1,35 ± 0,11</b>	1 ± 0,10	1,10 ± 0,06*
Ascorbato	1 ± 0,03	0,92 ± 0,04	1 ± 0,20	1,02 ± 0,12	1 ± 0,08	1,11 ± 0,04	1 ± 0,03	1,09 ± 0,11	1 ± 0,08	1,11 ± 0,04
Fumarato	1 ± 0,01	<b>1,40 ± 0,04</b>	1 ± 0,09	1,13 ± 0,05*	1 ± 0,05	<b>0,84 ± 0,02</b>	1 ± 0,02	<b>0,79 ± 0,05</b>	1 ± 0,05	<b>0,84 ± 0,02</b>
Glicerato	1 ± 0,04	<b>1,44 ± 0,04</b>	1 ± 0,16	1,13 ± 0,06*	1 ± 0,02	<b>1,42 ± 0,07*</b>	1 ± 0,02	<b>4,40 ± 0,06</b>	1 ± 0,23	<b>1,42 ± 0,07*</b>
Malato	1 ± 0,02	<b>1,14 ± 0,03</b>	1 ± 0,05	0,97 ± 0,03*	1 ± 0,01	<b>1,18 ± 0,04</b>	1 ± 0,01	<b>1,18 ± 0,04</b>	1 ± 0,05	0,92 ± 0,03*
Nicotinato	1 ± 0,03	<b>1,17 ± 0,02</b>	1 ± 0,13	0,98 ± 0,04*	1 ± 0,06	1,01 ± 0,04	1 ± 0,06	1,11 ± 0,05	1 ± 0,06	1,01 ± 0,04
Piruvato	1 ± 0,14	1,18 ± 0,13	1 ± 0,17	1,10 ± 0,10	1 ± 0,06	<b>1,44 ± 0,14</b>	1 ± 0,06	<b>1,44 ± 0,14</b>	1 ± 0,24	<b>1,45 ± 0,08</b>
<b>Azúcares y alcoholes de azúcar</b>										
Fructosa	1 ± 0,01	<b>1,36 ± 0,05</b>	1 ± 0,11	1,15 ± 0,05*	1 ± 0,03	<b>2,08 ± 0,11</b>	1 ± 0,03	<b>2,08 ± 0,11</b>	1 ± 0,27	<b>1,73 ± 0,12*</b>
Fructosa-6-P	1 ± 0,05	<b>0,61 ± 0,02</b>	1 ± 0,07	<b>0,52 ± 0,03*</b>	1 ± 0,05	<b>0,72 ± 0,03*</b>	1 ± 0,05	0,99 ± 0,05	1 ± 0,07	<b>0,72 ± 0,03*</b>
Galactinol	1 ± 0,04	<b>1,19 ± 0,05</b>	1 ± 0,12	0,91 ± 0,04*	1 ± 0,03	<b>2,25 ± 0,15</b>	1 ± 0,03	<b>2,25 ± 0,15</b>	1 ± 0,22	<b>1,50 ± 0,07*</b>
Glicerol	1 ± 0,13	0,96 ± 0,03	1 ± 0,06	0,99 ± 0,07	1 ± 0,12	1,05 ± 0,09	1 ± 0,12	1,05 ± 0,09	1 ± 0,10	1,16 ± 0,05
Glucosa	1 ± 0,03	<b>1,38 ± 0,07</b>	1 ± 0,07	1,05 ± 0,07*	1 ± 0,05	1,16 ± 0,07	1 ± 0,05	1,16 ± 0,07	1 ± 0,12	1,10 ± 0,03
Glucosa-6-P	1 ± 0,06	<b>0,55 ± 0,03</b>	1 ± 0,08	<b>0,49 ± 0,03</b>	1 ± 0,04	<b>0,65 ± 0,02*</b>	1 ± 0,04	0,96 ± 0,05	1 ± 0,09	<b>0,65 ± 0,02*</b>
Maltosa	1 ± 0,14	0,92 ± 0,08	1 ± 0,20	1,33 ± 0,04*	1 ± 0,05	0,92 ± 0,06	1 ± 0,05	0,92 ± 0,06	1 ± 0,09	0,86 ± 0,02
Mioinositol	1 ± 0,01	<b>1,24 ± 0,04</b>	1 ± 0,08	1,06 ± 0,04*	1 ± 0,02	<b>1,52 ± 0,07</b>	1 ± 0,02	<b>1,52 ± 0,07</b>	1 ± 0,13	1,21 ± 0,05*
Rafinosa	1 ± 0,04	<b>1,32 ± 0,10</b>	1 ± 0,15	1,25 ± 0,09	1 ± 0,01	<b>1,96 ± 0,13</b>	1 ± 0,01	<b>1,96 ± 0,13</b>	1 ± 0,24	<b>1,51 ± 0,08*</b>
Ribosa	1 ± 0,06	0,98 ± 0,02	1 ± 0,04	0,99 ± 0,05	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	1 ± 0,02	0,96 ± 0,02	1 ± 0,03	0,93 ± 0,02	1 ± 0,04	0,99 ± 0,06	1 ± 0,04	0,99 ± 0,06	1 ± 0,10	1,00 ± 0,03
Treitol	1 ± 0,03	<b>0,71 ± 0,02</b>	1 ± 0,03	<b>0,71 ± 0,02</b>	1 ± 0,02	<b>0,30 ± 0,02</b>	1 ± 0,02	<b>0,30 ± 0,02</b>	1 ± 0,12	<b>0,34 ± 0,04</b>
Trehalosa	1 ± 0,04	<b>1,56 ± 0,12</b>	1 ± 0,18	1,30 ± 0,08	1 ± 0,03	<b>2,29 ± 0,20</b>	1 ± 0,03	<b>2,29 ± 0,20</b>	1 ± 0,26	<b>1,71 ± 0,12*</b>
<b>Otros</b>										
Ácido fosfónico	1 ± 0,02	<b>0,41 ± 0,02</b>	1 ± 0,10	<b>0,41 ± 0,04</b>	1 ± 0,04	<b>0,58 ± 0,02</b>	1 ± 0,04	<b>0,58 ± 0,02</b>	1 ± 0,07	<b>0,61 ± 0,04</b>
Putrescina	1 ± 0,04	<b>1,16 ± 0,05</b>	1 ± 0,08	1,02 ± 0,04	-	-	-	-	-	-
Urea	1 ± 0,03	<b>0,66 ± 0,03</b>	1 ± 0,08	0,94 ± 0,03*	-	-	-	-	-	-



Tras la inducción de la GAPCp1 en plantas *g1g2* HS:G1 el análisis del perfil metabólico indicó que el 54% de los metabolitos en parte aérea (21 de 39) y el 22% en raíces (9 de 37) recuperaron los niveles de las plantas silvestres. En las raíces los niveles de asparagina, glicerato y galactinol se redujeron drásticamente, aunque seguían siendo más altos que las plantas silvestres. En general, en las líneas *g1g2* HS:G1 se observó una reducción de los aminoácidos y los niveles de azúcares, lo que indica el papel crucial de la actividad GAPCp en el metabolismo del nitrógeno y carbono (Tabla 4.18). En esta misma tabla se muestran los metabolitos cuyos niveles se recuperaron tras la inducción de la GAPCp1. Tres de ellos, la glutamina, el glicerato y el galactinol son especialmente interesantes, ya que son los únicos que están alterados en todas las condiciones experimentales ensayadas tanto en las partes aéreas como en raíces. Tras la inducción de la GAPCp1 en las líneas *g1g2* HS:G1, estos tres metabolitos fueron los que experimentaron mayores cambios en sus niveles. En la parte aérea, la glutamina, el glicerato y el galactinol sufrieron una reducción del 48, 31 y 28%, respectivamente. En raíces, la reducción de estos tres metabolitos fue aún más drástica que en la parte aérea, siendo el glicerato el más reducido de todos los metabolitos medidos (casi 300%), seguido por la glutamina (104%) y el galactinol (75%) (Tabla 4.19).

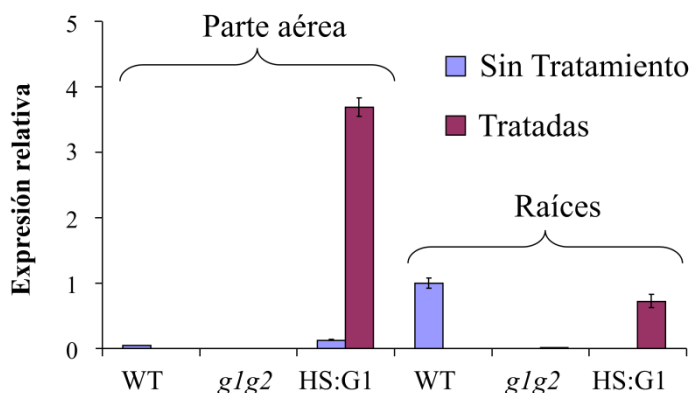
**Tabla 4.19.** Metabolitos en partes aéreas y raíces de plantas HS:G1 “No tratadas” que mostraron una variación de más de 20% tras la inducción de la GAPCp1 en las plantas HS:G1 “Tratadas”.

	No tratadas	Tratadas
<b>Parte aérea</b>		
Arginina	1,01 ± 0,06	0,80 ± 0,05
Glutamina	1,53 ± 0,11	1,05 ± 0,08
Glicina	0,79 ± 0,03	0,98 ± 0,03
Tirosina	1,04 ± 0,11	0,56 ± 0,05
Glicerato	1,44 ± 0,04	1,13 ± 0,06
Galactinol	1,19 ± 0,05	0,91 ± 0,04
Glucosa	1,38 ± 0,07	1,05 ± 0,07
Maltosa	0,92 ± 0,08	1,33 ± 0,04
Urea	0,66 ± 0,03	0,94 ± 0,03
<b>Raíces</b>		
Alanina	2,01 ± 0,20	1,47 ± 0,11
Beta-Alanina	2,33 ± 0,15	1,43 ± 0,10
Asparagina	2,79 ± 0,40	1,82 ± 0,21
Aspartato	1,35 ± 0,06	0,88 ± 0,01
Glutamato	1,17 ± 0,09	0,84 ± 0,05
Glutamina	2,30 ± 0,23	1,26 ± 0,12
Glicerato	4,40 ± 0,06	1,42 ± 0,07
Malato	1,18 ± 0,04	0,92 ± 0,03
Fructosa-6-P	0,99 ± 0,05	0,72 ± 0,03
Galactinol	2,25 ± 0,15	1,50 ± 0,07
Glucosa-6-P	0,96 ± 0,05	0,65 ± 0,02
Mioinositol	1,52 ± 0,07	1,21 ± 0,05
Rafinosa	1,96 ± 0,13	1,51 ± 0,08
Trehalosa	2,29 ± 0,20	1,71 ± 0,12

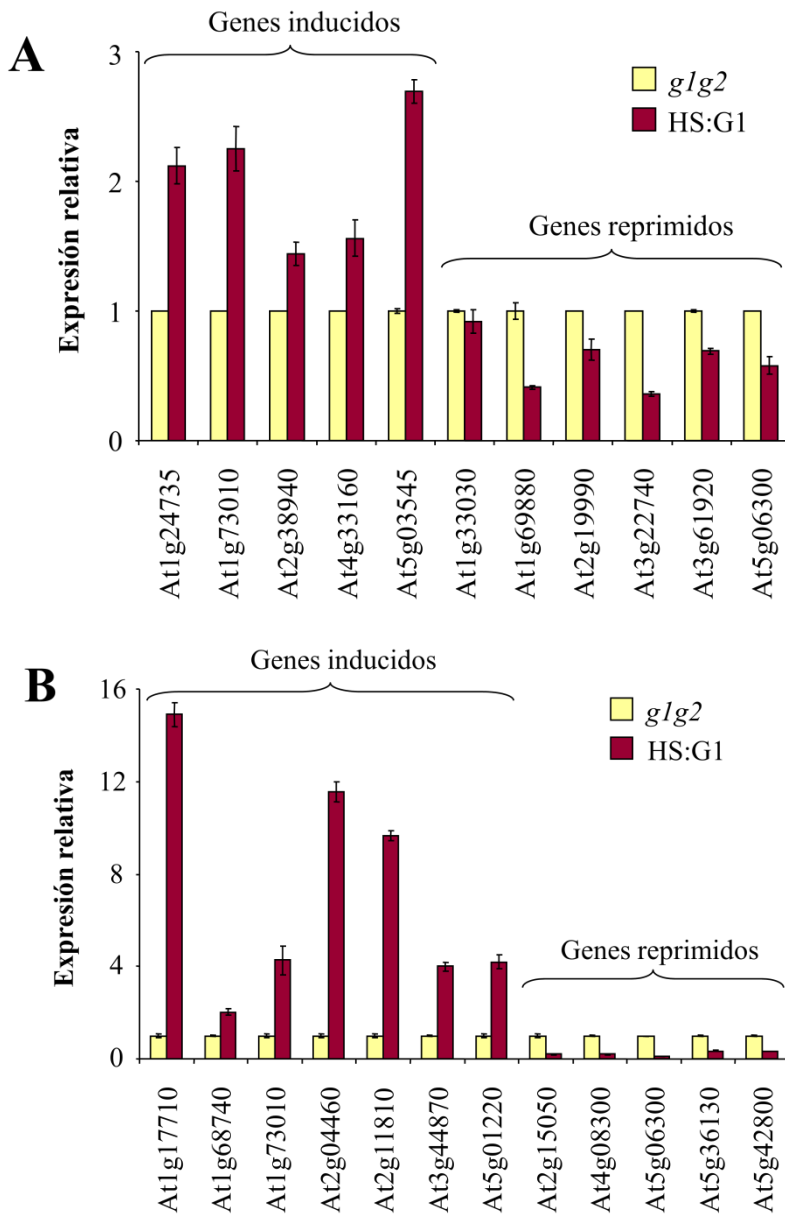
#### 4.7.5.2. Dianas transcriptómicas de la actividad de la *GAPCp1*

El diseño de este experimento se describe en el Apartado 3.16. Brevemente, las plántulas *g1g2* y *g1g2* HS:G1 se cultivaron en condiciones estándar y recibieron el tratamiento de choque térmico una única vez cuando tenían 21 días de edad. Cuatro horas más tarde se recogieron por separado las partes aéreas y raíces y se analizaron.

Para validar los análisis transcriptómicos, comprobamos la inducción de la *GAPCp1* en las partes aéreas y raíces de las plantas *g1g2* HS:G1 mediante RT-qPCR (Figura 4.30) y de la misma forma comprobamos la expresión de varios genes inducidos y reprimidos (Figura 4.31). Tras comprobar que el análisis transcriptómico era correcto se utilizaron todos aquellos genes que tuvieron valores superiores o inferiores a 1,5 veces el valor del control.



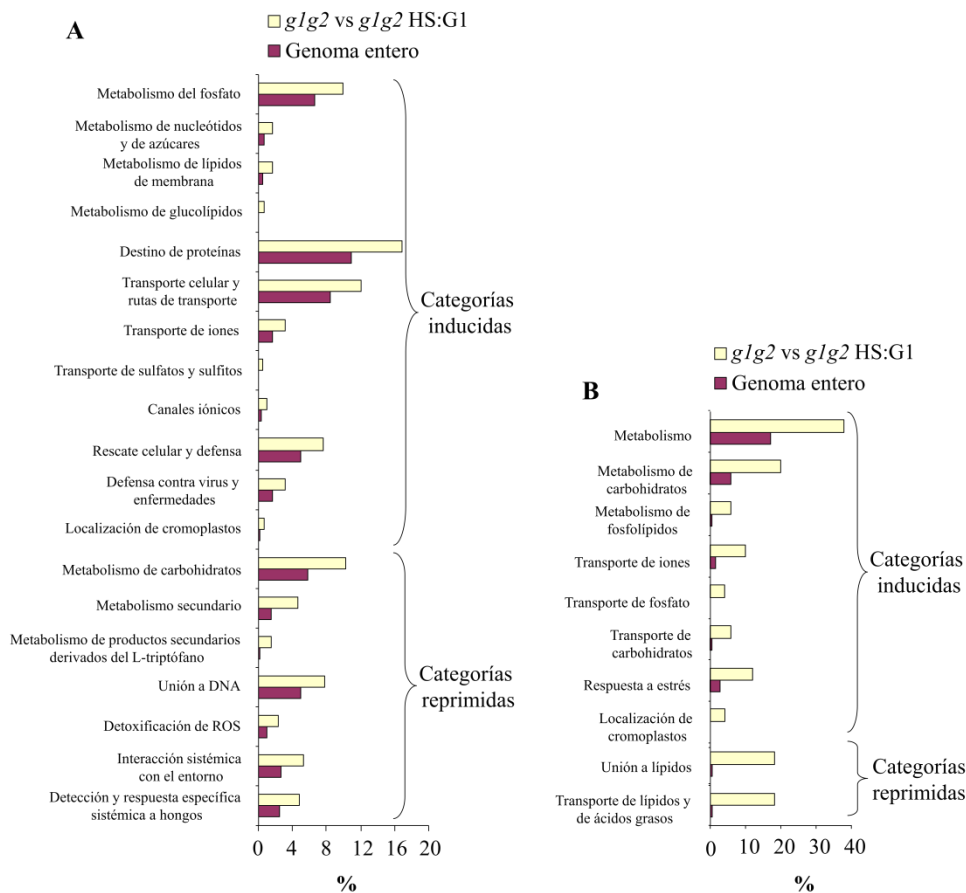
**Figura 4.30.** Expresión relativa del gen *GAPCp1* en partes aéreas y raíces de plántulas silvestres (WT), *g1g2* y *g1g2* HS:G1 (HS:G1). La expresión relativa se cuantificó con respecto a la expresión del gen *GAPCp1* en las raíces de las plantas WT. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres repeticiones. Las plantas *g1g2* HS:G1 tienen una expresión residual en la parte aérea que no interfiere con los análisis.



**Figura 4.31.** Cuantificación de los niveles de transcritos usando la RT-qPCR para validar el análisis transcriptómico *glg2* vs *glg2* HS:G1. A, Expresión de genes en la parte aérea. B, expresión de genes en la raíz. Los valores de expresión de cada gen en la planta *glg2* se usaron como referencia.

El estudio de las categorías funcionales se realizó utilizando la página web <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/> y anotamos la función de cada gen según la página [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org).

El estudio transcriptómico reveló que en las partes aéreas varias categorías funcionales de genes estaban inducidas o reprimidas tras la inducción de la GAPCp1 (Figura 4.32A).



**Figura 4.32.** Categorías funcionales enriquecidas en las plantas *glg2* con respecto a las plantas silvestres (WT) en parte aérea (A) y raíz (B). Los valores representan el porcentaje de genes presentes en cada categoría con respecto al número total de genes en la comparación “WT vs *glg2*” y en el genoma entero de *Arabidopsis*. Todas las categorías están enriquecidas significativamente ( $P < 0,005$ ) y los genes presentes en cada categoría presentan una alteración de 1,5 veces con respecto al control.

Los genes inducidos en las partes aéreas se podían incluir en diferentes categorías: el metabolismo (metabolismo del fosfato, metabolismo de los nucleótidos y de azúcares, metabolismo de los lípidos de membrana, metabolismo de los glucolípidos), el destino de proteínas, el transporte celular (transporte de iones, transporte de sulfato, canales de iones), el rescate de células, la defensa y la virulencia (enfermedades, virulencia y defensa), y la localización subcelular (localización de los cromoplastos). Los genes reprimidos en las partes aéreas se podían incluir en muchas categorías: el metabolismo primario (específicamente genes que codifican por metiltransferasas que participan en el metabolismo de un carbono: At1g33030, At1g76090 y At3g22740), el metabolismo secundario (metabolismo de productos derivados del L-triptófano), genes que codifican proteínas implicadas en la unión al DNA, genes que participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y a la respuesta a estreses bióticos.

En las raíces, las categorías funcionales de genes inducidos incluyen el metabolismo, el transporte (fosfato, nitrato, sulfato y aminoácidos), respuesta a estrés oxidativo y virulencia (Figura 4.32B).

Con el objetivo de identificar de forma más específica las posibles dianas de la actividad de la GAPCp1, hemos buscado aquellos genes que estaban alterados en las plantas mutantes dobles *glg2* en comparación con las plantas silvestres, y cuya expresión se revirtió por la actividad de la GAPCp1 en las plantas *glg2* HS:G1. De esta manera podemos considerar que estos genes podrían ser las dianas primarias de la actividad de la GAPCp1. Con estos requisitos se han identificado 24 genes en la parte aérea y 3 genes en las raíces cuya expresión estaba desregulada en los mutantes y que se revirtió tras la inducción de la GAPCp1 (Tabla 4.20). Hemos considerado que 2 de estos genes, *LOG7* y At5g17330 (*GAD*, glutamato descarboxilasa) tenían un particular interés como dianas metabólicas y de desarrollo de la actividad de la GAPCp1. La expresión de *LOG7*, uno de los dos genes más comúnmente desregulado en el análisis transcriptómico de las plantas *glg2* estaba inducida en las partes aéreas y en las raíces y reprimida en ambos

órganos tras la inducción de la GAPCp1. De manera similar, *GAD* estaba inducido en los mutantes y reprimido tras la inducción de la actividad de la GAPCp1; la enzima que codifica es un nexo metabólico entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno, catalizando irreversiblemente la descarboxilación del glutamato para formar GABA.

**Tabla 4.20.** Genes reprimidos en los mutantes *glg2* (WT vs *glg2*) y cuya expresión se revierte tras la inducción de la GAPCp1 en las plantas *glg2* HS:G1.

Gen	Valores de la transcriptómica		Descripción del gen
	WT vs <i>glg2</i>	<i>glg2</i> HS:G1 vs <i>glg2</i>	
<b>Parte aérea</b>			
At1g14880	- 2,6	- 1,7	PCR1; Interviene en la resistencia de las plantas a cadmio
At1g23840	- 1,4	- 1,3	Sin descripción
At1g53480	- 2,0	- 1,6	MRD1; Reprimido en mutantes que sobreacumulan metionina soluble
At1g67100	- 1,9	- 0,9	LBD40; Contiene un dominio que define las fronteras de los órganos laterales
At3g23150	- 0,8	- 1,0	Implicado en la percepción del etileno
At3g23440	- 1,3	- 0,7	EDA6; Arresto del desarrollo del saco embrionario
At3g30720	- 0,6	- 1,0	QQS; Componente de la red metabólica del almidón
At4g13345	- 0,9	- 2,3	MEE5; Implicado en el desarrollo del embrión
At4g22280	- 0,8	- 0,9	Sin descripción
At5g13270	- 0,6	- 0,8	RARE1; Implicado en la traducción
At5g41620	- 0,6	- 1,9	Sin descripción
At5g67520	- 1,5	- 0,7	APK4; Proporciona sulfato activado para la sulfatación de metabolitos secundarios, incluyendo los glucosinolatos.
At1g59930	2,1	1,1	Sin descripción
At1g80090	2,5	1,4	CBS; codifica una proteína cistationina beta-sintasa
At1g80340	1,0	0,9	Codifica una proteína con actividad giberelina 3 $\beta$ - hidroxilasa
At2g01890	1,0	1,1	PAP; Codifica una fosfatasa ácida púrpura
At2g29680	1,4	0,7	CDC6; codifica la proteína de control de la división celular 6
At3g11580	2,5	0,6	Implicado en la transcripción
At3g59700	1,7	0,7	Sin descripción
At4g01985	0,6	0,9	Sin descripción
At4g37150	1,2	1,1	Codifica una proteína con actividad carboxilesterasa
At5g06300	3,0	1,3	Codifica para una presunta proteína de la familia lisina descarboxilasa
At5g17330	0,7	0,8	Codifica para una de las dos isoformas de la glutamato descarboxilasa
At5g52570	1,3	0,9	Convierte el $\beta$ - caroteno en zeaxantina
<b>Raíces</b>			
At1g78070	- 1,2	- 0,7	Sin descripción
At5g03090	- 4,5	- 1,8	Sin descripción
At5g06300	1,4	2,5	Codifica para una presunta proteína de la familia lisina descarboxilasa



## **5. DISCUSIÓN**

---



## 5.1. FUNCIONES DE LAS GAPDHs FOSFORILATIVAS EN EL METABOLISMO Y DESARROLLO DE LA PLANTA

El conocimiento sobre la función de la glicólisis en el metabolismo y desarrollo vegetal es escaso, sobre todo en lo relativo al papel específico de ésta en células fotosintéticas y heterótrofas. En este trabajo, hemos centrado nuestra atención en el estudio de una enzima central de la glicólisis, la GAPDH, con el objetivo de obtener información relevante sobre la función de las isoformas de la GAPDH y más especialmente de las isoformas plastidiales en los órganos fotosintéticos y no fotosintéticos. En plantas silvestres los análisis de la abundancia de las isoformas de la GAPDH indicaron que todas las isoformas glicolíticas (GAPCs y GAPCps) son claramente más abundantes en las raíces, lo cual iría a favor de una mayor relevancia de la glicólisis en los tejidos heterótrofos como cabría esperar, y en concreto de las GAPDHs glicolíticas, ya que estos tejidos dependen exclusivamente de la glicólisis para su suministro energético (Selinski y Scheibe, 2014).

Una de las hipótesis de partida, especialmente en los tejidos fotosintéticos, era si la actividad glicolítica durante la oscuridad sería mayor que durante el periodo luminoso. Sin embargo los resultados mostraron que esto no ocurría, ya que las isoformas glicolíticas de la GAPDH tenían niveles similares de proteína durante los dos periodos, tanto en los tejidos fotosintéticos como en los tejidos heterótrofos. Dado que Scheibe y colaboradores (2002) indicaron que existía una mayor actividad de la GAPDH durante la oscuridad, tenemos que asumir que debería de existir algún tipo de regulación post-traducciona de las enzimas.

Las isoformas fotosintéticas de la GAPDH están reguladas a nivel transcripcional por la luz (Meyer-Gauen y col., 1994). Por ese motivo nos sorprendió ver que GAPA y GAPB tenían en las partes aéreas niveles similares tanto en oscuridad como durante el periodo luminoso. Este resultado nos hizo postular que las isoformas fotosintéticas podrían participar en la glicólisis durante el periodo oscuro, o que podrían estar sujetas a modificaciones post-traduccionales

para regular su actividad. En condiciones oxidantes estas isoformas fotosintéticas están presentes como un hexadecámero inactivo, pero cuando se incuban en presencia de un agente reductor y de 1,3-bisPGA se disocian para dar un heterotetrámero activo (Selinski y Scheibe, 2014). Esto podría explicar su similar abundancia, ya que durante la noche, GAPA y GAPB podrían estar presentes como un hexadecámero no funcional para estar disponibles de inmediato a la llegada del día.

El estudio de la abundancia de las diferentes GAPDHs en el mutante doble *glg2* indicó que la ausencia de actividad de la GAPCp no se compensaba con un incremento del contenido proteico las otras isoformas, especialmente de las isoformas glicolíticas citosólicas. Estos resultados sugieren de nuevo que si existiera una coordinación entre las actividades de la GAPDH entre el citosol y los plastos, ésta se realizaría a nivel post-traducciona.

En su conjunto, nuestros resultados apoyan la idea de que el mecanismo primario de regulación de las GAPDHs citosólicas sería las modificaciones post-traduccionales de sus actividades. En este aspecto, varios autores demostraron diferentes modificaciones post-traduccionales de la GAPC, como la sulfonación, nitrosilación y glutationilación, que podrían regular la actividad de esta enzima y también su participación en la transducción señales (Mohr y col., 1996; Holtgreffe y col., 2008; Zaffagnini y col., 2013).

En lo que se refiere a la implicación de las GAPDHs glicolíticas en el metabolismo y desarrollo vegetal, los mutantes dobles de la GAPCp muestran alteraciones más pronunciadas que los mutantes dobles de la GAPC. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con las múltiples funciones de la GAPCp en el metabolismo de la planta y no solamente con su propio papel en la glicólisis. De hecho, los efectos de la ausencia de actividad GAPCp sobre el perfil metabólico fueron menos pronunciados cuando las plantas se cultivaron en presencia de serina (Muñoz-Bertomeu y col., 2009), la cual rescataba casi por completo el crecimiento

de la raíz primaria. Esto indicaría que la GAPCp sería más importante para proporcionar los precursores de la RFBS que para la glicólisis en sí.

Tres mutantes dobles diferentes de la GAPC presentaron un fenotipo de retraso en el desarrollo de la parte aérea en relación con las plantas silvestres, a pesar de tener un perfil metabólico parecido a éstas. Los estudios fisiológicos y metabolómicos presentados en esta tesis doctoral indican que la glicólisis citosólica, o al menos la reacción central de la GAPC, tiene poca relevancia para el desarrollo y el metabolismo de la parte aérea en presencia de luz, confirmando así trabajos previos (Hajirezaei y col., 2006; Guo y col., 2012). En este sentido, la GAPDH no fosforilativa dependiente de NADP presente en el citosol podría estar desempeñando/complementando el papel metabólico de las GAPCs mientras que éstas podrían tener un papel más importante en la señalización como se ha indicado por algunos autores (Guo y col., 2012; Zaffagnini y col., 2013). No obstante no podemos descartar que la función de la GAPC en oscuridad o en células heterótrofas sea más relevante, puesto que su abundancia en raíces es mayor. Así, la inhibición del crecimiento de la parte aérea en los mutantes dobles de la GAPC podría ser una consecuencia de la inhibición del crecimiento de la raíz en vez de un efecto específico de la actividad de la GAPC en este órgano.

En cualquier caso, la caracterización morfológica y metabolómica de los mutantes dobles de las GAPDHs glicolíticas indicó claramente que las isoformas más importantes en la homeostasis metabólica y en el desarrollo de las plantas son las GAPCps. Esto podría ser debido a la participación de la GAPCp en el suministro de precursores metabólicos y de energía. Finalmente nuestros resultados muestran que los mutantes de las GAPCs y GAPCps no son letales. Es posible que la función de ambas enzimas sea parcialmente complementaria, de tal forma que las plantas puedan ser viables sin una u otra. Otra posibilidad es que las isoformas fotosintéticas puedan participar también en actividades glicolíticas.

## 5.2. LA ACTIVIDAD DE LA GAPCp1 EN CÉLULAS NO-FOTOSINTÉTICAS RESTAURA EL CRECIMIENTO Y EL PERFIL METABÓLICO DE LA PARTE AÉREA

A pesar de que se está debatiendo mucho sobre la función de la glicólisis y en concreto de la GAPCp en los tejidos fotosintéticos, no tenemos conocimiento de una prueba directa que la demuestre. Debido a que las plantas mutantes *g1g2* presentan un fenotipo drástico de reducción del crecimiento de la parte aérea, investigamos el efecto específico de la GAPCp1 en las células fotosintéticas expresando la enzima bajo el control del *ProRBCS*. Los estudios morfológicos y metabólicos indicaron que la expresión del gen *GAPCp1* en la parte aérea no complementaba el fenotipo de reducción del crecimiento de la raíz, ni tampoco el de la parte aérea. El perfil metabólico de la parte aérea en las plantas *g1g2* y *g1g2 RBCS:G1* era muy similar tanto en condiciones fotosintéticas como en no fotosintéticas. Estos resultados indican que la glicólisis plastidial, o al menos la actividad de la GAPCp, no es funcionalmente significativa en las células fotosintéticas como lo podría ser en las raíces o en las anteras.

La expresión del gen *GAPCp* bajo el control del promotor constitutivo 35S restauró el fenotipo de crecimiento y el perfil metabólico de las plantas *g1g2*, sugiriendo que las alteraciones metabólicas en la parte aérea podrían estar causadas por la ausencia de actividad en las raíces o en otros tipos celulares en la parte aérea.

En este sentido, la sobreexpresión de la GAPCp bajo el control del promotor PHT de raíz en las plantas mutantes transformadas *g1g2* PHT:G1 mejoró el crecimiento de la parte aérea de estas plantas y modificó su perfil metabólico, indicando que la expresión de la GAPCp en células de la raíz es más importante para el metabolismo y desarrollo de ésta que en las células fotosintéticas.

Este efecto no puede atribuirse a un incremento de la nutrición mineral como consecuencia de un restablecimiento del crecimiento radicular, dado que las plantas *g1g2* PHT:G1 no presentan diferencias significativas con respecto a las plantas *g1g2* en su contenido en nutrientes minerales. Los resultados obtenidos mostraron

que el promotor *PHT1.2* utilizado en este trabajo no es tan específico de raíces como había sido descrito por Mudge y colaboradores (2002) y Nussaume y colaboradores (2011), ya que se encontró expresión de la *GAPCp1* bajo el control de este promotor en la parte aérea, aunque ésta fue baja. Esta expresión de *PHT:G1* en la parte aérea podría estar relacionada con el fenotipo de deficiencia en fosfato en las plantas *g1g2* dado se ha demostrado que este promotor se induce en ausencia de fosfato (Mudge y col., 2002) aunque no en la parte aérea como hemos visto en este trabajo. Teniendo en cuenta que la expresión de la *GAPCp1* en las células fotosintéticas no complementó el fenotipo de la parte aérea de las plantas *g1g2*, hemos postulado que *ProPHT* podría dirigir la expresión del gen *GAPCp1* en células heterótrofas de la parte aérea, como podrían ser por ejemplo las células epidérmicas o vasculares. Esta expresión, aunque baja, podría ayudar a complementar el fenotipo de los mutantes. Por lo tanto, la mejora del metabolismo y desarrollo en las plantas *g1g2 PHT:G1* podría ser una consecuencia de la expresión de la *GAPCp* en las raíces y en células heterótrofas de la parte aérea. Esto explicaría por qué algunos metabolitos respondiendo de manera directa a la actividad de la *GAPCp* están alterados tanto en parte aérea como en raíces en *g1g2* y por qué estos metabolitos alcanzaron niveles similares a las plantas silvestres en la parte aérea de *g1g2 PHT:G1*.

La complementación parcial del fenotipo de los dobles mutantes en las plantas *g1g2 PHT:G1* podría ser debida a la ausencia de la *GAPCp* en tipos celulares específicos de las raíces. Los experimentos de microscopía confocal realizados indicaron que, bajo el control del promotor *PHT*, la *GAPCp* se expresa en células diferenciadas pero no en las células meristemáticas y de la caliptra donde la *GAPCp* y las enzimas de la RFBS se expresan normalmente (este trabajo; Cascales-Miñana y col., 2013; Toujani y col., 2013). Se ha postulado que la RFBS proporciona la serina a tipos celulares específicos como son el tapete de la antera o las células meristemáticas (Ros y col., 2014). Por tanto, en las plantas *g1g2 PHT:G1* la falta de expresión del gen *GAPCp1* en células meristemáticas y de la

caliptra de las raíces provocaría un déficit en el suministro de serina a estas células e impediría la recuperación del crecimiento de la raíz primaria. Los resultados mostrados en esta tesis doctoral y también por Muñoz-Bertomeu y colaboradores (2009) sobre la recuperación del crecimiento de la raíz en las plantas *glg2* cuando se cultivan en presencia de serina apoyarían esta idea.

Otro aspecto interesante que falta conocer sería por qué el crecimiento de la parte aérea está inhibido en las plantas *glg2*, dado que este órgano no es deficiente en serina (esta tesis; Muñoz-Bertomeu y col., 2009). Una explicación podría ser que la reducción del crecimiento de la parte aérea sea una consecuencia de una deficiencia mineral, en concreto del fosfato, que tendría su origen en la inhibición del crecimiento de la raíz en las plantas mutantes dobles. En este sentido, se detectaron deficiencias en fosfato orgánico y mineral en la parte aérea de plantas *glg2*. Sin embargo, un aumento del suministro de nutrientes minerales no se tradujo en un aumento significativo del crecimiento de la parte aérea y de las raíces de las plantas *glg2* o de las plantas *glg2* RBCS:G1. Además, la expresión de la GAPCp en las plantas *glg2* PHT:G1 donde esta enzima se expresa en raíces no resultó en un aumento del contenido en fosfato (orgánico o mineral) pero mejoró de forma significativa el crecimiento de la parte aérea. Por lo tanto, es probable que una deficiencia en fosfato no sea la causa primaria, o al menos no la única, de la inhibición del crecimiento de la parte aérea en las plantas *glg2*, pero esta deficiencia podría exacerbar las alteraciones fenotípicas observadas en el mutante.

### **5.3. LA AUSENCIA DE ACTIVIDAD DE LA GAPC AFECTA AL METABOLISMO DEL CARBONO, DEL NITRÓGENO Y A LA NUTRICIÓN MINERAL**

Para conocer cuáles eran los metabolitos y genes que podrían estar alterados en la parte aérea y raíces de las plantas *glg2* hemos realizado unos análisis transcriptómicos y metabolómicos.

En la parte aérea de las plantas *glg2*, los genes reprimidos estaban implicados en rutas del metabolismo secundario como por ejemplo genes



implicados en la biosíntesis de auxinas (*YUCCA6*) que podría ser responsable de las alteraciones del desarrollo de estos mutantes. Varios genes implicados en el metabolismo de los glucosinolatos (*CYP79F1*, *BCAT4* y *APK4*) estaban también reprimidos y algunos de ellos (*At5g67520*) recuperaron niveles de las plantas silvestres tras la activación de la *GAPCp1* en los mutantes dobles *g1g2* condicionales. Tanto las auxinas como los glucosinolatos están sintetizados a partir de un precursor común que es el indol-3-acetaldoxima. Se ha encontrado que líneas que tienen silenciada la RFBS son deficientes en glucosinolatos y auxinas (Benstein y col., 2013), lo que relaciona de nuevo la RFBS con la actividad de la *GAPCp*.

Varios genes que codifican proteínas implicadas en el transporte del fosfato y la señalización están inducidos en la parte aérea de los mutantes *g1g2*. Estos resultados concuerdan con las deficiencias en fosfato observadas en la parte aérea de las plantas *g1g2* y que podrían limitar su crecimiento. Así, varios genes que codifican a transportadores de fosfato (*PHT1.2* y *PHT1.4*), y también enzimas que proporcionan fosfato en condiciones de deficiencia de este mineral como las PAPs o las fosfatasa específicas de pirofosfato (PPsPasa) están inducidos en las plantas *g1g2*. Las PAPs son ATPasas no específicas que hidrolizan el Pi a partir de un amplio rango de monoésteres para proporcionar Pi (Plaxton y col., 2011). Otro gen relacionado con el fosfato es *UBC24* que funciona en condiciones de suficiencia de fosfato para promover la degradación de proteínas inducidas por la deficiencia en fosfato, incluyendo los transportadores de alta afinidad de Pi de la membrana plasmática (Plaxton y col., 2011). Como era de esperar, este gen estaba reprimido en la parte aérea de las plantas *g1g2*.

El gen que codifica la proteína PPsPasa1 atrajo de forma muy especial nuestra atención, ya que era un gen comúnmente inducido en todos los experimentos de transcriptómica de las plantas *g1g2*. *PPsPasa1* codifica una fosfatasa específica de pirofosfato que cataliza la escisión específica de pirofosfato. Se ha sugerido que este gen juega un papel importante en la respuesta a la

deficiencia en fosfato proporcionando Pi a partir de sustratos fosforilados (May y col., 2011).

Dado que Pi es una molécula muy importante en la señalización del tallo a la raíz podría tener un papel específico en la comunicación entre estos dos órganos en las plantas *glg2*. Sin embargo, el patrón de expresión de 8 de los 9 genes relacionados con el fosfato, incluso *PPsPasal*, que estaban desregulados en las plantas *glg2*, no se modificó tras la activación de la GAPCp en los mutantes condicionales, lo que indicaría que no son genes primarios de respuesta a la actividad de la GAPCp. Esto sugeriría que la falta de actividad de la GAPCp inhibe el crecimiento de la raíz primaria siendo esta la causa y no la consecuencia de la deficiencia de Pi en los mutantes *glg2*. Como mencionamos anteriormente, la deficiencia de fosfato podría afectar el crecimiento de la parte aérea pero ésta no sería la única causa de su inhibición.

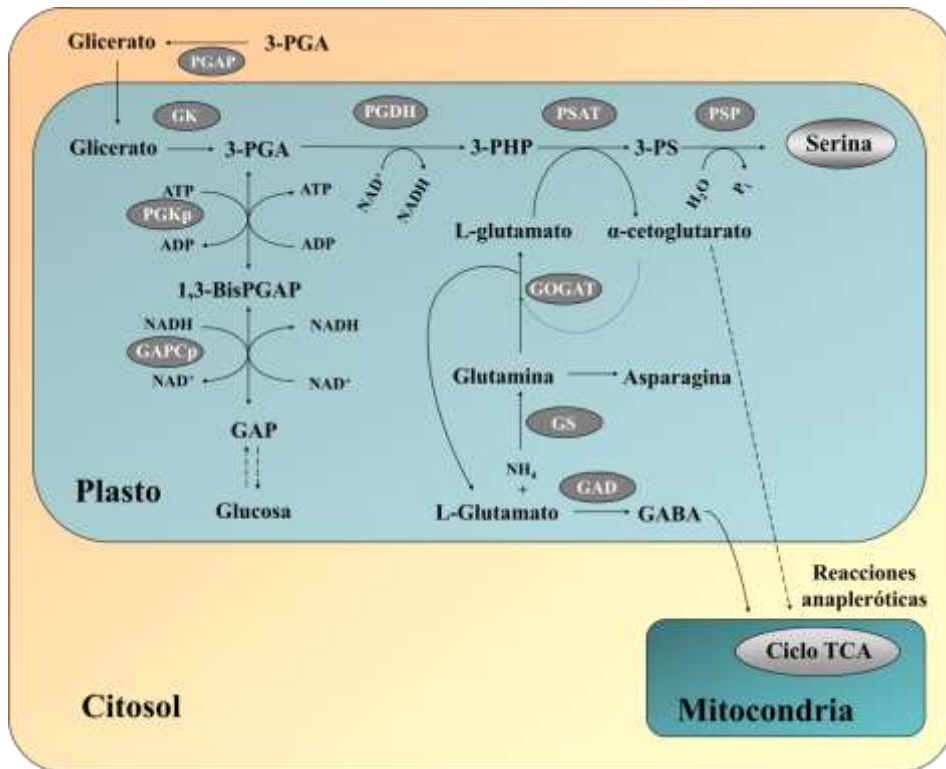
En las raíces, las categorías funcionales desreguladas incluyeron el metabolismo del nitrógeno y del sulfato, y el transporte de aminoácidos y de iones, como por ejemplo CAX3, que es un transportador vacuolar de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  requerido para la homeostasis sistémica del fosfato implicado en la señalización desde el tallo a la raíz en *Arabidopsis* (Liu y col., 2001). A diferencia de la parte aérea, en las raíces de plantas *glg2* se indujeron genes implicados en la respuesta al estrés, pero en ambos órganos aumentaron marcadores metabólicos relacionados con el estrés (rafinosa y galactinol). El análisis metabólico también indicó que el metabolismo del carbono estaba seriamente afectado en los mutantes *glg2*, incluyendo los intermediarios del ciclo TCA y el metabolismo de los aminoácidos. Estos resultados indican que la posición estratégica de la GAPCp podría ser utilizada como un vínculo de conexión entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno, que finalmente podría afectar al desarrollo de la planta.

#### 5.4. DIANAS PRIMARIAS DE LA ACTIVIDAD DE LA GAPCp1

Los resultados mostraron que cuatro metabolitos (glutamina, glicerato, galactinol y mio-inositol) cambiaron de forma sistemática en las raíces y partes aéreas de los mutantes *g1g2*, y tras la inducción de la GAPCp1 tendieron a recuperar los niveles de las plantas silvestres. Por lo tanto postulamos que la glutamina y el glicerato son los metabolitos que responden de forma primaria a la actividad de la GAPCp y participan en el restablecimiento de la homeostasis metabólica, mientras que el galactinol y el mio-inositol son indicadores del estrés generado por la ausencia de la actividad de la GAPCp y que podrían participar en la respuesta al estrés oxidativo.

El galactinol y el mio-inositol aumentaron en las plantas *g1g2* y se redujeron tras la inducción de la GAPCp en los mutantes condicionales. La rafinosa también fue más abundante en las plantas *g1g2* en comparación con las plantas silvestres en la mayoría de las condiciones experimentales. Estos metabolitos participan como sustrato (galactinol), producto derivado (mio-inositol), o producto final (rafinosa) de la biosíntesis de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Peterbauer y Richter, 2001). En línea con estos resultados, la expresión del gen que codifica la galactinol sintasa, clave en la síntesis de oligosacáridos de la familia de la rafinosa, estaba reducida tras la inducción de la GAPCp1. Se ha demostrado que estos oligosacáridos juegan un papel en la respuesta de la planta a estreses medioambientales (Taji y col., 2002; Panikulangara, 2004; Kaplan, 2007; Peters, 2007). Así se ha postulado que el galactinol y la rafinosa podrían aumentar la tolerancia de las plantas a estreses causados por el frío, la salinidad o a la sequía protegiéndolas contra los daños oxidativos (Nishizawa y col., 2008; Elsayed y col., 2013). El alto nivel de estos metabolitos en las plantas *g1g2* es probablemente un indicador del estrés oxidativo en estos mutantes. Por lo tanto la GAPCp podría estar implicada en la protección de la planta contra el estrés oxidativo, una función no metabólica que ya ha sido sugerida para las GAPCs citosólicas en plantas (Baek y col., 2007; Guo y col., 2012).

Como ya se ha indicado, se ha postulado que una de las principales funciones de la GAPCp era la de proporcionar el precursor 3-PGA para la RFBS (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). El glicerato se acumuló en las plantas *g1g2*, especialmente en raíces, donde sus niveles fueron claramente reducidos tras la activación de la GAPCp en los mutantes condicionales. El glicerato se puede convertir en 3-PGA en una reacción catalizada por la glicerato quinasa como parte de las reacciones fotorrespiratorias en los plastos (Figura 5.1). Kleczkowski y Randall (1986) propusieron que la glicerato quinasa además de su papel en la fotorrespiración en las hojas, podría servir en las especies C4 como parte del sistema de difusión facilitada para el transporte intracelular del 3-PGA. Hemos propuesto que la acumulación del glicerato en las raíces es parte de la respuesta de la planta para mantener el 3-PGA en los plastos. En concreto el 3-PGA producido en el citosol por la glicólisis podría convertirse en glicerato por la 3-PGA fosfatasa y luego transportarse a los plastos donde la glicerato quinasa convertiría de nuevo el glicerato en 3-PGA (Figura 5.1). A pesar de que se ha identificado un transportador de glicerato en los cloroplastos de *Arabidopsis* (Pick y col., 2013), tanto éste como el transportador de las triosas-fosfato que podría intercambiar directamente el 3-PGA entre el citosol y el plasto se expresan poco o no lo hacen en las raíces (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Proponemos que el glicerato acumulado en el citosol de las células de raíz de plantas *g1g2* podría ser transportado al lumen de los plastos por difusión de una forma ineficiente pero suficientemente para permitir la supervivencia de estas plantas. La actividad de la enzima glicerato quinasa en plastos de las raíces podría también ser un factor limitante en la conversión del glicerato en 3-PGA.



**Figura 5.1.** Modelo que describe la función de la GAPCp en el metabolismo basándose en los estudios transcriptómicos y metabolómicos. Abreviaturas: 1,3-bisPGAP, 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 3-PHP, 3-fosfohidroxipiruvato; 3-PS, 3-fosfoserina; Ciclo TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; GABA, ácido gamma aminobutírico; GAD, glutamato descarboxilasa; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; GAPCp, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial; GK, glicerato quinasa; GOGAT, glutamato sintetasa; GS, glutamina sintasa; PGAP, 3-PGA fosfatasa; PGDH, fosfoglicerato deshidrogenasa; PGKp, fosfoglicerato quinasa plastidial; PSAT, fosfoserina aminotransferasa; PSP, fosfoserina fosfatasa.

El segundo metabolito clave que responde a la actividad de la GAPCp es la glutamina, que en los mutantes condicionales alcanzó los niveles de las plantas silvestres tanto en parte aérea como en raíz tras la inducción de la enzima. La conexión entre la GAPCp y la RFBS podría dar ideas sobre el posible mecanismo implicado en esta alteración metabólica. Además de sintetizar serina, la RFBS proporciona  $\alpha$ -cetoglutarato en una reacción catalizada por la segunda enzima de la ruta, la fosfoserina aminotransferasa (PSAT), que usa el L-glutamato como precursor (Figura 5.1). Si la actividad de la PSAT está limitada, el L-glutamato podría no ser metabolizado por la PSAT y podría ser convertido en glutamina a través de la reacción de la glutamina sintasa (GS). Adicionalmente, la glutamina también podría acumularse por la inhibición de la reacción de la glutamato sintetasa (GOGAT) dado que el  $\alpha$ -cetoglutarato, sustrato de la enzima, no sería reciclado por la PSAT. Por tanto los niveles altos en glutamina encontrados en raíces y partes aéreas de las plantas mutantes *g1g2* podrían ser una consecuencia de la parada de la actividad de la RFBS que afecta la ruta GS/GOGAT. El hecho de que el principal cambio tras la reanudación de la actividad de la GAPCp sea una reducción de los niveles en glutamina en parte aéreas y en raíces apoyaría esta idea.

Como hemos indicado anteriormente, los niveles de glutamina no estaban reducidos en la parte aérea de plantas mutantes *g1g2* suplementadas con serina, dado que la RFBS estaría todavía inactiva, lo que apoyaría que los niveles elevados en glutamina en los mutantes provienen de la reducción de la actividad de la PSAT. La glutamina, junto con la asparagina son las mayores formas de transporte de nitrógeno orgánico entre la parte aérea y las raíces. De hecho, la glutamina es el aminoácido más abundante en la savia del xilema y del floema (Zhang y col., 2010). Por lo tanto, una parte de la glutamina presente en la parte aérea podría provenir de las raíces. La glutamina podría ser un buen candidato comunicando la raíz a la parte aérea para inducir los ajustes metabólicos necesarios en las plantas *g1g2*.

Possemato y colaboradores (2011) encontraron que la RFBS podría tener un papel importante en la anaplerosis del carbono derivado de la glutamina en el ciclo TCA en células de mamíferos. Las células en proliferación utilizan intermediarios del ciclo TCA, como el  $\alpha$ -cetoglutarato, como precursores biosintéticos, e inducen las reacciones anapleróticas que llevan el carbono derivado de la glutamina hacia el ciclo TCA, contrarrestando el eflujo biosintético. Por lo tanto, si la RFBS está bloqueada los intermediarios del ciclo TCA estarían drásticamente reducidos y la proliferación celular se pararía. En este aspecto estos autores también encontraron que la supresión de la RFBS inhibe la proliferación celular incluso en presencia de serina exógena, lo que corroboraría el papel importante de esta ruta en el suministro de intermediarios del ciclo TCA.

A pesar de que la suplementación con serina restauró el crecimiento de la parte aérea en las plantas *glg2*, esta suplementación no restableció por completo su perfil metabólico y tampoco el crecimiento de la raíz primaria. Además, la serina no fue capaz de complementar el fenotipo de esterilidad masculina (Muñoz-Bertomeu y col., 2009), sugiriendo que al menos en las células heterótrofas, la función de la RFBS en el control del crecimiento y del desarrollo podría implicar el suministro de serina y de  $\alpha$ -cetoglutarato. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que aunque estén implicados los mismos componentes, existen diferencias muy importantes entre las redes primarias metabólicas fotosintéticas y heterótrofas. Un buen candidato para mantener el flujo anaplerótico en la parte aérea sería la reacción de la fotorrespiración catalizada por la glioxilato aminotransferasa, que podría convertir el glioxilato en glicina utilizando la serina (u otro aminoácido donante) como co-sustrato y obtener el  $\alpha$ -cetoglutarato como producto derivado.

En lo que se refiere a los genes diana de la actividad de la GAPCp, muchas categorías funcionales estaban significativamente afectadas al inducir esta enzima, lo que demuestra su importancia y cómo puede afectar la regulación transcripcional. Muchos genes de señalización de hormonas (citoquinina, giberelina, etileno y jasmonato) respondieron a la activación de la enzima, lo que

sugiere que participan en la recuperación del desarrollo de la planta. Uno de ellos, *LOG7* (codifica una lisina descarboxilasa) está inducido tanto en la parte aérea como en raíces de los mutantes *glg2*, y tras la inducción de la GAPCp su expresión fue reprimida. Se ha descrito que *LOG7* tiene una función reguladora en el meristemo apical del tallo y podría jugar un papel importante en el control del desarrollo de la planta a través de la ruta de activación de las citoquininas (Tokunaga y col., 2012). Además, estos autores indican que los mutantes de inserción de T-DNA, en los cuales la ruta dependiente de *LOG7* está alterada, presentan un retraso severo del crecimiento del tallo y de la raíz (Tokunaga y col., 2012). Nuestros resultados muestran que *LOG7* no estaba reprimido, sino inducido en el mutante *glg2*, lo que sugeriría que la inducción de *LOG7* sería una consecuencia del crecimiento reducido en vez de ser la causa.

Otro buen candidato que podría ser una diana primaria de la actividad de la GAPCp es el gen que codifica a GAD, que participa en el metabolismo del glutamato catalizando la descarboxilación irreversible de este aminoácido para formar GABA (Fait y col., 2011). Los niveles elevados de GABA medidos en las raíces de las plantas *glg2* y más especialmente en la parte aérea podrían ser debidos a la expresión elevada de la GAD en el mutante doble. La GAD podría metabolizar los excesos de glutamina presente en la parte aérea y producida *in situ* por las células heterótrofas o que han sido transportados desde la raíz. Por otra parte el metabolismo de GABA produce el semialdehído succínico que es convertido en succinato por la SSADH (semialdehído succínico deshidrogenasa). Este mecanismo podría contribuir al eflujo anaplerótico del carbono derivado de la glutamina dentro del ciclo TCA cuando está bloqueada la RFBS.

Proponemos que el incremento de actividad de la GAD podría ser parte, junto con el complejo GS/GOGAT, de un ajuste metabólico en los mutantes *glg2* que permite restaurar la homeostasis metabólica. Fait y colaboradores (2011) propusieron que la conversión de glutamato a GABA mediada por la GAD juega un papel importante en el equilibrio entre el metabolismo del carbono y del



nitrógeno. Estos mismos autores indican que la sobreexpresión de la GAD durante la maduración de las semillas aumenta la relación N/C. Dado que las raíces de los mutantes dobles *g1g2* tienen una relación elevada de N/C (Muñoz-Bertomeu y col., 2009), GAD podría ser una diana primaria de la actividad de la GAPCp, conectando el metabolismo del carbono (glicólisis) y el metabolismo del nitrógeno (biosíntesis de serina). Dado que la expresión de GAD está reprimida tras la activación de la GAPCp1 y los niveles de glutamina se reducen, postulamos que esta última sería la molécula que conecta el metabolismo con la respuesta transcripcional.

Para manipular el metabolismo de la planta es necesario entender de forma precisa las redes metabólicas de las plantas y su forma de interconexión. Nuestros resultados abren nuevas direcciones para la investigación sobre los mecanismos moleculares que conectan las redes metabólicas en plantas. Proponemos que la ausencia de actividad de la GAPCp1 reduce el eflujo de la RFBS que proporciona serina a las células heterótrofas y también proporciona el  $\alpha$ -cetoglutarato requerido por la ruta GS/GOGAT y/para las reacciones anapleróticas en algunos tipos celulares. La inhibición de la ruta GS/GOGAT incrementaría la glutamina y desviaría el glutamato hacia la biosíntesis de GABA. Este metabolito podría jugar un papel en el equilibrio entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno en las plantas *g1g2* contribuyendo al eflujo anaplerótico del carbono derivado de la glutamina en el ciclo TCA cuando la RFBS no es funcional. Estudios posteriores serán necesarios para entender de forma general como las redes transcriptómicas / metabólicas están conectadas e interactúan a través de la GAPCp para regular el metabolismo y desarrollo de las plantas.



## **6. CONCLUSIONES**

---



- 1) La función metabólica de la GAPC no parece importante al menos en parte aérea. Habrá que reevaluar por tanto el papel de la glicólisis citosólica en órganos fotosintéticos y en el caso de la GAPDH, si su función metabólica puede ser complementada por otras enzimas como la GAPDH no fosforilativa.
- 2) La GAPCp no parece tener un papel directo en las células fotosintéticas de la parte aérea, pero sí que lo podría tener en células heterotróficas de órganos fotosintéticos donde esta ruta puede proporcionar precursores de metabolitos esenciales. Las células fotosintéticas podrían recibir estos metabolitos esenciales directamente de la fotosíntesis.
- 3) La función de la GAPCp es indispensable en la raíz, y su ausencia en este órgano podría afectar directa y/o indirectamente a la parte aérea. El fenotipo de la parte aérea en el mutante *glg2* podría ser en parte consecuencia de un déficit de nutrientes minerales por el escaso desarrollo de la raíz. Sin embargo, la expresión específica de la GAPCp en la raíz tiene un efecto directo sobre el crecimiento de la parte aérea independientemente del estrés nutricional provocado por la inhibición del crecimiento de la raíz primaria. No obstante, habría que considerar un posible efecto de actividad de la GAPCp en células no fotosintéticas de la parte aérea que explicaría que algunos de los metabolitos clave relacionados con la actividad de ésta también estén modificados en la parte aérea del mutante *glg2*.
- 4) Nuestros experimentos muestran que la GAPCp tiene un patrón de expresión muy específico en la caliptra y en el meristemo de la raíz primaria que podría ser responsable de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en los mutantes *glg2* al no suministrárseles el sustrato para la biosíntesis de serina.
- 5) La ausencia de GAPCp afecta al metabolismo del nitrógeno y del carbono. El estudio metabolómico y transcriptómico indica que la GAPCp

interacciona con varias rutas metabólicas esenciales entre las que estarían la RFBS, la ruta de asimilación del amonio y el metabolismo del GABA, lo que interfiere con el desarrollo de la planta. Por tanto la GAPCp parece ser un conector metabólico clave de rutas esenciales del metabolismo primario.

- 6) El glicerato y la glutamina pueden ser las dianas metabólicas más importantes de la GAPCp. Por una parte, el déficit de 3-PGA en el plasto tendería a compensarse mediante la biosíntesis de glicerato a partir de 3-PGA en el citosol en una reacción catalizada por la PGAP, que posteriormente sería transportado al plasto para ser de nuevo convertido en 3-PGA mediante la reacción catalizada por la GK. Por otra parte la glutamina se acumularía como consecuencia de la inhibición de la ruta de asimilación de amonio GS/GOGAT por falta del sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato proporcionado por la PSAT de la RFBS. Estos dos metabolitos, junto con el GABA podrían ser clave en la conexión del metabolismo de N con el C mientras que el galactinol podría estar implicado en la respuesta de la planta al estrés oxidativo asociado a la ausencia de actividad GAPCp.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---





- Alonso-Blanco C, Koornneef M (2000) Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci* 5: 22-29
- Al-Shehbaz IA, O'Kane SL, Jr (2002) Taxonomy and phylogeny of Arabidopsis (brassicaceae). *Arabidopsis Book* 1: e0001
- Andre C, Froehlich JE, Moll MR, Benning C (2007) A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 2006-2022
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408: 796-815
- Backhausen JE, Vetter S, Baalmann E, Kitzmann C, Scheibe R (1998) NAD-dependent malate dehydrogenase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoenzymes play an important role in dark metabolism of various plastid types. *Planta* 205: 359-366
- Baek D, Jin Y, Jeong JC, Lee HJ, Moon H, Lee J, Shin D, Kang CH, Kim DH, Nam J, Lee SY, Yun DJ (2008) Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Phytochemistry* 69: 333-338
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Hernandez-Coronado M, Pantoja O (2009) Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. *Plant Cell* 21: 4044-4058
- Baud S, Wuilleme S, Dubreucq B, de Almeida A, Vuagnat C, Lepiniec L, Miquel M, Rochat C (2007) Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 52: 405-419
- Baud S, Wuilleme S, To A, Rochat C, Lepiniec L (2009) Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant J* 60: 933-947
- Benstein RM, Ludewig K, Wulfert S, Wittek S, Gigolashvili T, Frerigmann H, Gierth M, Flugge UI, Krueger S (2013) Arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *Plant Cell* 25: 5011-5029
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* 62: 293-300
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
- Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 487-497

- Borevitz JO, Ecker JR (2004) Plant genomics: the third wave. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 443-477
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GLA, D'Amore R, Allen AM, McKenzie N, Kramer M, Kerhornou A, Bolser D, Kay S, Waite D, Trick M, Bancroft I, Gu Y, Huo N, Luo M, Sehgal S, Gill B, Kianian S, Anderson O, Kersey P, Dvorak J, McCombie WR, Hall A, Mayer KFX, Edwards KJ, Bevan MW, Hall N (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491: 705-710
- Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, Krause KP, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schuch W, Sonnewald U, Tomsett AB (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat Biotechnol* 16: 177-180
- Cascales-Miñana FdB (2012) Implicación de la Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa y de la 3-Fosfoserina Fosfatasa en el metabolismo y desarrollo de *Arabidopsis*. 1-244 Tesis doctoral, Universitat de València, España
- 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
- Cerff R, Chambers SE (1979) Subunit structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (EC 1.2.1.12 and EC 1.2.1.13). *J Biol Chem* 254: 6094-6098
- Chen M, Thelen JJ (2010) The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 77-90
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133: 462-469
- Curtis VG (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biological Reviews* 74: 277-309
- 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 Physiol* 139: 5-17
- Dai S (2006) Light/Dark Regulation of Chloroplast Metabolism. In RR Wise, JK Hooper, eds, *The Structure and Function of Plastids*, Ed 23 Vol 23. Springer, The Netherlands, pp 221-236

- Dey PM, Harborne JB (1997) *Plant Biochemistry*. Elsevier Science,
- Edwards D, Batley J (2010) Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnol J* 8: 2-9
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349
- Elsayed AI, Rafudeen MS, Golldack D (2013) Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biol (Stuttg)* 16:1-8
- Fait A, Nesi AN, Angelovici R, Lehmann M, Pham PA, Song L, Haslam RP, Napier JA, Galili G, Fernie AR (2011) Targeted enhancement of glutamate-to-gamma-aminobutyrate conversion in *Arabidopsis* seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. *Plant Physiol* 157: 1026-1042
- FAO (2009) How to Feed the World in 2050. <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)>; (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- Focks N, Benning C (1998) wrinkled1: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 118: 91-101
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Garoosi GA, Salter MG, Caddick MX, Tomsett AB (2005) Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in tomato. *J Exp Bot* 56: 1635-1642
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16: 3304-3325
- Giege P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Millar AH, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 15: 2140-2151
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S,

- Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100
- Gunning B, Koenig F, Govindjee (2006) A Dedication to Pioneers of Research on Chloroplast Structure. In RR Wise, JK Hooper, eds, *The Structure and Function of Plastids*, Ed 23 Vol 23. Springer, The Netherlands, pp xxiii-xl
- Guo L, Devaiah SP, Narasimhan R, Pan X, Zhang Y, Zhang W, Wang X (2012) Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase Ddelta to transduce hydrogen peroxide signals in the Arabidopsis response to stress. *Plant Cell* 24: 2200-2212
- Habenicht A, Hellman U, Cerff R (1994) Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J Mol Biol* 237: 165-171
- Hajirezaei MR, Biemelt S, Peisker M, Lytovchenko A, Fernie AR, Sonnewald U (2006) The influence of cytosolic phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPC) on potato tuber metabolism. *J Exp Bot* 57: 2363-2377
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis M, Hughes J, Neill SJ (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* 43: 828-835
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42: 819-832
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163: 181-187
- Holtgreffe S, Gohlke J, Starmann J, Druce S, Klocke S, Altmann B, Wojtera J, Lindermayr C, Scheibe R (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant* 133: 211-228
- Hooper JK (2006) Chloroplast Development: Whence and Whither. In RR Wise, JK Hooper, eds, , Ed 23 Vol 23. Springer, The Netherlands, pp 27-51

- Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Ed Academic Press, Inc New York, pp 3-12
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- ISAAA (2010) Agricultural Biotechnology (A Lot More than Just GM Crops), [https://www.isaaa.org/resources/publications/agricultural\\_biotechnology/download/Agricultural\\_Biotechnology.pdf](https://www.isaaa.org/resources/publications/agricultural_biotechnology/download/Agricultural_Biotechnology.pdf).
- Janniere L, Canceill D, Suski C, Kanga S, Dalmais B, Lestini R, Monnier AF, Chapuis J, Bolotin A, Titok M, Le Chatelier E, Ehrlich SD (2007) Genetic evidence for a link between glycolysis and DNA replication. *PLoS One* 2: e447
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal* 50: 967-981
- Karp GC (2005) *Biología Celular y Molecular - Conceptos y Experimentos*, Ed 4. Mc Graw Hill, México
- Kim JW, Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 30: 142-150
- Kim JY, Rim Y, Wang J, Jackson D (2005) A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev* 19: 788-793
- Kim JY, Yuan Z, Jackson D (2003) Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* 130: 4351-4362
- Kirchsteiger K, Ferrandez J, Pascual MB, Gonzalez M, Cejudo FJ (2012) NADPH thioredoxin reductase C is localized in plastids of photosynthetic and nonphotosynthetic tissues and is involved in lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1534-1548
- Kleczkowski LA, Randall DD (1986) Thiol-dependent regulation of glycerate metabolism in leaf extracts : the role of glycerate kinase in c(4) plants. *Plant Physiol* 81: 656-662
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of

- Agrobacterium binary vector. *MGG Molecular & General Genetics* 204: 383-396
- Koornneef M, Meinke D (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* 61: 909-921
- Kuzma J, Kokotovich A (2011) Renegotiating GM crop regulation. Targeted genome-modification technology raises new issues for the oversight of genetically modified crops. *EMBO Rep* 12: 883-888
- Lancien M, Lea PJ (2006) Amino Acid Synthesis in Plastids. In RR Wise, JK Hooper, eds, , Ed 23 Vol 23. Springer, The Netherlands, pp 356-385
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 1: 387-396
- Liu TY, Aung K, Tseng CY, Chang TY, Chen YS, Chiou TJ (2011) Vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> transport activity is required for systemic phosphate homeostasis involving shoot-to-root signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 156: 1176-1189
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol* 30: 231-239
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53: 159-162
- Martin C, Butelli E, Petroni K, Tonelli C (2011) How can research on plants contribute to promoting human health? *Plant Cell* 23: 1685-1699
- Martínez Alcántara B (2010) Estudio de la absorción y translocación del nitrógeno en cítricos en función del aporte estacional del abono nitrogenado mediante el uso de la técnica de dilución isotópica. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, España.
- Matsuhara S, Jingu F, Takahashi T, Komeda Y (2000) Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions. *Plant J* 22: 79-86
- May A, Berger S, Hertel T, Kock M (2011) The Arabidopsis thaliana phosphate starvation responsive gene AtPPsPase1 encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1810: 178-185
- McKendree WL, Ferl RJ (1992) Functional elements of the Arabidopsis Adh promoter include the G-box. *Plant Mol Biol* 19: 859-862
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662, 679-82

- Meyer-Gauen G, Schnarrenberger C, Cerff R, Martin W (1994) Molecular characterization of a novel, nuclear-encoded, NAD(+)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in plastids of the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. *Plant Mol Biol* 26: 1155-1166
- Meyerowitz EM (2001) Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiol* 125: 15-19
- Millar AJ, Short SR, Chua NH, Kay SA (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4: 1075-1087
- Mohr S, Stamler JS, Brune B (1996) Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem* 271: 4209-4214
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J* 31: 341-353
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273
- Muñoz-Bertomeu J, Anoman A, Flores-Tornero M, Toujani W, Rosa-Tellez S, Fernie AR, Roje S, Segura J, Ros R (2013) The essential role of the phosphorylated pathway of serine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 8: e27104
- 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 Signal Behav* 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. *J Exp Bot* 62: 1229-1239
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Alaiz M, Segura J, Ros R (2010b) A critical role of plastidial glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the control of plant metabolism and development. *Plant Signal Behav* 5: 67-69
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Irlés-Segura A, Mateu I, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Segura J, Ros R (2010a) The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 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 Physiol* 151: 541-558
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104: 34-41
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* 147: 1251-1263
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* 50: 1093-1106
- Nussaume L, Kanno S, Javot H, Marin E, Pochon N, Ayadi A, Nakanishi TM, Thibaud MC (2011) Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Front Plant Sci* 2: 83
- Osteryoung KW, Weber APM (2011) Plastid Biology: Focus on the Defining Organelle of Plants. *Plant Physiol* 155: 1475-1476
- Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schoffl F (2004) Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136: 3148-3158
- Peterbauer T, Richter A (2001) Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197
- Peters S, Mundree SG, Thomson JA, Farrant JM, Keller F (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *J Exp Bot* 58: 1947-1956
- Petersen J, Brinkmann H, Cerff R (2003) Origin, evolution, and metabolic role of a novel glycolytic GAPDH enzyme recruited by land plant plastids. *J Mol Evol* 57: 16-26
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45
- Pichersky E, Lewinsohn E (2011) Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62: 549-566



- Pick TR, Brautigam A, Schulz MA, Obata T, Fernie AR, Weber AP (2013) PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3185-3190
- Plaxton WC (1996) The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 185-214
- Plaxton WC, Tran HT (2011) Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol* 156: 1006-1015
- 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: 346-350
- Prabhakar V, Lottgert T, Geimer S, Dormann P, Kruger S, Vijayakumar V, Schreiber L, Gobel C, Feussner K, Feussner I, Marin K, Staehr P, Bell K, Flugge UI, Hausler RE (2010) Phosphoenolpyruvate provision to plastids is essential for gametophyte and sporophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 2594-2617
- Pyke K (2008) Plastid biogenesis and differentiation. In R Bock, ed, *Cell and Molecular Biology of Plastids Vol 19 Germany*, pp 1-28
- Ros R, Muñoz-Bertomeu J, Krueger S (2014) Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci* 19: 564-569
- Roslan HA, Salter MG, Wood CD, White MRH, Croft KP, Robson F, Coupland G, Doonan J, Laufs P, Tomsett AB, Caddick MX (2001) Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 28: 225-235
- Ruan YL (2014) Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu Rev Plant Biol* 65:33-67
- Salisbury FB, Ross CW (1994) *Fisiología vegetal*, Ed 4. Grupo Editorial Iberoamérica,
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sayas Montañana E (2014) Mecanismos de toxicidad de poliaminas: inhibición del recambio de proteínas. PhD thesis. Universitat Politècnica de València, España

- Scheibe R, Wedel N, Vetter S, Emmerlich V, Sauer mann SM (2002) Co-existence of two regulatory NADP-glyceraldehyde 3-P dehydrogenase complexes in higher plant chloroplasts. *Eur J Biochem* 269: 5617-5624
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddelloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115
- Scholl RL, May ST, Ware DH (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 1477-1480
- Schwachtje J, Baldwin IT (2008) Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiol* 146: 845-851
- Selinski J, Scheibe R (2014) Lack of malate valve capacities lead to improved N-assimilation and growth in transgenic *A. thaliana* plants. *Plant Signal Behav* 9: e29057
- Sirover MA (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-184
- Sirover MA (2011) On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys Acta* 8: 741-751

- Stitt M (2013) Progress in understanding and engineering primary plant metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 24: 229-238
- Taiz L, Zeiger E (1991) *Plant physiology*. Benjamin/Cummings Pub. Co., Redwood City, Calif.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 29: 417- 426
- Takahashi T, Komeda Y (1989) Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 219: 365-372
- Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, Ishida T, Sugimoto K, Kiba T, Sakakibara H (2012) *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J* 69: 355-365
- Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641
- Toujani W, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Rosa-Tellez S, Anoman AD, Alseikh S, Fernie AR, Ros R (2013a) Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 163: 1164-1178
- Toujani W, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Rosa-Tellez S, Anoman A, Ros R (2013b) Identification of the essential phosphoglycerate dehydrogenase isoform EDA9 as the essential gene for embryo and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 8: e27207
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, Willmitzer L (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J* 15: 109-118
- Weber AP (2004) Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr Opin Plant Biol* 7: 247-253
- Weber AP, Schwacke R, Flugge UI (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu Rev Plant Biol* 56: 133-164
- Wise RR (2006) The Diversity of Plastid Form and Function. In RR Wise, JK Hooper, eds, , Ed 23 Vol 23. Springer, The Netherlands, pp 3-26
- Xu SM, Brill E, Llewellyn DJ, Furbank RT, Ruan YL (2012) Overexpression of a potato sucrose synthase gene in cotton accelerates leaf expansion, reduces seed abortion, and enhances fiber production. *Mol Plant* 5: 430-441

- Zaffagnini M, Fermani S, Costa A, Lemaire SD, Trost P (2013) Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties. *Front Plant Sci* 4: 450
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.
- Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewy A, Lee YH, Tegeder M (2010) Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 3603-3620
- Zhao Z, Assmann SM (2011) The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 62: 5179-5189

## **8. ANEXOS**

---



**Anexo 1.** Lista de cebadores utilizados en la elaboración de esta tesis doctoral

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
<b>Genotipado de mutantes</b>		
At1g79530 (GAPCp1)	LP390_G10 (QL) RP390_G10(QR)	TTCGTTTCTGATTCTCTTGCG TCATCCCTTGATGTTGCAATG
At1g16300 (GAPCp2)	LP137288 (OL) RP137288.D (OR)	TCTTCCAATTCGACCAAAACC TCCTCGTGTGCGAGCTTTATCC
At3g04120 (GAPC1)	RPCS328689 LPCS328689	CTGATGCCGAAAACAGTGACT CTAGATCATTCCGACCCCTC
At3g04120 (GAPC1)	RP_CS850684 LP_CS850684	GAAGGTTGTTATCTCTGCCCC GACATGTGGACGATCAAGTCG
At1g13440 (GAPC2)	RPSalk 016539 LPSalk 016539	AGTGTTACGGTCAGTGGAAAG GGTTAGGACTGAGGGTCTTG
At1g13440 (GAPC2)	RPSalk 070902 LPSalk 070902	TGTCTGCAACAAATCGATACC AATGGTTGGAGTAATGTTGCTG
T-DNA SAIL	LB1_SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
T-DNA SALK	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
T-DNA Wisconsin	p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
<b>Cebadores para clonación</b>		
At1g79530 (GAPCp1)	AT1G79530FXhoI C00197RE (C00197RBamHI)	CCGCTCGAGATGGCCTTCTCTTCTCTCC CGCGGATCCTTAGTGGCTGGCAGCTACCAAAGCC
At5g38420 (RBCS2B)	AT5G38420pRbcS- For AT5G38420pRbcS- Rev	CCCAAGCTTAAGACCAAATCCTCTGTTTTAG CCTTAATTAATACTTCTTCTGTTGTTTCTC
At1g29920 (CAB2)	AT1G29920pCAB- For AT1G29920pCAB- Rev	CCCAAGCTTAGTTTTAGTTATTGGGTTGTAG GGACTAGTTGAAACTTTTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTATGAC
At1g77120 (ADH1)	AT1G77120pADH- For AT1G77120pADH- Rev	CCCAAGCTTGAATCAAATTACTGGTAAATGG GGACTAGTTATCAACAGTGAAGAACTTGC
At5g43370 (PHT1.2)	PromPht1.2HindF PromPht1.2SpeRev	CCCAAGCTTGATCACTATACAACCTCTGC GGACTAGTCTCTTGCTTTCC

**Anexo 1.** Continuación

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
<b>Cebadores para RT-qPCR</b>		
At1g13320 (PP2AA3)	AT1G13320 For (B)	ACCTGCGGTAATAACTGCATCTA
At1g13320 (PP2AA3)	AT1G13320 Rev (B)	CCGAACATCAACATCTGGGTC
At5g55840	AT5G55840 For (C)	GATGATATTGCAGTTTGTCCACCGT
At5g55840	AT5G55840 Rev (C)	CACTGTCTTGCTTGTCTTGTCTG
At1g79530 (GAPCp1)	Q1F1	GTCGCAACCTGAAGCCATCAAG
At1g79530 (GAPCp1)	RP390_G10 (QR)	TCATCCCTTGATGTTGCAATG
At1g08090	AT1G08090 For	TGGTTCTGAGTGGGAATGAGCAG
	AT1G08090 Rev	CCCTCTGACTTGGCGTTCTC
At1g17710	AT1G17710 For	GATTGGACCGATGGAGAAGATATG
	AT1G17710 Rev	TCTCCTCTCCTTCCTCTGATGAC
At1g24735	AT1G24735 For	CCACTCTGATTGTCTTCAGGCC
	AT1G24735 Rev	CAAATGCGAAATCAAACCTCTGG
At1g33030	AT1G33030 For	GAAGTGGATGCTCCATAGCTGG
	AT1G33030 Rev	CGGTAACGACTGATAACAGTTGG
At1g63140	AT1G63140 For	AGTCTGTATGAAGCCTTGGGAAC
	AT1G63140 Rev	ATGCCATGAGCAGAGGTGAATG
At1g68740	AT1G68740 For	CATAACTCCAACAACCCTTGGC
	AT1G68740 Rev	CCAACCTCAGAACAAGATTTAGAACC
At1g69880	AT1G69880 For	GGCTGCTAAATACACCGATGTTG
	AT1G69880 Rev	TGCTAAGGTTGAACTCCATCCAC
At1g73010	AT1G73010 For	CATAGCTGCTCTTGTGGCACTTG
	AT1G73010 Rev	GTTGAATCCTCTCAATGATCAAACC
At2g04460	AT2G04460 For	GGAATAGGTGGAGGCTCTTCAAC
	AT2G04460 Rev	AAAGGGATGCTCTTACAGGAG
At2g11810	AT2G11810 For	CTTCCCTCGCACTATTCTCAAC
	AT2G11810 Rev	CCCCTCCATTAATAGAACC
At2g15050	AT2G15050 For	GACCAATGGTGGTATCACTAGCC
	AT2G15050 Rev	CTAGGGTTGTAAGGACCATGCC
At2g19990	AT2G19990 For	GTGCCTCCGTGAGATGTAAGAA
	AT2G19990 Rev	CCCGGAGGATCATAGCTACAAAT
At2g33770	AT2G33770 For	GCATTCCTCATAACCTGCAAATC
	AT2G33770 Rev	AAAATGGTCCTTACAAGCATCTC
At2g38940	AT2G38940 For	GTCAGGAACTCGCTTATTGTGTTG
	AT2G38940 Rev	TCAGGTACCAAGAAAGTGAAGAGG
At3g22460	AT3G22460 For	CCATTGACATGGCAAGGCTTC
	AT3G22460 Rev	GCTCCAGATGAGATTCCCCTAAC
At3g22740	AT3G22740 For	CCAATCGTTGTATACCCAAACAGC
	AT3G22740 Rev	ACTCTCCCTCTGACTTAATCCATTC



**Ánexo 1.** Continuación

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
Cebadores para RT-qPCR		
At3g44870	AT3G44870 For	CGGTTGAAGGCATGATGATTG
	AT3G44870 Rev	TGTTGATCTATTAGACCCTGGTTAGC
At3g61920	AT3G61920 For	GTTCATTGAGAGCGAATTCAG
	AT3G61920 Rev	CCCTTTAAAGCTACTCGTAACGC
At4g08300	AT4G08300 For	TTACCAGTGAAGTAAACGAAGGTG
	AT4G08300 Rev	GGGTTACACTTGGGTATTGTTAGTC
At4g33160	AT4G33160 For	GAAATGCTTCAAGGATGGAGAAG
	AT4G33160 Rev	ATTTCAAACGTGATGCCTCGATCC
At5g01220	AT5G01220 For	GCGGTGGAATCCCTGATATAATC
	AT5G01220 Rev	CATCTCCAGGGTTGAACAAAAATC
At5g03090	AT5G03090 For	TACCGATCCTGGGCAGATTTAC
	AT5G03090 Rev	GGCGGCAGCATAGCTAGAAG
At5g03545	AT5G03545 For	GATGATGAGGATTGTGTGTGAATG
	AT5G03545 Rev	ATCAAGCTTGTCTTCATCAACCTTC
At5g06300	AT5G06300 For	CTCCAAACGCTAAAGAGTTGGTTC
	AT5G06300 Rev	GATGTTATCTCATCAAACCTCCGGTTC
At5g24660	AT5G24660 For	GCTTGAAGCAGAATCTTTAGACCAG
	AT5G24660 Rev	CAGAGTCTGAAGAAAGACGAGAGAG
At5g36130	AT5G36130 For	CCGCTACGCATAAGAATCCAGAA
	AT5G36130 Rev	GGCTTCGGACCACTTCCTTCA
At5g42800	AT5G42800 For	CCCGAATATAACGTACCTTCAACG
	AT5G42800 Rev	CAGCTTCTTGGAAGTGAATTCATG
At5g43370	AT5G43370 For	AATCAAGACAAGGCTAAGGTGGAT
	AT5G43370 Rev	GATGAAGTTAAGAACACCAAGCAC
At5g59040	AT5G59040 For	GTGAGGGCTGCTTTGTCTTATTTG
	AT5G59040 Rev	CCACGAAGACTCCTCCATTGAAC









