



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización genética y molecular de
la familia fosfoglicerato quinasa de
Arabidopsis thaliana



Tesis doctoral presentada por Sara Rosa Téllez para optar
al título de Doctora por la Universitat de València

3004 Programa de Doctorado en Biotecnología

Dirigida por Roc Ros Palau

Valencia, 2016

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



BIOTECMED

Estructura de Recerca Interdisciplinària
en Biotecnologia i Biomedicina



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización genética y molecular
de la familia fosfoglicerato quinasa de
Arabidopsis thaliana

Tesis doctoral presentada por Sara Rosa Téllez para optar al
título de Doctora por la Universitat de València

3004 Programa de Doctorado en Biotecnología

Dirigida por Roc Ros Palau

Valencia, 2016

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



BIOTECMED

Estructura de Recerca Interdisciplinària
en Biotecnologia i Biomedicina

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

INFORMA: que la presente Tesis Doctoral titulada “**Caracterización genética y molecular de la familia fosfoglicerato quinasa de *Arabidopsis thaliana***”, presentada para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Valencia, ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología Sara Rosa Tellez



En Burjassot a 1 de junio de 2016

Fdo. Roc Ros Palau

FINANCIACIÓN

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

- Proyecto de investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2009-07020/BFI (2010-2012)
- Beca para la realización de Estancias Breves del Ministerio de Economía y Competitividad EEBB-I-13-07046 (2012)
- Proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad FEDER/BFU2012-31519 (2013-2015)
- Proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad BFU2015-64204-R (MINECO/FEDER) (2016-2019)
- PROMETEO II/2014/052 de la Generalitat Valenciana (2014-2017)

A mí madre y a mí padre

AGRADECIMIENTOS

Y es justo ahora cuando te das cuenta que todo el esfuerzo ha merecido la pena... Esta tesis doctoral es el fruto de la vocación, la constancia y el empeño. Estos son los valores que he aprendido de mi madre y mi padre, así que en parte, también son los autores de este trabajo. Simplemente deciros, GRACIAS POR TODO, y voy a permitirme el lujo de escribirlo en mayúsculas porque es tanto lo que os tengo que agradecer que cualquier gesto o palabra me parece insuficiente. Gracias por luchar tanto para que mi hermana y yo tuviésemos lo mejor. También, a mi hermana, gracias por estar a mi lado cuando más te he necesitado. No hay día que no os eche de menos.

También quiero dar las gracias a mis abuel@s, que han sido un pilar muy importante en mi vida. Con ellos he aprendido que ser feliz cuesta muy poco. También a mi ti@s que han sido como unos herman@s para mí.

A Natalia, porque nadie mejor que tú sabe lo que significa esto para mí. Infinitas gracias por estar a mi lado todos estos años, animarme, escucharme cuando lo he necesitado, y sobre todo, gracias por hacerme sentir afortunada.

A mi director de tesis, Roc, gracias por confiar en mí y darme esta oportunidad. Si hubiera podido elegir a mi director, mi elección no habría sido mejor. Gracias también por ser un ejemplo para mí, ayudarme a cumplir mis objetivos profesionales, y sobre todo, gracias por ser un amigo.

Muchas gracias también a mis compañeros y ex-compañeros de grupo Armand, Jesús, María y Walid (sección punto rojo), por ayudarme y aconsejarme en lo que he necesitado. Gracias también Jesús, por ayudarme a mejorar este trabajo. Y Armand, gracias por ser especial y el mejor compañero; espero que la vida te dé todo lo que desees.

A mis compañeros, esta vez de la sección punto azul, Isabel, Marian, María (yo no me olvido de tí), Leo, Israel y Alex, agradecerles que hagan posible que la vida en el laboratorio sea mucho más llevadera y sobre todo, por hacerme reír.

También dar las gracias a Juan Segura, Isabel Arrillaga, Ester P. Lorences, Paco Marco, Miguel (Charli) y Carmen por ayudarme cuando lo he necesitado. Y a ti, Juan, gracias también por todo lo que me has ayudado y por tu implicación en mi trabajo.

Y cómo olvidarme de Mari Carmen, M. José, Consuelo, Carolina y Estrella. Gracias por todo lo que hacéis por nosotros y más que nada, gracias por ser, como se dice en mi tierra, tan buena gente.

Agradecer al personal del invernadero y a Cristina Navajo toda la ayuda que nos han prestado durante estos años. También al SCSIE por la asistencia técnica prestada durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Quiero mencionar también a todos amig@s de la universidad y sobre todo a Noelia, Iván, Chema, Juanma, Bea y Nuria. No existe tiempo ni distancia que me haga olvidar aquellos años, simplemente gracias.

También agradecer a mis amig@s de Granada y de Estepona que sigan manteniendo nuestra amistad, por contar conmigo siempre y por hacerme sentir infinitamente feliz cuando vuelvo a mi tierra.

Y por último y no por ello, menos importantes para mí, Chelo y Raúl, a los que les estaré siempre agradecida por preocuparse por mí, por ser mis amigos y, más que nada, por ser como parte de mi familia.

Y para acabar, disculparme con todas aquellas personas que no haya nombrado, prometo daros las gracias en persona.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
RESUM	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL COMO HERRAMIENTA PARA LA MEJORA DE CULTIVOS.....	3
1.2. ORIGEN Y FUNCIÓN DE LOS PLASTOS	5
1.3. METABOLISMO DEL CARBONO	6
1.3.1. Fotorrespiración.....	9
1.3.2. Síntesis de sacarosa y almidón a partir de los intermediarios del ciclo C3	11
1.3.2.1. Síntesis de sacarosa	12
1.3.2.2. Síntesis de almidón	14
1.3.3. Glicólisis.....	16
1.4. LA FOSFOGLICERATO QUINASA	18
1.5. ORIGEN EVOLUTIVO DE LOS GENES DE LA FAMILIA DE LA <i>PGK</i>	20
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y VECTORES.....	27
3.1.1. Material vegetal	27

3.1.2.	Cepas bacterianas	28
3.1.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	28
3.1.2.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
3.1.3.	Vectores de clonación y transformación	29
3.2.	MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	33
3.2.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.2.1.1.	Esterilización de las semillas	33
3.2.1.2.	Condiciones estándar para el cultivo <i>in vitro</i>	34
3.2.1.3.	Cultivo en invernadero.....	35
3.2.2.	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	36
3.2.2.1.	Medio LB	36
3.2.2.2.	Medio SOB.....	37
3.2.2.3.	Medio SOC.....	37
3.2.2.4.	Condiciones de cultivo	38
3.3.	AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	39
3.3.1.	Aislamiento de ácidos nucleicos	39
3.3.1.1.	Extracción de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	39
3.3.1.2.	Aislamiento de DNA plasmídico	40
3.3.1.3.	Extracción de RNA.....	41
3.3.1.4.	Cuantificación de ácidos nucleicos	41
3.3.2.	Análisis de ácidos nucleicos	42
3.3.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa	42
3.3.2.2.	Diseño de cebadores.....	45
3.3.2.3.	Purificación de productos de PCR.....	47
3.3.2.4.	Electroforesis en gel de agarosa	47
3.3.2.5.	Purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa	48
3.3.2.6.	Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.....	49
3.3.2.7.	Ligación de moléculas de DNA.....	49

3.3.2.8.	Secuenciación de construcciones plasmídicas.....	49
3.3.2.9.	Secuenciación de la región flanqueante del T-DNA.....	50
3.3.3.	Análisis de la expresión génica.....	50
3.3.3.1.	Reacción de síntesis de cDNA	50
3.3.3.2.	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR cuantitativa).....	51
3.4.	DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS	51
3.4.1.	Fusión de promotores al gen reportero de la β -glucuronidasa	52
3.4.2.	Construcciones de los genes <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> y <i>PGK3</i> fusionados a la proteína GFP	53
3.4.2.1.	Construcciones bajo el control del promotor constitutivo 35S	54
3.4.2.2.	Construcciones bajo el control del promotor endógeno	55
3.4.3.	Diseño y clonaje de microRNAs artificiales	56
3.4.4.	Construcción genómico de <i>PGK2</i> en pMDC99.....	58
3.5.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACIÓN	59
3.5.1.	Células competentes de <i>E. coli</i>	59
3.5.2.	Transformación de <i>E. coli</i>	60
3.5.3.	PCR de colonia (<i>PCR colony</i>).....	61
3.5.4.	Células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
3.5.5.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
3.5.6.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
3.6.	SELECCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. thaliana</i>	64
3.7.	CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS	66
3.7.1.	Caracterización fenotípica in vitro	66
3.7.2.	Caracterización fenotípica en invernadero.....	67
3.8.	MICROSCOPIA	67
3.8.1.	Localización subcelular de las proteínas PGK1, PGK2, PGK3	67
3.8.2.	Localización tisular de las proteínas PGK1, PGK2 y PGK3	67

3.9.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN	68
3.10.	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	69
3.10.1.	Extracción proteica	69
3.10.2.	Electroforesis SDS-PAGE	70
3.10.3.	Transferencia y detección	71
3.11.	ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO.....	73
3.11.1.	Preparación de las muestras.....	73
3.11.2.	Extracción de metabolitos	74
3.11.3.	Derivatización.....	75
3.11.4.	GC-TOF-MS.....	76
3.11.5.	Análisis de los cromatogramas	77
3.11.6.	Tratamiento de datos.....	78
3.12.	PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS	78
3.13.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	79
4.	RESULTADOS.....	81
4.1.	FILOGÉNESIS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES DE LA FAMILIA <i>PGK</i>	83
4.1.1.	Alineamiento y árbol filogenético	83
4.1.2.	Análisis <i>in silico</i> de los patrones de expresión de los genes de la familia <i>PGK</i>	85
4.2.	ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS GENES DE LA FAMILIA <i>PGK</i>	89
4.2.1.	Patrón de expresión tisular mediante la reacción histoquímica GUS.....	89
4.2.2.	Análisis cuantitativo de la expresión en diferentes órganos	93
4.3.	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y TISULAR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA <i>PGK</i>	95

4.4.	IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN PARA LOS GENES <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> Y <i>PGK3</i>	100
4.4.1.	Análisis de la segregación de los alelos mutantes y estudio de la correlación fenotipo-genotipo	102
4.5.	SELECCIÓN DE LÍNEAS SOBREENPRESORAS Y DE SILENCIAMIENTO GÉNICO PARA LOS GENES <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> Y <i>PGK3</i>	104
4.6.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> Y <i>PGK3</i>	108
4.6.1	Mutantes por inserción de T-DNA	108
4.6.2	Líneas sobreexpresoras y de silenciamiento génico	110
4.7.	ANÁLISIS DE LA COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN <i>PGK1</i> Y <i>PGK3</i>	113
4.8.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> Y <i>PGK3</i>	118
4.9.	CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> Y <i>PGK3</i>	119
4.10.	ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES <i>PGK1</i> , <i>PGK2</i> Y <i>PGK3</i>	122
4.11.	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS GENES DE LA FAMILIA <i>PGK</i> EN LAS DISTINTAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS	133
4.12.	PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DEL FENOTIPO DE SENESCENCIA EN LAS LÍNEAS SOBREENPRESORAS DE LAS ISOFORMAS PLASTIDIALES DE LOS GENES <i>PGK1</i> Y <i>PGK2</i>	136
5.	DISCUSIÓN	147
5.1	COMPARACIÓN DE LAS <i>PGKs</i> Y <i>GAPDHs</i>	149
5.2	FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA <i>PGK</i> Y SU IMPACTO EN LOS PROCESOS DEL DESARROLLO VEGETAL	151

5.3	IMPLICACIÓN DE LAS PGKs EN EL METABOLISMO PRIMARIO	155
5.4	LA SOBREENPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS PLASTIDIALES DE PGK INDUCE SENESCENCIA FOLIAR PRECOZ	160
6.	CONCLUSIONES	163
7.	BIBLIOGRAFÍA	169
8.	ANEXOS	189

ABREVIATURAS

1,3-bisPGA	1,3-bisfosfoglicerato
2-PG	2-fosfoglicolato
2-PGA	2-fosfoglicerato
35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
3-PGA	3-fosfoglicerato
5'UTR	Región no codificante de un gen (del inglés <i>untranslated region</i>)
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ADP	Adenosin difosfato (del inglés <i>Adenosine diphosphate</i>)
ADP-Glu	ADP-Glucosa
AGPasa	ADP-Glucosa pirofosforilasa
amiRNA	RNA de pequeño tamaño para silenciamiento génico
APS	Persulfato Amónico
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
C2	Ciclo C2 o fotorrespiración
C3	Ciclo C3 o Calvin-Benson
C58	Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
cDNA	DNA copia
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
DH10B	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
DH5	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido dexosirribonucleico
DNAsa	Dexosirribonucleasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENO	Enolasa
FAME	Metil ésteres de ácidos grasos (del inglés <i>Fatty Acid Methyl Esters</i>)
FD	Ferredoxina
Fru-1,6BP	Fructosa 1,6-bisfosfato
Fru-6P	Fructosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPA	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A subunidad 2 plastidial
GAPB	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa B plastidial (At1g42970)
GAPC	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C citosólica
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-1P	Glucosa 1-fosfato
Glu-6P	Glucosa 6-fosfato
GTP	Transportador de glucosa intercambiador de fosfato
GUS	-glucuronidasa
GV3101	Cepa bacteriana de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
HK	Hexoquinasa
IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MES	Ácido 2-N-Morfolinoetanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
MS	Murashige & Skoog
NADH/NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH/NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
Oex	Se refiere a línea(s) transgénica(s) sobreexpresora(s) (del inglés <i>overexpressed</i>)
<i>OexPGK1</i>	Se refiere a línea(s) transgénica(s) sobreexpresora(s) del gen <i>PGK1</i>
<i>OexPGK2</i>	Se refiere a línea(s) transgénica(s) sobreexpresora(s) del gen <i>PGK2</i>
<i>OexPGK3</i>	Se refiere a línea(s) transgénica(s) sobreexpresora(s) del gen <i>PGK3</i>
PBS	Del inglés <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCA	Análisis de los componentes principales
<i>pCambia1303ProPGK1:GUS</i>	Promotor del gen <i>PGK1</i> fusionado al gen reportero <i>GUS</i>
<i>pCambia1303ProPGK2:GUS</i>	Promotor del gen <i>PGK2</i> fusionado al gen reportero <i>GUS</i>
<i>pCambia1303ProPGK3:GUS</i>	Promotor del gen <i>PGK3</i> fusionado al gen reportero <i>GUS</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pfu	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
PGI	Fosfoglucoisomerasa
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PGK1	Isoforma 1 del gen <i>PGK</i> (At312780)
<i>pgk1.1</i>	Mutante homocigoto <i>pgk1.1 pgk1.1</i> para el gen <i>PGK1</i>

<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	Doble mutante <i>pgk1.1 pgk1.1 pgk3.2 pgk3.2</i> de los genes <i>PGK1</i> y <i>PGK3</i>
<i>pgk1.2</i>	Mutante homocigoto <i>pgk1.2 pgk1.2</i> para el gen <i>PGK1</i>
PGK2	Isoforma 2 del gen <i>PGK</i> (At1g56190)
<i>pgk2.1</i>	Mutante homocigoto <i>pgk2.1 pgk2.1</i> para el gen <i>PGK2</i>
<i>pgk2.2</i>	Mutante homocigoto <i>pgk2.2 pgk2.2</i> para el gen <i>PGK2</i>
PGK3	Isoforma 3 del gen <i>PGK</i> (At1g79550)
<i>pgk3.1</i>	Mutante homocigoto <i>pgk3.1 pgk3.1</i> para el gen <i>PGK3</i>
<i>pgk3.2</i>	Mutante homocigoto <i>pgk3.2 pgk3.2</i> para el gen <i>PGK3</i>
PGLm	Fosfoglicerato mutasa
PGM	Fosfoglucomutasa
Pi	Fósforo inorgánico
Pir1	Cepa de <i>E. coli</i>
PK	Piruvato quinasa
Ppi	Pirofosfato inorgánico
PPT	Transportador de fosfoenolpiruvato
<i>Pro</i>	Región promotora de un gen
<i>Pro35S</i>	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
<i>Pro35S:amiPGK1-GFP</i>	<i>Pro35S</i> fusionado a un amiRNA para el gen <i>PGK1</i>
<i>Pro35S:amiPGK2-GFP</i>	<i>Pro35S</i> fusionado a un amiRNA para el gen <i>PGK2</i>
<i>Pro35S:amiPGK3-GFP</i>	<i>Pro35S</i> fusionado a un amiRNA para el gen <i>PGK3</i>
<i>Pro35S:PGK1-GFP</i>	<i>Pro35S</i> fusionado cDNA del gen <i>PGK1</i> y la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>Pro35S:PGK2-GFP</i>	<i>Pro35S</i> fusionado cDNA del gen <i>PGK2</i> y la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>Pro35S:PGK3-GFP</i>	<i>Pro35S</i> fusionado cDNA del gen <i>PGK3</i> y la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>ProPGK1:PGK1-GFP</i>	ProPGK1 fusionado al cDNA del gen <i>PGK1</i> y la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>ProPGK1:PGK2-GFP</i>	ProPGK2 fusionado al cDNA del gen <i>PGK2</i> y la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>ProPGK1:PGK3-GFP</i>	ProPGK3 fusionado al cDNA del gen <i>PGK3</i> y la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>ProPGK2:PGK2g</i>	ProPGK2 fusionado al DNA genómico de <i>PGK2</i>
PSP	3-fosfoserina fosfatasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR cuantitativa	PCR cuantitativa en tiempo real
Rubisco	Ribulosa 1,5 bisfosfato Carboxilasa-Oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5 bisfosfato
SALK	Hace referencia a mutantes de T-DNA procedentes del Instituto SALK
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 ₁	Primera generación de plantas transgénicas
T ₂	Segunda generación de plantas transgénicas
T ₃	Tercera generación de plantas transgénicas
TB	Tampón de transformación
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácidos tricarbónicos
T-DNA	DNA de transferencia
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Ti	Plásmido Ti
TOP10	Cepa bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
TP	Triosa fosfato
TPI	Triosa fosfato isomerasa
TPT	Transportador de triosas fosfato
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WT	Tipo silvestre / grupo control
X-GlcA	5-bromo-4-cloro-3- indolil glucurónido
XTP	Transportador de xilulosa 5-fosfato

RESUMEN

La glicólisis fue la primera gran ruta metabólica dilucidada, a nivel bioquímico, alrededor de los años 40 del siglo XX. Sin embargo, la existencia en plantas tanto de dos rutas glicolíticas, que actúan en paralelo en el citosol y los plastos, como de varias isoformas para cada enzima, y la presencia de células autótrofas y heterótrofas, donde la glicólisis puede realizar funciones completamente distintas, ha complicado su comprensión. En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para caracterizar, funcionalmente, las enzimas de las dos rutas glicolíticas de las plantas, mediante aproximaciones genéticas y moleculares.

En esta tesis doctoral se ha caracterizado, funcionalmente, la familia de fosfoglicerato quinasa (PGK) de *Arabidopsis thaliana*, utilizando líneas con ganancia y pérdida de función. La gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y la PGK son las dos únicas enzimas glicolíticas que también participan en el ciclo de Calvin-Benson, donde catalizan las reacciones reversas a las de la glicólisis, por lo que deben estar estrictamente reguladas. En las bases de datos de *Arabidopsis* encontramos tres genes que codifican para posibles isoformas de la PGK, At3g12780 (*PGK1*), At1g56190 (*PGK2*) y At1g79550 (*PGK3*). El estudio de la expresión génica de estas tres isoformas reveló que *PGK1* se expresa fundamentalmente en tejido fotosintético mientras que *PGK2* lo hace en tejido fotosintético y no fotosintético, aunque mayoritariamente en el primero. *PGK3* se expresa, sin embargo, en todos los tejidos con aproximadamente igual intensidad. *PGK1* y *PGK2* son enzimas plastidiales, mientras que *PGK3* se localiza en el citosol y núcleo. Todo lo anteriormente expuesto, junto con el análisis metabolómico y de actividad fotosintética de las distintas líneas indica que *PGK1* es la isoforma fotosintética, mientras que *PGK2* y *PGK3* son las isoformas glicolíticas de los plastos y citosol, respectivamente. El estudio de los mutantes de las PGKs ha puesto de

manifiesto que el metabolismo plastidial y citosólico están íntimamente conectados, entre sí y con otras rutas del metabolismo primario, y que existen mecanismos de regulación que tienden a mantener el equilibrio entre biosíntesis y degradación. Por último, la sobreexpresión de las isoformas plastidiales de las PGKs produce alteraciones del metabolismo del carbono y del nitrógeno que conducen a la inducción de una senescencia foliar precoz.

ABSTRACT

Glycolysis became the first major metabolic pathway to be fully elucidated at the biochemical level in the 1940s. However, in plants, the existence of two different glycolytic pathways acting in parallel in the cytosol and plastids, along with the presence of several isoforms for each enzyme with probably different functions in heterotrophic and phototrophic cells has complicated its understanding. Over recent years, many efforts have been made to improve its understanding under genetic and molecular approaches.

This work contributes to the functional characterization of the phosphoglycerate kinase family in *Arabidopsis thaliana* by a gain and loss of function approach. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoglycerate kinase (*PGK*) are the only enzymes of carbon metabolism catalyzing both forward and reverse reactions of photosynthesis and glycolysis in the same organelle. For this reason they should be highly regulated.

In the *Arabidopsis* Information Resource database, we found three genes coding for three putative PGKs: At3g12780, *PGK1*; At1g56190, *PGK2* y At1g79550, *PGK3*. Our studies reveal that *PGK1* is expressed in photosynthetic tissues whereas *PGK2* in photosynthetic and non-photosynthetic (heterotrophic) tissues, but mainly in photosynthetic. Finally, *PGK3* have a constitutive expression across the whole plant. *PGK1* and *PGK2* are located in plastids while *PGK3* is located in cytosol and nucleus. These results, along with photosynthetic measurements and metabolic profiling analyses suggest that *PGK1* is involved in the photosynthesis, *PGK2* in the plastidial glycolysis and *PGK3* in the cytosolic glycolysis.

By studying *PGK* mutants, we concluded that both plastidial and glycolytic pathways are intimately related to each other and to other primary metabolic pathways. In addition, we postulate that these pathways are highly regulated to keep the

equilibrium between biosynthesis and degradation. Finally, our results suggest that overexpression of plastidial isoforms result in carbon and nitrogen metabolism changes which are responsible for early leaves senescence.

RESUM

La glicòlisi va ser la primera gran ruta metabòlica dilucidada, a nivell bioquímic, al voltant dels anys 40 del segle XX. No obstant això, l'existència en plantes tant de dues rutes glicolítiques que actuen en paral·lel al citosol i els plastidis, com de diverses isoformes per a cada enzim, i la presència de cèl·lules autòtrofes i heteròtrofes, on la glicòlisi pot realitzar funcions completament diferents, ha complicat la seva comprensió. En els últims anys s'ha realitzat un gran esforç per caracteritzar, funcionalment, els enzims de les dues rutes glicolítiques de les plantes, mitjançant aproximacions genètiques i moleculars.

En aquesta tesi doctoral s'ha caracteritzat, funcionalment, la família de fosfoglicerat quinases (PGK) d'*Arabidopsis thaliana*, utilitzant línies amb guany i pèrdua de funció. La gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa i la PGK són les dues úniques enzims glicolítiques que també participen en el cicle de Calvin-Benson, on catalitzen les reaccions reverses a les de la glicòlisi, per la qual cosa han d'estar estrictament regulades. En les bases de dades d'*Arabidopsis* trobem tres gens que codifiquen per a possibles isoformes de la PGK, At3g12780 (PGK1), At1g56190 (PGK2) i At1g79550 (PGK3). L'estudi de l'expressió gènica d'aquestes tres isoformes va revelar que *PGK1* s'expressa fonamentalment en teixit fotosintètic mentre que *PGK2* ho fa en teixit fotosintètic i no fotosintètic, tot i que majoritàriament en el primer. *PGK3* s'expressa, però, en tots els teixits amb aproximadament la mateixa intensitat. PGK1 i PGK2 són enzims plastidials, mentre que PGK3 es localitza en el citosol i nucli. Tot el que s'ha exposat, juntament amb l'anàlisi metabòlic i d'activitat fotosintètica de les diferents línies indica que PGK1 és la isoforma fotosintètica, mentre que PGK2 i PGK3 són les isoformes glicolítiques dels plastidis i citosol, respectivament. L'estudi dels mutants de les PGKs ha posat de manifest que el metabolisme plastidial i citosòlic estan íntimament connectats, entre si i amb altres

rutes del metabolisme primari, i que hi ha mecanismes de regulació que tendeixen a mantenir l'equilibri entre biosíntesi i degradació. Finalment, la sobreexpressió de les isoformes plastidiales de les PGKs produeix alteracions del metabolisme del carboni i del nitrogen que condueixen a la inducció d'una senescència foliar precoç.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL COMO HERRAMIENTA PARA LA MEJORA DE CULTIVOS

Uno de los retos de la biotecnología vegetal es mejorar el rendimiento de los cultivos para hacer frente al cambio climático y a la creciente demanda de productos agrícolas como consecuencia del incremento de la población mundial.

Desde la revolución industrial, la emisión de gases de efecto invernadero, como el vapor de agua, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxidos de nitrógeno (NO_x), clorofluorocarbonos (CFC) u ozono (O₃), ha aumentado considerablemente. Entre todos ellos, CO₂, CH₄ y óxido nitroso (N₂O) se encuentran directamente relacionados con la agricultura (Snyder y col., 2009).

Las concentraciones de CO₂, CH₄ y N₂O han mostrado un incremento del 40%, 150% y 20%, respectivamente, desde 1750, año que marca el comienzo de la revolución industrial (Figura 1.1). Según el informe sobre el cambio climático elaborado por IPCC (*The Intergovernmental Panel on Climate Change*) en 2014, las concentraciones de CO₂ mostraron un incremento notable entre 2002-2011 (2,0 ± 0,1 ppm/año), mientras que las de CH₄, tras casi un decenio de concentraciones estables, muestran un nuevo aumento desde 2007 (IPCC, Informe de síntesis, 2014). Entre 1970-2010, el CO₂ ha supuesto hasta el 78% de las emisiones de gases de efecto invernadero debido fundamentalmente a la utilización de combustibles fósiles y a los procesos industriales (Eickemeier y col., 2014). Dado que en las convenciones del cambio climático (*United Nations Framework Convention on Climate Change*, UNFCCC) los compromisos adquiridos por los países para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero no se cumplen, muchos de los trabajos sobre el tema se centran en hacer frente a los cambios climáticos irreversibles. Estos cambios, que afectarán de una forma directa a la producción agrícola, engloban tanto el incremento en las concentraciones de CO₂ atmosférico

como el aumento de la temperatura global y la reducción de la humedad del suelo (Solomon y col., 2009).

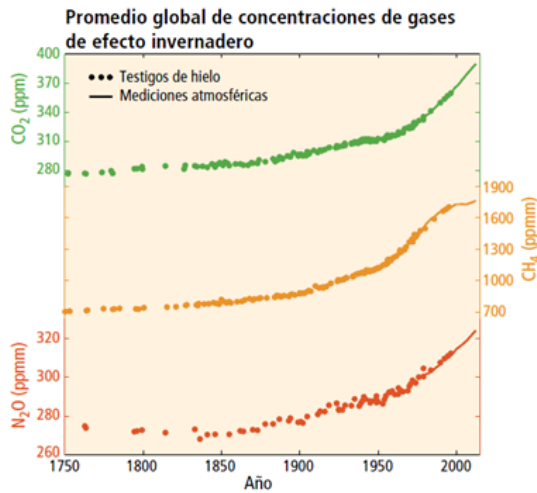


Figura 1.1. Cambios observados en las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero. Concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂, verde), metano (CH₄, naranja) y óxido nitroso (N₂O, rojo). Los puntos representan medidas sobre el hielo y las líneas mediciones atmosféricas directas. Fuente: IPCC (2014).

En este contexto, el término biotecnología vegetal se aplica al estudio y comprensión de la biología vegetal como herramienta básica para la mejora del rendimiento de los cultivos a través de la modificación genética de los mismos. En la actualidad, una de las áreas de la biotecnología vegetal que ha recibido más atención es la ingeniería metabólica, especialmente la relacionada con el metabolismo del carbono. La manipulación del metabolismo vegetal tiene como objetivos prioritarios mejorar la producción agrícola, obtener e incrementar la producción de biocombustibles, explotar la biodiversidad química de las plantas y producir fitonutrientes. No obstante, la consecución de estos objetivos requiere, en primer lugar, un conocimiento preciso del funcionamiento de las rutas metabólicas y de las redes que las conectan. La disponibilidad de las nuevas herramientas “ómicas”, especialmente la metabolómica, unido tanto al descifrado del genoma completo de algunas especies vegetales, como al desarrollo de bases

de datos (por ejemplo, TAIR, *The Arabidopsis Information Resource*; MaizeGBD, *Maize Genetics and Genomics Database*), que proporcionan información sobre la estructura de los genes, sus productos y su expresión, además de la gran disponibilidad de mutantes, especialmente en *Arabidopsis* (Fluet, 2000), ha derivado en el resurgimiento del estudio del metabolismo del carbono desde una nueva perspectiva (Stitt y col., 2010) .

1.2. ORIGEN Y FUNCIÓN DE LOS PLASTOS

Los plastos son un grupo de orgánulos específico de las plantas que están implicados en procesos metabólicos muy diversos, como la reducción fotosintética del CO₂, reducción asimiladora de nitratos y sulfatos, o síntesis de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos además; son centros de producción de fitohormonas, vitaminas y multitud de metabolitos secundarios (Bobik y Burch-Smith, 2015).

Evolutivamente, los plastos se originaron a partir de una cianobacteria que fue incorporada , mediante endosimbiosis, en una célula que poseía mitocondrias y que fue el último antepasado común de plantas y animales (Bonen y Doolittle, 1975). Durante la evolución, la cianobacteria fue perdiendo, poco a poco, su autonomía y muchos de sus genes se transfirieron al núcleo de la célula vegetal acompañados de una pequeña secuencia de localización plastidial para permitir su retorno. Se estima que más de 3000 proteínas plastidiales son codificadas por DNA nuclear (Berry y col., 2013). Para que esta relación fuera lo más estable posible, ambos genomas sincronizaron su actividad a través de un sistema de señalización que permitió la transferencia de información y que ajustó la expresión de los genes según las necesidades de cada compartimento (Bobik y Burch-Smith, 2015).

Existen varios tipos de plastos, que se clasifican según su pigmentación y función. En concreto, destacamos los leucoplastos, que carecen de pigmentación, se encargan fundamentalmente del almacenamiento de almidón (amiloplastos), lípidos (oleoplastos) y proteínas (proteinoplastos); los cromoplastos, que contienen

carotenoides (carotenos y xantofilas); y los cloroplastos, que contienen clorofilas y carotenoides (Bauer y col., 2001). Todos ellos derivan de un precursor común, transmitido de generación en generación, conocido como proplasto, que mediante un proceso de diferenciación da lugar a cada uno de ellos.

Los cloroplastos son los responsables de convertir la energía lumínica en energía química útil en forma de ATP y poder reductor (NADPH^+), que son utilizados para la fijación fotosintética del CO_2 atmosférico en forma de esqueletos carbonados. Estos esqueletos carbonados, mayoritariamente en forma de sacarosa, son posteriormente, transportados a tejidos y órganos no fotosintéticos para suplir la demanda energética necesaria para el crecimiento y desarrollo de la planta. La fotosíntesis es la ruta primaria de asimilación de carbono en la biosfera suponiendo hasta un 15% del carbono presente en la atmósfera terrestre (Raines, 2011).

1.3. METABOLISMO DEL CARBONO

El ciclo de Calvin-Benson o ciclo fotosintético de reducción del carbono fue caracterizado, por primera vez, en el alga verde *Chlorella* (Calvin y Benson, 1948) utilizando CO_2 marcado con ^{14}C . El ciclo se divide en tres fases: carboxilativa, reductora y regeneradora. En la primera fase ocurren dos reacciones prácticamente en paralelo. Por una parte, la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) carboxila a la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA), de aquí el nombre de ciclo C3. Por otra parte, la Rubisco también puede oxidar a la RuBP (Figura 1.2) formando una molécula de 3-PGA y otra de 2-fosfoglicolato (2-PG). Esta segunda reacción se considera el inicio del ciclo C2 o ruta fotorrespiratoria.

La doble actividad catalítica de la Rubisco no fue totalmente aceptada hasta los años 80 del siglo pasado (Somerville y Ogren, 1979). El equilibrio carboxilación/oxidación depende de factores ambientales como las concentraciones de CO_2 y O_2 , temperatura, intensidad luminosa y humedad. Así, en

un estudio para determinar el impacto del aumento de las concentraciones de CO₂ atmosférico, se observó que un incremento de la concentración de CO₂ favorece la actividad carboxilasa de la Rubisco y, por tanto, la actividad fotosintética de la planta; no obstante, al contrario de lo esperado, la biomasa vegetal se vio reducida. Este efecto en el desarrollo sería debido, fundamentalmente, a un proceso de regulación negativo de los azúcares en respuesta al incremento del CO₂ ambiental (Stitt y col., 2010) y/o a una disminución de la capacidad de asimilación de nitrógeno (Amer, 2010; Kant y col., 2012). Por otra parte, factores como el incremento de la temperatura y un ambiente seco favorecen la actividad oxigenasa de la Rubisco (Raines, 2011); lo que supone una reducción del 20% de la fotosíntesis neta (Bauwe y col., 2010). La Rubisco es la enzima más abundante del planeta, constituyendo hasta el 50% de las proteínas solubles de la hoja en las plantas C₃, principalmente debido a su baja afinidad por el CO₂ y al tiempo de reciclaje. Por lo tanto, estas grandes cantidades de enzima aseguran el flujo requerido para la fotosíntesis (Raines y Lloyd, 2001).

En la segunda fase del ciclo, llamada fase reductora, se producen los primeros azúcares, las triosas fosfato (TP) (DHAP: dihidroxiacetona fosfato y GAP: gliceraldehído 3-fosfato) a partir de 3-PGA en dos reacciones catalizadas por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato quinasa (PGK). El ATP generado en las reacciones luminosas de la fotosíntesis fosforila el 3-PGA en el grupo carboxilo, produciendo 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPGA), en una reacción catalizada por la PGK. El 1,3-BPGA es reducido hasta GAP con la energía del NADPH, también producido en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, en una reacción catalizada por la GAPDH (Raines, 2003).

Finalmente, en la última fase del ciclo, llamada fase regeneradora, cinco de cada seis TP formadas en la fase reductora son utilizadas para la regeneración de 3 moléculas de RuBP y el resto para síntesis de almidón, sacarosa, aminoácidos y otras moléculas con esqueleto carbonado (Raines, 2011).

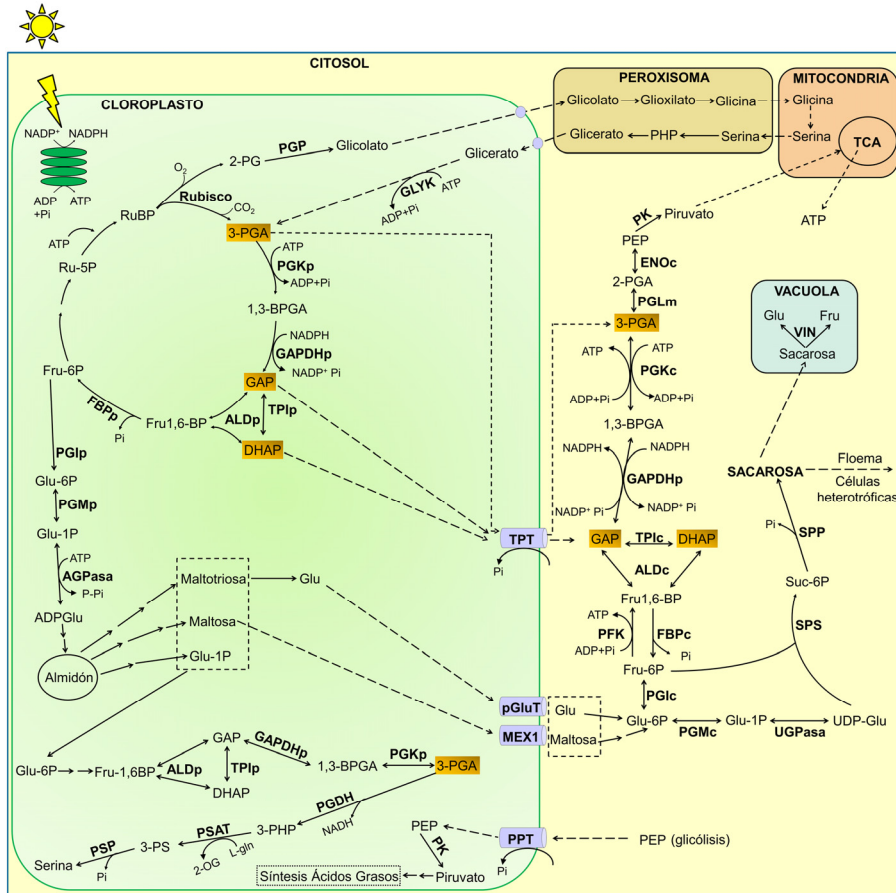


Figura 1.2. Esquema general del metabolismo del carbono en tejidos fotosintéticos.

Abreviaturas: 1,3-BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; 2-OG, 2-oxoglutarato; 2-PG, 2-fosfoglicotato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 3-PHP, 3-fosfohidroxipiruvato; 3-PS, 3-fosfoserina; ADPGlu, ADP-glucosa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; ALD, aldolasa; DHAP- dihidroxiacetona fosfato; ENOc, enolasa citosólica; FBP, fructosa 1,6-bisfosfatasa; Fru, fructosa; Fru1,6-BP, fructosa 1,6- bisfosfato; Fru-6P, fructosa 6-fosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; GAPDH, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa; Glu-1P, glucosa 1-fosfato; Glu-6P, glucosa 6-fosfato; GLYK, glicerato quinasa; MEX1, transportador de maltosa; PEP, fosfoenolpiruvato; PFK, fosfofructoquinasa; PGDH, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa; PGI, fosfoglucoisomerasa; PGK, fosfoglicerato quinasa; PGLm, fosfoglicerato mutasa; pGluT, transportador de glucosa; PGM, fosfoglucoisomerasa; PGP, 2-fosfoglicolato fosfatasa; PHP, hidroxipiruvato; PPT, transportador de fosfoenolpiruvato; PK, piruvato quinasa; PSAT, 3-fosfoserina aminotransferasa; PSP, 3-fosfoserina fosfatasa; RuBP, ribulosa 1,5-bisfosfato; SPP, sacarosa 6-fosfato fosfatasa; SPS, sacarosa fosfato sintasa; Suc-6P, sacarosa 6-fosfato; TCA, ciclo de krebs; TPI, triosa fosfato isomerasa; TPT, transportador de triosas fosfato; UDP-Glu, UDP-glucosa; UGPasa, UDP-Glu pirofosforilasa; VIN, invertasa vacuolar. Isoformas plastidiales se denotan con el nombre de la enzima y letra "p" y las citosólicas con la letra "c". Flechas discontinuas representan flujos entre compartimentos.

1.3.1. Fotorrespiración

En la reacción oxigénica de la Rubisco, además de 3-PGA, se forma 2-PG, el cual es eliminado en la fotorrespiración (ciclo C2), debido a su toxicidad. En el ciclo C2 se recupera una molécula de 3-PGA por cada dos moléculas de 2-PG, liberándose CO_2 y amonio (NH_4^+). Las etapas principales del ciclo C2 se resumen en la Figura 1.3.

El 2-PG, uno de los dos productos de la actividad oxidasa de la Rubisco es convertido en glicolato en el estroma plastidial; seguidamente, es transportado al peroxisoma donde es oxidado hasta glioxilato, el cual es transformado en glicina, que pasa a la mitocondria. En este orgánulo, dos moléculas de glicina son convertidas en serina, liberándose CO_2 y amonio. Mientras que el NH_4^+ es reasimilado en los cloroplastos, con el consiguiente consumo energético, el CO_2 se pierde. Para cerrar el ciclo, la serina pasa al peroxisoma, dónde es transformada en hidroxipiruvato, el cual, previa su conversión en glicerato, pasa al cloroplasto para regenerar 3-PGA, que se incorpora en el ciclo de Calvin-Benson (Dellero y col., 2016).

A pesar de que la ruta fotorrespiratoria supone una pérdida del carbono fijado y un incremento en el gasto energético, debido al reciclaje del 2-PG liberado y a la reasimilación del amonio, trabajos recientes ponen de manifiesto que la interacción de esta ruta con otras esenciales del metabolismo primario puede ejercer un papel fundamental en la distribución del carbono fijado en la fotosíntesis (Somerville y Ogren, 1979; Dellero y col., 2016), asimilación de nitrato (Bloom, 2015) y ciclo de Krebs (TCA) (Tcherkez y col., 2008).

En este sentido, se ha demostrado que la reducción del flujo fotorrespiratorio afecta negativamente al crecimiento de las plantas (Aliyev, 2012). Por el contrario, un aumento del flujo fotorrespiratorio, o al menos de algunas de sus reacciones enzimáticas, estimula la fijación del CO_2 en el ciclo de Calvin y mejora el crecimiento de *Arabidopsis* (Timm y col., 2012; Timm y col., 2015).

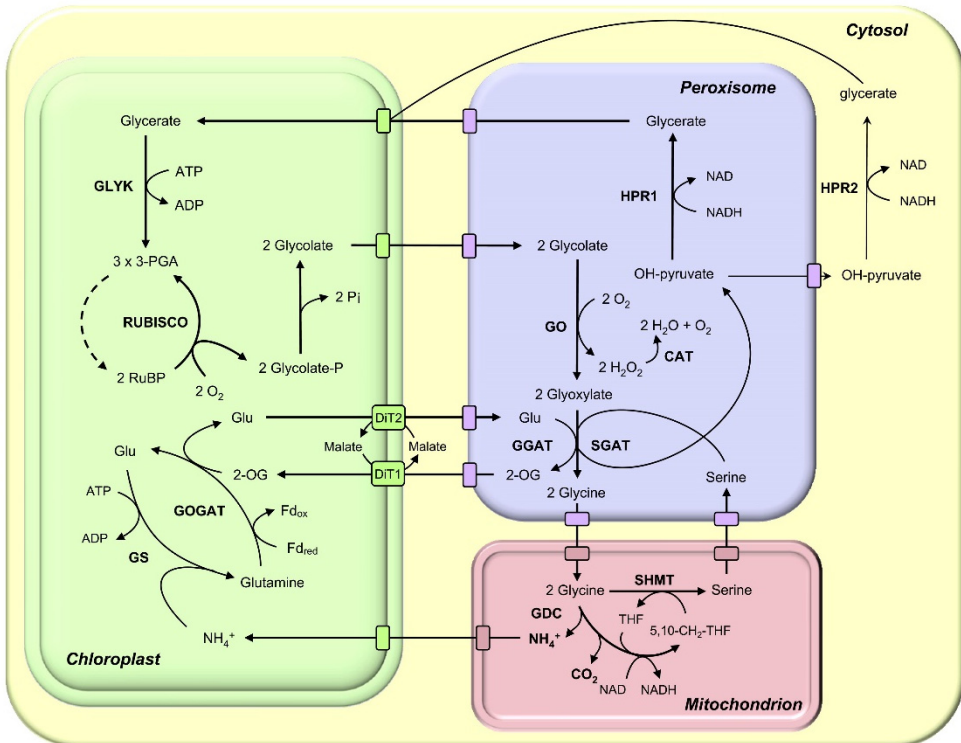


Figura 1.3. Esquema de la fotorrespiración y reasimilación de amonio (NH₄⁺). Abreviaturas: 2-OG, 2-oxoglutarato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; CAT, catalasa; HPR1, hidroxipiruvato reductasa peroxisomal; HPR2, hidroxipiruvato reductasa citosólica; Rubisco, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa; RuBP, ribulosa-1,5-bisfosfato; SGAT, serina glutamato aminotransferasa; DiT1/DiT2, transportadores dicarboxilato; GDC, glicina descarboxilasa; GGAT, glutamato glioxilato aminotransferasa; GLYK, glicerato quinasa; GO, glicolato oxidasa; GOGAT, glutamato oxoglutarato aminotransferasa; GS, glutamina sintetasa; PGP, fosfoglicolato fosfatasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa; THF, tetrahidrofolato. Flecha discontinua representa varias reacciones enzimáticas (Maurino y Peterhansel, 2010).

1.3.2. Síntesis de sacarosa y almidón a partir de los intermediarios del ciclo C3

Aunque los procesos de crecimiento y mantenimiento dependientes del carbono fijado ocurren tanto de día como de noche, el ciclo C3 sólo es operativo durante el día. En este periodo, los productos del ciclo C3 (TP) son utilizados tanto para la síntesis de sacarosa, inmediatamente disponible para el crecimiento, como para la de almidón, que representa la fuente de reserva de carbono para la siguiente noche (Smith y Stitt, 2007).

Según el modelo clásico, durante el día parte de las TP son exportadas, mediante el transportador de triosas fosfato (TPT) (Fliege y col., 1978) al citosol, dónde tiene lugar la síntesis de sacarosa; dependiendo de la demanda de los sumideros, algunas TP quedan en el estroma del cloroplasto para formar fructosa 6-fosfato (Fru-6P) que es el primer intermediario de la síntesis de almidón (Smith, 2012) (Figura 1.2). Mantener el equilibrio en el reparto de los productos del ciclo C3 entre cloroplasto y citosol es fundamental para un correcto funcionamiento de los procesos metabólicos; por ello, la actividad de algunas enzimas está muy regulada (Fridlyand y col., 1999; Raines y col., 1999; McCormick y Kruger, 2015).

1.3.2.1. Síntesis de sacarosa

La síntesis de sacarosa se produce mediante la reacción entre UDP-glucosa (UDP-Glu) y Fru-6P, que se originan a partir de las TP, o bien de la degradación del almidón que tiene lugar durante la noche (ver siguiente apartado) (Figura 1.2). La reacción está catalizada por la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), que forma sacarosa fosfato, la cual se convierte en sacarosa en una reacción catalizada por la enzima sacarosa fosfatasa (SPP). Seguidamente, la sacarosa puede ser almacenada en la vacuola, metabolizada a través de la ruta glicolítica citosólica o bien transportada, vía floema, a los órganos sumidero (heterotróficos), que dependen exclusivamente de su aporte para su correcto crecimiento y desarrollo.

En los órganos sumidero, la sacarosa es almacenada o bien se hidroliza a glucosa y fructosa por acción de las invertasas, localizadas en la pared celular (CWINV: *Cell wall invertase*), en el citosol (CINV: *Citoplasmatic invertase*) o en la vacuola (VINV: *Vacuolar synthase*) (Wind y col., 2010). La sacarosa sintasa (SUSY: *Sucrose synthase*), localizada en el citosol, también puede hidrolizar la sacarosa a UDP-Glu y fructosa utilizando UDP (Figura 1.4). Estos azúcares solubles pueden ser oxidados en la glicólisis hasta formar piruvato, que es el sustrato del ciclo de Krebs (TCA: *Tricarboxilic acid cycle*), turbina metabólica generadora de ATP y poder reductor (NADH) y de intermediarios para la síntesis de aminoácidos. Los azúcares solubles también pueden ser utilizados para la síntesis de almidón en los amiloplastos.

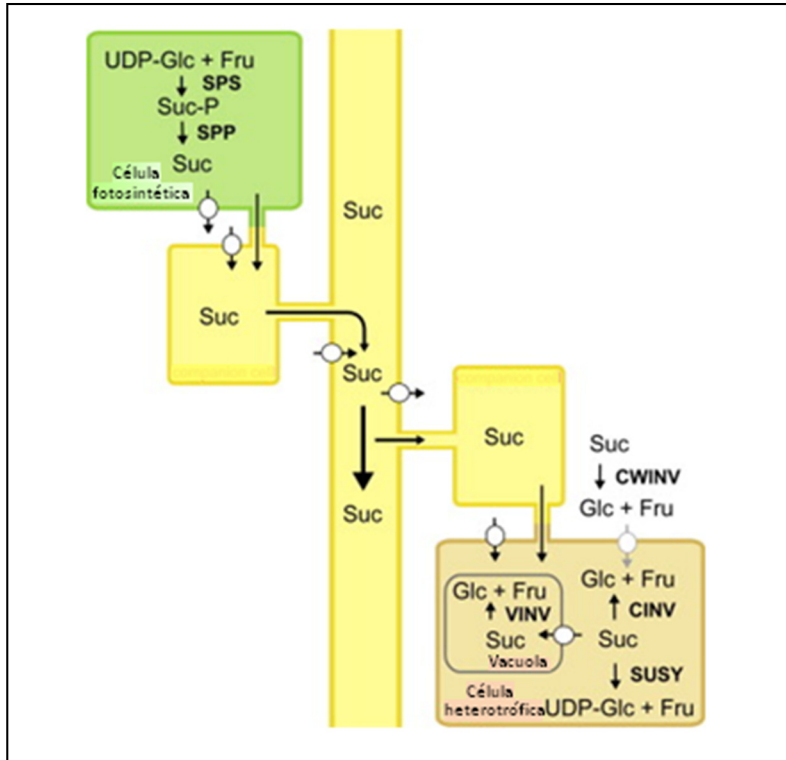


Figura 1.4. Esquema de la síntesis de sacarosa en células fotosintéticas (verde) y transporte vía floema a tejidos sumidero (células heterotróficas, naranja) donde es metabolizada o almacenada. Abreviaturas: CINV, invertasa citosólica; CWINV, invertasa de la pared celular; Fru, fructosa; SPP, sacarosa fosfato fosfatasa; SPS, sacarosa fosfato sintasa; Suc, sacarosa; Suc-P, sacarosa fosfato; SUSY, sacarosa sintasa; UDP-Glc, UDP-glucosa; VINV, invertasa vacuolar. Modificado de Wind y col. (2010).

1.3.2.2. Síntesis de almidón

En tejidos fotosintéticos, el sustrato para la síntesis de almidón, ADP-Glucosa (ADP-Glu), es sintetizado a partir de la Fru-6P, que es un intermediario del ciclo Calvin (Figura 1.2).

La Fru-6P es convertida en glucosa 6-fosfato (Glu-6P) por acción de la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI) plastidial, (Figura 1.2). Seguidamente, la enzima fosfoglucomutasa (PGM) plastidial convierte Glu-6P en glucosa 1-fosfato (Glu-1P). La última reacción está catalizada por la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), que convierte la Glu-1P en ADP-Glu y pirofosfato inorgánico (PPi) con un consumo de energía en forma de ATP (Streb y Zeeman, 2012). Aunque esta es la ruta más aceptada, numerosos trabajos con mutantes ponen de manifiesto la existencia de rutas citosólicas alternativas, que pueden suministrar los precursores para la síntesis de almidón (Caspar y col., 1985; Lin y col., 1988; Kofler y col., 2000; Muñoz y col., 2006; Streb y col., 2009; Tsai y col., 2009). Incluso si la ruta de degradación o síntesis del almidón es bloqueada, las plantas son viables pero presentan una reducción drástica de su crecimiento (Schneider y col., 2002; Schmitz y col., 2012). Este retardo en el desarrollo es atribuido a la limitación de la fuente de carbono a nivel de toda la planta (Schmitz y col., 2014).

En tejidos heterotróficos, a diferencia de los fotosintéticos, la ADP-Glu procede de la sacarosa y no directamente del ciclo de Calvin. En estas células, la sacarosa se convierte en Glu-6P por la acción combinada de invertasas, SUSY, UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa) y hexoquinasas (HK) (Kammerer y col., 1998). La Glu-6P entra en el plasto vía el transportador de glucosa 6-fosfato (GPT), incorporándose a la ruta de las pentosas fosfato donde se obtiene Glu-1P, que es el sustrato de la AGPasa, para finalmente obtener almidón. La ruta de las pentosas fosfato genera el NADPH necesario para la síntesis de almidón. El ATP es suministrado por la glicólisis plastidial o la respiración mitocondrial, entrando en el plasto vía el transportador de nucleótidos NTT (Figura 1.5). A diferencia de las células

fotosintéticas, la PGI plastidial no es activa en células heterotróficas. Esta idea se confirmó en investigaciones con mutantes *pgi* en los que el contenido de almidón se vio alterado en células del mesófilo (fotosintéticas), pero no en células heterotróficas (Tsai y col., 2009). Sin embargo, mutantes *pgm* mostraron menor contenido en almidón en todos los tipos celulares (Caspar y col., 1985).

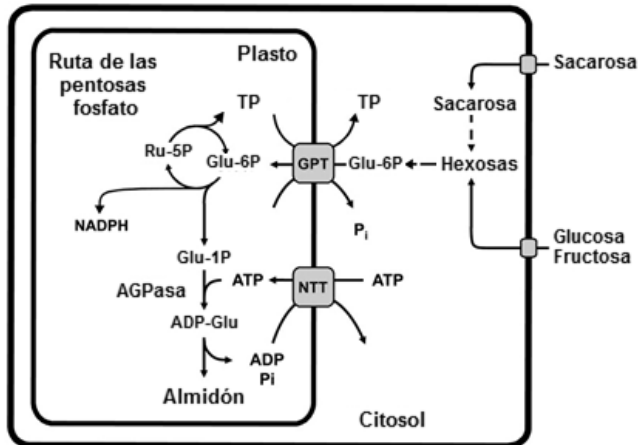


Figura 1.5. Síntesis de almidón en tejidos heterotróficos a partir de sacarosa procedente de tejidos fotosintéticos. La sacarosa es hidrolizada hasta glucosa 6-fosfato que entra al plasto vía GPT, incorporándose a la ruta de las pentosas fosfato dónde se genera NADPH necesario para la síntesis de almidón. El ATP es suministrado por la glicólisis plastidial y la respiración mitocondrial y penetra en el plasto vía NTT. Abreviaturas: ADP-Glu, ADP-glucosa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; Glu-1P, glucosa 1-fosfato; Glu-6P, glucosa 6-fosfato; GPT, transportador de Glu-6P; NTT, transportador de nucleótidos; Ru-5P, ribulosa 5-fosfato; TP, triosas fosfato. Modificado de Flüggé y col. (2011).

El almidón se sintetiza durante el día y es degradado durante la noche (Zeeman y col., 2007), siendo una fuente de reserva de carbono para la síntesis de sacarosa o un sustrato para las rutas catabólicas, lo que asegura el mantenimiento de los procesos metabólicos durante la noche (Graf y Smith, 2011). El grado de síntesis y degradación del almidón está determinado por la duración del día. Así, en condiciones de día corto (8h de luz y 16h oscuridad) existe un mayor grado de

síntesis de almidón para asegurar un aporte continuo de azúcares durante toda la noche (Gibon y col., 2009).

Los principales productos de la degradación de almidón son la maltosa y glucosa, que pueden ser exportados al citosol vía los transportadores de maltosa (MEX1) (Niittylä y col., 2004) y glucosa (pGlcT) (Weber y col., 2000) . Una vez en el citosol, maltosa y glucosa son convertidas en hexosas fosfato, que se utilizan para la síntesis de sacarosa o bien son metabolizadas en la glicólisis (Kötting y col., 2010). A partir del almidón también se forma Glu-1P que es metabolizada en la glicólisis plastidial (Figura 1.2).

1.3.3. Glicólisis

La glicólisis fue la primera gran ruta metabólica que fue totalmente elucidada, alrededor de los años 40 del siglo XX. Es una ruta esencial del metabolismo primario, presente en la mayoría de los organismos vivos, en la que las hexosas se oxidan hasta formar piruvato, ATP y poder reductor (Plaxton, 1996). Además, esta ruta proporciona precursores para diversas rutas anabólicas, entre las que destacan la biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos (Plaxton, 1996).

En plantas, la glicólisis es más compleja que en animales, ya que ocurre de forma independiente tanto en los plastos como en el citosol. Aunque las dos rutas están interconectadas entre sí por transportadores presentes en la membrana plastidial (Plaxton, 1996; Givan, 1999), no se conoce con exactitud el grado de integración entre ellas. Por otra parte, las plantas poseen células autótrofas y heterótrofas, donde la glicólisis puede realizar funciones completamente distintas, que por el momento no han sido convenientemente estudiadas. Un ejemplo de ello sería la expresión de las enzimas glicolíticas fosfoglicerato mutasa (PGLm) y enolasa (ENO). Se ha demostrado que estas enzimas tienen una expresión muy baja, o están ausentes, en tejidos fotosintéticos (Flügge y col., 2011). Se ha postulado que la ausencia de estas enzimas en los cloroplastos sería para evitar interferencias con el

ciclo C3, ya que el primer intermediario de éste (3-PGA) es también el sustrato de PGLm. Así, la ENO se expresa en tejidos heterotróficos como tricomas de la hoja, meristemo apical de la raíz y la semilla. Los mutantes de pérdida de función muestran un fenotipo de letalidad asociado a la incapacidad para desarrollar los gametos tanto masculinos como femeninos (Prabhakar y col., 2009).

En la glicólisis se producen diez reacciones que se pueden agrupar en dos fases: en la primera se forman las TP (GAP y DHAP) y se consume ATP, mientras que en la segunda se forma piruvato a partir de las TP y se recupera el ATP consumido. En determinadas condiciones, como la escasez de fosfato (Pi), donde las concentraciones de ADP y ATP son reducidas, y/o bajas concentraciones de oxígeno, existen reacciones alternativas en la glicólisis citosólica, que proporcionan cierta flexibilidad frente a los cambios ambientales. Por tanto, existen dos enzimas adicionales que evitan el consumo de ATP y ADP en favor de P_i. Una es la fosfofructoquinasa dependiente de P_i, que forma fructosa 1,6-bisfosfato (Fru 1,6-BP) a partir de Fru-6P y la otra es la GAPDH no fosforilativa, que forma 3-PGA a partir de GAP con el consumo de NADP⁺ (Davies y col., 1993; Plaxton, 1996; Rius y col., 2006).

El metabolismo plastidial y citosólico está conectado a través de muchos transportadores (Fischer, 2011; Weber y Linka, 2011); no obstante, los que conectan las rutas glicolíticas pertenecen al grupo de transportadores intercambiadores Pi, de los que existen seis tipos: el transportador de triosas fosfato/Pi (TPT) (Schneider y col., 2002), dos transportadores de fosfoenolpiruvato (PEP)/Pi (PPT1, PPT2) (Fischer y col., 1997; Knappe y col., 2003; Voll y col., 2003), dos transportadores de Glu-6P/Pi (Kammerer y col., 1998; Niewiadomski y col., 2005) y un transportador de xilulosa 5-fosfato (Xu-5P)/Pi (XPT) (Eicks y col., 2002). El transportador TPT es específico de tejidos fotosintéticos, ya que proporciona las TP para la síntesis de sacarosa durante el día. Por su parte, los transportadores GPT se expresan fundamentalmente en tejidos heterotróficos, suministrando hexoxas

fosfato para la síntesis de almidón o bien para la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) (Kammerer y col., 1998; Kunz y col., 2010).

1.4. LA FOSFOGLICERATO QUINASA

La fosfoglicerato quinasa (PGK) es una enzima esencial en el metabolismo de la mayoría de los organismos vivos y su secuencia se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución (Longstaff y col., 1989). Esta enzima cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato, altamente energético, en posición uno del 1,3-BPGA hasta ADP para dar lugar a 3-PGA y ATP (Blake y Rice, 1981).

En humanos, se han identificado dos isoformas de la enzima (PGK1 y PGK2), separadas espacialmente, y codificadas por dos genes. PGK1 se expresa en todas las células somáticas, incluyendo glóbulos rojos (Willard y col., 1985; McCarrey y Thomas, 1987; Chiarelli y col., 2012), mientras que PGK2 es específica de células espermáticas (Boer y col., 1987). Además de participar en la glicólisis, estas dos enzimas ejercen otras funciones metabólicas; en concreto, PGK1 está implicada en el metabolismo de células tumorales (Chouchane y col., 2008), la replicación y reparación del DNA nuclear (Popanda y col., 1998), angiogénesis (Lay y col., 2000) y en la metástasis (Zieker y col., 2010). PGK1 también está directamente relacionada con el inicio del cáncer de páncreas (Hwang y col., 2006), hígado (Ai y col., 2011) o estómago (Zieker y col., 2008) y que tiene una elevada actividad en pacientes con cáncer de mama. Por otra parte, PGK2 es esencial para la motilidad del espermatozoide y la fertilidad (Danshina y col., 2010).

En las plantas superiores también parecen existir dos isoformas con regiones altamente conservadas (Longstaff y col., 1989). Una de ellas se localiza fundamentalmente en el citosol (cPGK) y la otra en los plastos (pPGK) (Anderson y Advani, 1970). Además, en experimentos de inmunocitocalización con plantas de guisante se han identificado fracciones de ambas proteínas en el núcleo (Anderson y col., 2004). Todo indica que las dos PGKs de plantas podrían catalizar reacciones

en los dos sentidos: mientras que isoforma citosólica participaría en la glicólisis y gluconeogénesis (Plaxton, 1996), la plastidial debería participar, al menos en células fotosintéticas, en el ciclo de fijación del carbono y en la glicólisis plastidial.

Según las bases de datos, en algunas especies como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Populus trichocarpa* y *Oryza sativa*, existen dos isoformas plastidiales además de la citosólica (Ouibrahim y col., 2014). En este caso, cabría esperar una especialización de las dos isoformas, siendo una fotosintética y la otra glicolítica. Así, en *Arabidopsis thaliana*, de las dos isoformas plastidiales, se ha visto que un mutante de la *PGK2* (At1g56190) produce un fenotipo de letalidad, lo que sugiere que ambas isoformas no son redundantes y que por tanto podrían jugar un papel distinto en el metabolismo (Myouga y col., 2010; Ouibrahim y col., 2014).

A pesar de tratarse de enzimas glicolíticas, las isoformas de la familia *PGK*, pueden tener más de un papel en el metabolismo y desarrollo de las plantas. Trabajos realizados en *Helianthus annuus* revelan que las proteínas PGKs participan en la síntesis de lípidos de semillas oleaginosas (Troncoso-Ponce y col., 2012). Recientemente, también se ha demostrado que *PGK2* puede tener un papel importante en la tolerancia a estreses abióticos, como el salino (Liu y col., 2014; Joshi y col., 2016) y bióticos, como infecciones víricas. En este sentido, se ha demostrado que la proteína *PGK2* es necesaria para la infección del virus del mosaico de la sandía (*WMV: Watermelon mosaic virus*) (Ouibrahim y col., 2014); además, la presencia de la proteína del gen *PGK2* es crucial para la acumulación del virus del mosaico del bambú (*BaMV: Bambu mosaic virus*) ya que media el transporte del virus al cloroplasto (Lin y col., 2007; Cheng y col., 2013).

1.5. ORIGEN EVOLUTIVO DE LOS GENES DE LA FAMILIA DE LA PGK

El origen de las enzimas plastidiales y citosólicas en plantas ha sido un tema de controversia. Muchas de las reacciones de la glicólisis y la fotosíntesis tienden a ocurrir tanto en el citosol como en el cloroplasto y son catalizadas por diferentes isoenzimas específicas de cada compartimento. Generalmente, se ha aceptado la teoría de una transferencia y recombinación de genes del organismo endosimbionte (cianobacteria) al núcleo de la célula eucariota (Weeden, 1981; Longstaff y col., 1989). Esto implicaría que, aunque ambas isoformas estén codificadas por el genoma nuclear, el origen de la isoforma plastidial sería distinto al de la isoforma citosólica.

En estudios filogenéticos de las isoformas de la PGK se ha observado que, en plantas superiores, la isoforma citosólica es más similar a la isoforma plastidial (82% de identidad) que a cualquiera de sus homólogos eucarióticos o eubacterianos. Así, la teoría más aceptada es que ambas isoformas tienen un origen común y que proceden del gen ancestral de la cianobacteria que se duplicó y sustituyó al gen eucariótico preexistente (Brinkmann y Martin, 1996; Archibald y Keeling, 2003). El origen bacteriano de las PGKs podría ser muy relevante en lo que se refiere a la regulación de la enzima.

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, entre las que se encuentra la glicólisis. Aunque esta ruta se conoce desde los años 40 del siglo pasado, su caracterización se realizó únicamente a nivel bioquímico. Sin embargo, la complejidad de la glicólisis en plantas, con dos rutas actuando en paralelo, en el citosol y los plastos, junto con la presencia de varias isoformas de cada enzima y de distintos tipos celulares (autótrofos y heterótrofos), requiere tanto de una caracterización funcional de las distintas isoformas, como de un estudio de su interacción con el resto del metabolismo celular, mediante aproximaciones genéticas y moleculares.

En esta tesis doctoral se han utilizado las nuevas herramientas de metabolómica, genéticas y de biología molecular para desentrañar las funciones de las tres isoformas de la familia *PGK* de *Arabidopsis*. Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

- 1) Conocer los patrones de expresión de las distintas isoformas de la *PGK* en diferentes tejidos y órganos.
- 2) Estudiar las funciones específicas de las isoformas plastidiales y citosólica en el metabolismo de raíces y partes aéreas, mediante una estrategia de ganancia y pérdida de función.
- 3) Aportar información sobre las redes que actúan en el metabolismo primario vegetal. Concretamente, se pretende conocer las interacciones de la glicólisis con otras rutas del metabolismo primario y con los procesos de desarrollo vegetal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y VECTORES

3.1.1. Material vegetal

Como material vegetal de partida se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0). Las semillas, suministradas por el NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*; ID:N6673) (Scholl y col. 2000), se utilizaron como fondo genético para la obtención, tanto de líneas sobreexpresoras como de líneas de silenciamiento génico.

Además, se seleccionaron diferentes líneas transgénicas de pérdida de función, también procedentes del NASC, obtenidas por inserción de T-DNA mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. Los mutantes SALK (SALK_XXXXX) fueron obtenidos mediante transformación con el plásmido pROK2. La región del T-DNA lleva un marcador de resistencia a kanamicina codificado por el gen de la enzima neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) bajo el control del promotor de la nopalina sintasa (*Nos*). Los mutantes GABI-KAT (GK_XXXXX) fueron obtenidos mediante transformación con el plásmido pAC161 en el que la región del T-DNA contiene un gen marcador de resistencia a sulfadiazina. Las semillas suministradas fueron utilizadas para la obtención de las líneas homocigotas mutantes para cada uno de los genes de estudio. De esta forma, se obtuvieron mutantes para la familia de genes de la fosfoglicerato quinasa: *PGK1* (At3g12780), *PGK2* (At1g56190) y *PGK3* (At1g79550). En las primeras fases de esta investigación se adoptó una nomenclatura génica diferente a la empleada en las publicaciones que han ido apareciendo durante el desarrollo de este trabajo (Tabla 3.1). Por ello, y para evitar futuras confusiones, en esta tesis doctoral se ha tomado como referencia la nomenclatura más aceptada en la actualidad descrita por Liu y col. (2014) basada en trabajos previos de Troncoso-Ponce y col. (2012); Ouibrahim y col. (2014) (Apartado 4.1.1). Así, para *PGK1* se trabajó con los mutantes simples *pgk1.1pgk1.1* (GK_172A12) y *pgk1.2pgk1.2* (GK_908E11); para *PGK2* con los mutantes

pgk2.1pgk2.1 (SALK_016097) y *pgk2.2pgk2.2* (SALK_071724); y para la isoforma *PGK3* con los mutantes *pgk3.1pgk3.1* (SALK_062377) y *pgk3.2pgk3.2* (SALK_066422). Con el fin de simplificar, la nomenclatura utilizada para los mutantes homocigotos fue *pgk1.1*, *pgk1.2*, *pgk2.1*, *pgk2.2*, *pgk3.1* y *pgk3.2*, respectivamente. La generación del mutante doble *pgk1.1 pgk3.2* se llevó a cabo mediante cruces del mutante simple *pgk1.1* del gen *PGK1* con el mutante *pgk3.2* del gen *PGK3*.

Tabla 3.1. Nomenclatura de los genes de la familia *PGK*.

Gen	Nombre actual	Nombre original
At3g12780	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>
At1g56190	<i>PGK2</i>	<i>PGK3</i>
At1g79550	<i>PGK3</i>	<i>PGK2</i>

3.1.2. Cepas bacterianas

3.1.2.1. *Escherichia coli*

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

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

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

3.1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *Arabidopsis* se utilizó la cepa GV3101, que procede de la cepa de *A. tumefaciens* C58 resistente a rifampicina y que contiene un plásmido binario, pMP90, que proporciona resistencia a gentamicina, y un plásmido

ayudante (*helper*), pSoup, que confiere tolerancia a tetraciclina (Koncz y Schell 1986; Hellens y col. 2000).

3.1.3. Vectores de clonación y transformación

- **pCR™8/GW/TOPO®**: Plásmido con un tamaño de 2817 pb, que combina la tecnología *TOPO®* y *Gateway®*. Se comercializa linealizado y permite el clonaje de productos de PCR de hasta 5 kb con una fiabilidad del 95%, ya que incorpora una timina en los extremos 3' unida a la topoisomerasa I (procedente del virus *Vaccinia*). La unión tiene lugar mediante un enlace 3'fosfodiéster a una tirosina de la enzima. Nuestro producto de PCR, al que previamente se le han añadido en los extremos adeninas, se unirá específicamente a la timina, liberándose así la topoisomerasa (Petersen y Shuman, 1997). Además, posee sitios de recombinación específicos del fago lambda que posibilita su posterior transferencia al vector de clonación de interés y un gen que confiere resistencia a espectinomicina en *E. coli* (Figura 3.1).

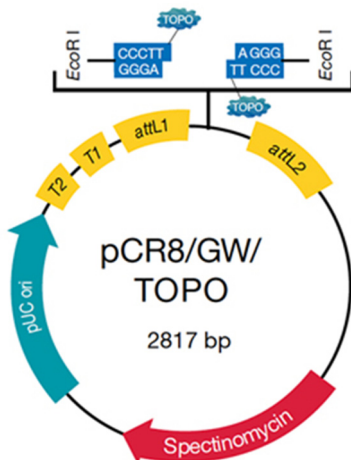


Figura 3.1. Esquema del plásmido pCR™8/GW/TOPO®. Extraído de la web <http://www.thermofisher.com>, Ref. K2500-20.

- **pBeloBAC-Kan:** Es un plásmido de origen bacteriano modificado a partir de pBeloBAC-11 (Mozo y col. 1998). Lleva un gen de resistencia a kanamicina y un sitio de clonaje múltiple que permite clonar fragmentos de DNA de gran tamaño (Figura 3.2). La secuencia completa del gen *PGK3* en pBeloBAC-Kan y subclonado en la cepa de *E. coli* DH10B fue suministrada por ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*).

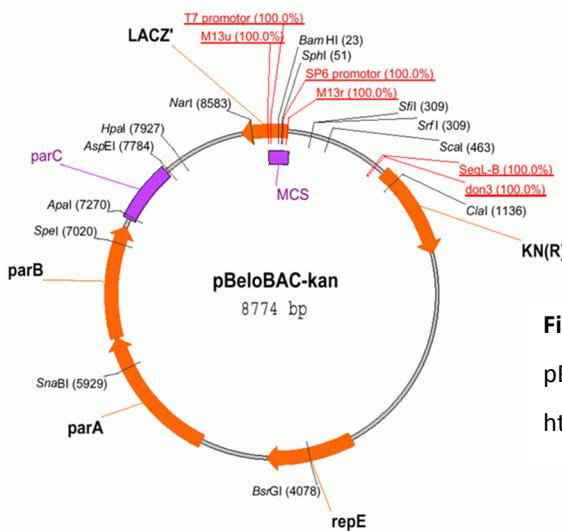


Figura 3.2. Esquema del plásmido pBeloBAC-Kan. Extraído de la web <http://www.arabidopsis.org>.

-**pUNI51:** Plásmido con un tamaño de 2554 bp que deriva de pUNI50 (Liu y col. 1998) (Figura 3.3). Este vector, con los cDNAs que codifican para las 3 isoformas de la *PGK*, fue suministrado por ABRC en la cepa de *E. coli* PIR1.

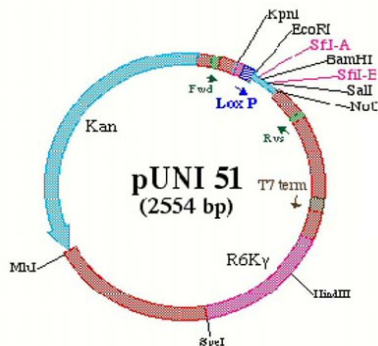


Figura 3.3. Esquema del plásmido pUNI 51. Extraído de la web <http://www.arabidopsis.org>.

- **pUC18**: Plásmido de 2686 pb que deriva del plásmido pBR322. En términos generales puede decirse que posee el replicón *rep* (procedente del plásmido pMB1), responsable de la replicación del plásmido, el gen *bla* que codifica la Beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina y el gen *lacZ*, donde se encuentra el sitio de policlonaje (Figura 3.4). Este plásmido fue utilizado para evaluar la calidad de las células competentes de *E. coli* generadas en el laboratorio.

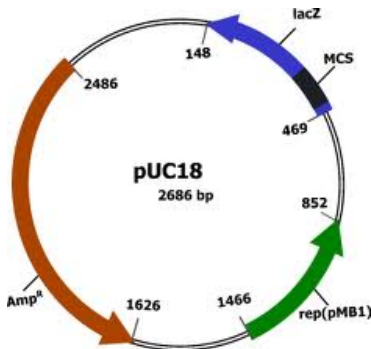


Figura 3.4. Esquema del plásmido pUC18.

Extraído de la web <http://openclipart.org>.

- **pCAMBIA 1303**: Plásmido de 12361 pb empleado para la transformación de *A. thaliana*, ya que posee una región de T-DNA (6128 pb) con los bordes RB y LB, responsables de su transferencia. El plásmido incluye un gen de resistencia a higromicina (*hptII*), para seleccionar plantas transgénicas, y otro gen de resistencia a kanamicina para seleccionar bacterias transformantes; posee además una zona de policlonaje (*polylinker*), procedente del plásmido pUC18, y los genes reporteros *gus* y *gfp* (*gusA:gfp*) fusionados entre sí (Figura 3.5). Este plásmido se utilizó para determinar el patrón de expresión tisular de las proteínas PGK.

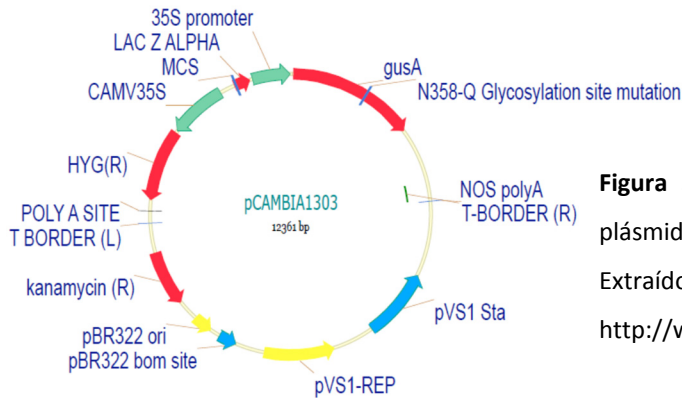


Figura 3.5. Esquema del plásmido pCAMBIA1303.

Extraído de la web <http://www.cambia.org>.

- **pMDCs:** Se trata de vectores que derivan del plásmido pCAMBIA; todos llevan una región de T-DNA que permite la transformación de *Arabidopsis* y son compatibles con la tecnología *Gateway* (regiones *attR1-attR2*). En general, contienen dos genes de resistencia, uno a higromicina (plantas) y otro a kanamicina (bacterias) bajo el control del promotor *35S* y el gen terminador *nos* (Curtis y Grossniklaus 2003). Básicamente, difieren uno de otro en su aplicación.

El plásmido pMDC83 lleva la proteína GFP, con una cola de histidinas, localizada justo después de la zona de recombinación en posición C-terminal (Figura 3.6.A). Por el contrario, en el pMDC43 la proteína GFP se sitúa justo antes de la zona de recombinación, en posición N-terminal y sin cola de histidinas (Figura 3.6.B). Ambos plásmidos fueron utilizados para la obtención de líneas sobreexpresoras, complementación de mutantes de T-DNA y estudios de localización subcelular. Por otra parte, el plásmido pMDC99 permite el clonaje de secuencias de mayor tamaño (secuencia del DNA genómico) y carece de la proteína GFP (Figura 3.6.C). Este vector se utilizó para complementar el mutante *pgk2.1*.

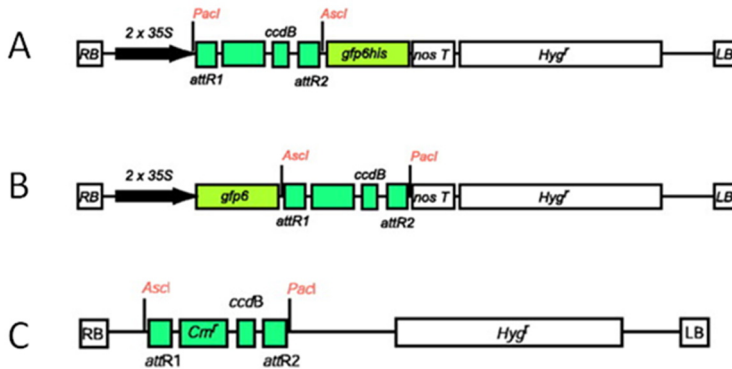


Figura 3.6. Esquema de los plásmidos pMDC usados. A: pMDC83; B: pMDC43; C: pMDC99 (Curtis y Grossniklaus, 2003).

3.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.2.1. *Arabidopsis thaliana*

3.2.1.1. Esterilización de las semillas

Previo a su cultivo *in vitro*, las semillas de interés fueron depositadas en tubos Eppendorf® de 1,5 ml y sometidas al siguiente proceso de esterilización. En primer lugar, las semillas se trataron durante 30 min en agitación con 1 ml de una solución que contenía un 70% de etanol y 0,05% de SDS (Dodecil Sulfato Sódico, SIGMA, Ref. 1667289). Seguidamente, y una vez retirada esta solución, se trataron, durante 5 min en agitación con 1 ml de etanol 70%. De esta manera, se eliminan los restos de detergente (SDS) que podrían alterar la viabilidad de las semillas. Posteriormente, las semillas se depositaron, con la ayuda de una micropipeta, sobre papeles de filtro estériles dispuestos en una cabina de flujo laminar, previamente acondicionada, para facilitar la evaporación del etanol. Finalmente, se procedió a la siembra de las semillas.

3.2.1.2. Condiciones estándar para el cultivo *in vitro*

De forma general, el medio de cultivo estándar para el crecimiento de *Arabidopsis* fue MS 1/5. Este medio está constituido por un preparado de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y vitaminas de Gamborg (Gamborg y col. 1968) suministrado por DUCHEFA BIOCHEME (Ref. P03769-05), MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico, SIGMA, Ref. 32K5465), Agar (PRONADISA, Ref. SB090321) y a un pH de 5,7 ajustado con Tris (tris-(hidroximetil)-1,3 propanediol; SIGMA, Ref. T6066) 1 M, antes de su esterilización en el autoclave. Las concentraciones de cada uno de los componentes se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Descripción del medio MS 1/5.

Componente	Descripción	Concentración
MS	Sales y Vitaminas	0,9 g/l
MES	Tampón	0,9 g/l
Agar	Gelificante	0,8 g/l
Tris	Amortiguador pH básico	-

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave (20 min a 120°C, 10⁵ Pa) y se dispensó en placas de Petri de 9 cm de diámetro o placas cuadradas de 12 cm de lado, dependiendo del objetivo del experimento. Estas operaciones se realizaron en una cabina de flujo laminar estéril. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente, en el interior de la cabina de flujo laminar. Una vez solidificado el medio, las placas se utilizaron de inmediato para la siembra de las semillas de *Arabidopsis* o se conservaron, hasta su uso, a una temperatura de entre 2-8°C, envueltas en film transparente.

Para la selección de plantas transgénicas se utilizó un medio y procedimiento similar al previamente comentado. En este caso, el medio fue MS 1/2, con un mayor contenido en sales y vitaminas (2,25 g/l), suplementado con sacarosa al 0,5% y con los antibióticos adecuados. Los antibióticos se esterilizaron por filtración a través

de membranas estériles de 0,20 μm (Whatman, Ref. FP30/0.2 CA-S) y se añadieron al medio estéril una vez que éste alcanzó los 45-50°C de temperatura. En la Tabla 3.3 se muestran las concentraciones finales de los antibióticos utilizados.

Tabla 3.3. Concentración final de los antibióticos utilizados en el cultivo *in vitro* de Arabidopsis.

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

Para la siembra de las semillas se utilizaron palillos estériles o se añadieron directamente a las placas de cultivo, distribuyéndolas de una forma más o menos uniforme con la ayuda de un papel de filtro estéril. Una vez sembradas las semillas, 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 dificulta la contaminación por microorganismos, pero permite el intercambio de gases y mantiene la humedad en el interior de las placas. Con el objetivo de facilitar y sincronizar la germinación, las placas se mantuvieron durante 3 días en oscuridad a 4°C de temperatura. A continuación, se transfirieron a cámaras de crecimiento donde permanecieron el tiempo necesario para la realización del experimento. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 22°C, 40% humedad relativa, y fotoperiodo de 16h con una intensidad luminosa de 120 $\mu\text{mol/m}^2 \text{s}^{-1}$.

3.2.1.3. Cultivo en invernadero

El cultivo de las plantas de Arabidopsis se realizó en macetas de poliestireno cuadradas de 7x7x6,5 cm y 200 ml de capacidad o en macetas redondas de 8,5 cm de diámetro. El sustrato utilizado fue una mezcla (proporción 1:1; v/v) de

vermiculita exfoliada calibre 3 (ASFALTEX) y turba Kekkila (enriquecido con macronutrientes N-P-K 15-10-20, KEKKILÄ IBERIA). Una vez preparada la mezcla, se procedió al rellenado de las macetas, que se colocaron sobre bandejas a las que se le añadieron 3 l de agua desionizada para humedecer el sustrato. Este sistema de cultivo se utilizó tanto para el trasplante de plántulas crecidas *in vitro* como para comenzar una siembra *in situ*.

Cuando el ciclo vital de *Arabidopsis* se realizó en condiciones de invernadero, las semillas se sembraron directamente sobre el sustrato, con la ayuda de palillos de madera. Seguidamente, las bandejas se cubrieron con plástico transparente, para mantener la humedad, y se llevaron a una cámara fría a 4°C durante 3-4 días y oscuridad para favorecer la germinación de las semillas (proceso de estratificación en frío). Transcurrido este tiempo, las bandejas se transfirieron a las cabinas del invernadero; inicialmente, las bandejas se colocaron debajo de las mesas para evitar efectos negativos de la luz solar directa sobre la germinación. Pasados dos días, se hicieron perforaciones en el plástico y, 2-3 días más tarde, se retiró el plástico protector y las bandejas se colocaron sobre la mesa para recibir luz directa. El riego se realizó añadiendo agua desionizada a las bandejas cada 3-5 días según las necesidades hídricas de las plantas.

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

3.2.2.1. Medio LB

También conocido como medio *Lysogeny Broth* (LB), fue descrito por primera vez en el s. XX por Bernati con el objetivo de optimizar las condiciones de crecimiento de *Shigella* para sus estudios sobre lisogénesis (Bertani, 1951; Bertani, 2004). Desde entonces, es el medio más utilizado en biología molecular para el mantenimiento y cultivo de cepas recombinantes.

El medio LB contiene 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 su esterilización en autoclave.

Cuando se requería el aislamiento de colonias individuales, el medio se preparaba en estado sólido mediante la adición de 1,5% (p/v) de agar (PRONADISA, Ref. 1802.00) después de ajustar el pH.

3.2.2.2. Medio SOB

El medio SOB (*Super Optimal Broth*) es un medio de cultivo enriquecido (Hanahan, 1983) que fue utilizado para la preparación y transformación de células competentes.

La preparación de células competentes de *E. coli* requiere la perforación de las paredes bacterianas para permitir la introducción de DNA foráneo en el interior de la célula. Por ello, para asegurar la supervivencia, debe utilizarse un medio rico en nutrientes e isotónico.

El medio SOB está compuesto por 2% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ y 10 mM de MgSO₄. La triptona y el extracto de levadura proporcionan la fuente de nitrógeno y los factores de crecimiento necesarios para la recuperación de las células que han sido transformadas. El NaCl y el KCl aseguran el aporte de iones esenciales, mientras que el MgCl₂ y el MgSO₄, suministran el magnesio necesario para llevar a cabo las reacciones enzimáticas.

3.2.2.3. Medio SOC

Al igual que el medio SOB, el medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), es un medio enriquecido, pero, a diferencia del primero, lleva un suplemento de glucosa. Dicho monosacárido proporciona una fuente de carbono y energía que son utilizadas por *E. coli* para reparar los daños sufridos en el proceso

de transformación y recuperar los valores normales de replicación (Sambrook y col., 1989). Así pues, este medio fue utilizado para el crecimiento de las células bacterianas después de ser transformadas por choque térmico. El medio SOC 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, y después de su esterilización en el autoclave, el medio se suplementó con las soluciones estériles de MgCl₂ y glucosa a una concentración final de 10 mM y 20 mM, respectivamente.

3.2.2.4. Condiciones de cultivo

En función del objetivo y del protocolo aplicado, las bacterias se cultivaron en medio líquido o en medio sólido. Para el crecimiento en medio líquido de *E. coli* y *A. tumefaciens* se utilizaron tubos Corning® de 15 ml o matraces estériles de 250 ml. 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). Las placas se pasaron a una estufa a la que se ajustó la temperatura óptima requerida por cada cepa bacteriana.

Los dos medios se suplementaron con 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 Las concentraciones finales de los antibióticos utilizados se especifican en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Concentración de los antibióticos utilizados en el cultivo *in vitro* de bacterias.

Antibiótico	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)
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

El protocolo de referencia, con ligeras modificaciones, utiliza para la extracción de DNA genómico fue el descrito por Edwards y col. (1991) ya que garantiza la extracción de un número elevado de muestras en un período relativamente corto (alrededor de 24 muestras en 30 min) y sin necesidad de usar disolventes orgánicos, como el fenol o el cloroformo.

Brevemente, la extracción se realizó como sigue. Trozos de hojas jóvenes, de tamaño similar, se introdujeron en tubos Eppendorf® de 1,5 ml estériles colocados en hielo para evitar su desecación. Cada muestra fue triturada a temperatura ambiente con ayuda de un pistilo de plástico estéril y homogenizada, mediante vortexado, durante 5 segundos, junto con 400 μl 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]. Dado que el homogeneizado

puede ser mantenido a temperatura ambiente durante una hora, fue posible procesar varias muestras al mismo tiempo. Los extractos fueron centrifugados a 13000 rpm, durante 2 min, y 300 μ l del sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Para precipitar el DNA se añadieron 300 μ l de isopropanol y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 50 μ l de agua milli-Q® (ultrapura) y se conservó a una temperatura de 4°C.

3.3.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico

Para el aislamiento o extracción de DNA plasmídico se utilizó el protocolo descrito en el kit de *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Ref. 11754785001) de ROCHE APPLIED SCIENCE. Con este protocolo se consigue la extracción de plásmidos de *E. coli*, mediante lisis alcalina, de elevada pureza, lo cual es fundamental para procesos de clonaje.

Para cuantificar de forma aproximada el DNA plasmídico se tomó una alícuota (1-5 μ l) del plásmido y se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Apartado 3.3.2.4) junto con el marcador Lambda DNA/*Hind*III Marker (Biotools, Ref. 31.011), con patrón de bandas y concentración conocidos. De este modo, por comparación, se obtiene un valor de concentración aproximado. Cuando se requería precisión en la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, tomando 1 μ l de muestra.

3.3.1.3. Extracción de RNA

La extracción del RNA de tejidos de Arabidopsis se realizó siguiendo el protocolo descrito por MACHEREY-NAGEL en *Total RNA Isolation Kit* (Ref. 740955.50).

Las fases del protocolo fueron:

i. **Homogenizado de la muestra.** Se partió de 100 mg de un pulverizado de material biológico que había sido triturado con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido.

ii. **Lisis celular:** Adicción de un tampón de lisis que provoca la rotura de las membranas celulares, inactiva las posibles RNAsas presentes en el material biológico y favorece la unión del RNA a la columna.

iii. **Filtrado:** El lisado celular se transfiere a través de una columna y es centrifugado para eliminar los restos de material vegetal.

iv. **Unión del RNA a la columna de sílice** mediante la adicción de una solución de etanol al 70% y centrifugación.

v. **Eliminación de las sales** que facilitan la digestión de las DNAsas.

vi. **Degradación del DNA** mediante el uso de DNAsa.

vii. **Inactivación de la DNAsa** y lavado de la membrana de sílice.

viii. **Elución del RNA** con agua libre de RNAsas.

3.3.1.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

Se realizó en un nanodrop (Thermo Scientific *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*), que permite la cuantificación de muestras muy concentradas sin necesidad de dilución previa, garantizando además la exactitud y reproducibilidad deseadas partiendo de volúmenes muy pequeños (1 μ l).

3.3.2. Análisis de ácidos nucleicos

3.3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es un método de biología molecular que permite obtener millones de copias de un fragmento de DNA (genómico o plasmídico). En términos generales, podríamos decir que consiste en la repetición cíclica de un proceso de desnaturalización, hibridación y extensión (Mullis y col. 1986).

De forma rutinaria, la reacción de amplificación se llevó a cabo preparando una mezcla con un volumen final 30 μ l. Los reactivos y sus concentraciones se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Mezcla de PCR para un volumen final de 30 μ l.

Componentes	Concentración final	Volumen (μ l)
Tampón	1x	3
MgCl ₂	2 mM	1,2
dNTPs	0,2 mM	0,6
Cebadores	0,5 μ M	1,5
DNA polimerasa	0,03 U/ μ l	0,18
DNA	10-50 ng	1
Agua milli-Q®	-	19,52

A continuación, se especifican algunas características de los reactivos:

- El tampón de reacción 10x [Biotools *DNA Polymerase*, Ref. 10.047, Tris HCl 750 mM (pH 9,0), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM] mantiene un pH adecuado para el correcto funcionamiento de la polimerasa, favoreciendo además las condiciones óptimas para permitir la hibridación de los cebadores a temperaturas elevadas.
- El cloruro magnésico (MgCl₂) forma iones divalentes (Mg²⁺) que actúan como cofactores de la Polimerasa (Biotools *DNA Polymerase*, Ref. 10.047).

- Los desoxinucleótidos (dNTPs) son los compuestos necesarios para la amplificación del DNA a partir de la hebra molde (Thermo Scientific, Ref. R0181).
- Los cebadores son pequeños fragmentos de DNA (entre 18-22pb) que hibridan en una región complementaria a su secuencia y proporcionan un grupo 3'OH para que la Polimerasa pueda comenzar el proceso de amplificación. La descripción para el diseño de cebadores se recoge en el Apartado 3.3.2.2.
- El DNA de partida fue entre 10 a 50 ng [1 µl del extracto de DNA genómico (Apartado 3.3.1.1) o 1 µl de una dilución del DNA plasmídico (Apartado 3.3.1.2)].
- Por lo general, para procesos de genotipado, se utilizaba una DNA Polimerasa suministrada por Biotools (Ref. 10.047) que era una versión modificada genéticamente de la Taq original de *Thermus Aquaticus* (Saiki y col. 1988). Sin embargo, para procesos de clonaje, dónde se requiere una amplificación de alta fidelidad y una baja tasa de errores, se empleó la enzima *Pfu* DNA Polimerasa (Biotools, Ref. 10.511) o DNA Polimerasa fusión de alta fidelidad (*Phusion Hot Start II DNA Polymerase*, Ref. F-549S).

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) y en un termociclador GeneAmp PCR SYSTEM 9600 (APPLIED BIOSYSTEMS). Este termociclador contiene un sistema de precalentamiento de la tapa superior a una temperatura de 103°C para evitar la condensación de las muestras.

Los parámetros estándar 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 fragmento 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 hasta que fuesen recogidas las muestras del termociclador. Cuando los productos de PCR no se utilizaban inmediatamente, se conservaron a 4°C en un refrigerador.

PCR para la identificación de mutantes T-DNA

Gracias a esta técnica se pudieron identificar mutantes homocigotos para cada uno de los genes de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*). Generalmente, las semillas recibidas del NASC, tanto de las líneas transgénicas SALK como GABI-KAT, eran heterocigotas para el transgén, por lo que era necesario obtener una siguiente generación de semillas para identificar y aislar líneas mutantes homocigotas.

Se utilizaron dos cebadores específicos del DNA genómico flanqueantes a la inserción de T-DNA (LP y RP) y otro que hibridaba específicamente en el borde izquierdo (BP) del T-DNA (Figura 3.7.A). El diseño de cebadores se describe en el Apartado 3.3.2.2.

La reacción de amplificación (PCR) se llevó a cabo con varias combinaciones de los cebadores (Figura 3.7.B). Finalmente, el producto de PCR fue separado en un gel de agarosa (Apartado 3.3.2.4) para su visualización.

Al utilizar tres cebadores de forma simultánea (RP-LP-BP), el patrón fue el siguiente:

- El genotipo silvestre o *Wild Type* (WT) muestra una banda correspondiente al tamaño en pb entre los cebadores RP-LP, ya que ambos alelos del gen son silvestres.
- El genotipo homocigoto (Ho) muestra una banda de tamaño proporcional a la distancia entre los cebadores (RP-BP), puesto que ambos alelos del gen son mutantes o portadores del inserto de T-DNA.
- En el genotipo heterocigoto (He) se observan dos bandas: una correspondiente al alelo silvestre y la otra correspondiente al alelo mutante.

Cuando se utilizaban las combinaciones de dos cebadores, el genotipo se determinó comparando el patrón RP-LP y RP-BP, tal y como se muestra en la Figura 3.7.B. Así, si el T-DNA se encuentra entre los cebadores flanqueantes (LP-RP) la polimerasa no

puede amplificarlo, debido a su gran tamaño y si el T-DNA no está presente no tendremos amplificado usando los cebadores RP-BP, puesto que el cebador BP es específico del transgén (T-DNA).

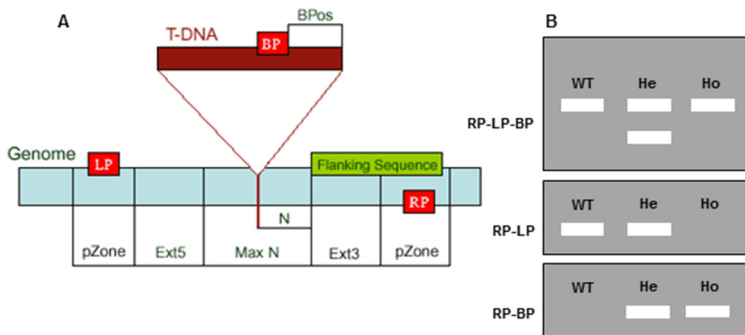


Figura 3.7. Esquema general de la zona de hibridación de los cebadores (A) y patrón esperado de bandas para las distintas combinaciones de cebadores (B) WT (*Wild Type*), He (heterocigota), Ho (homocigota). Figura modificada de la web <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

3.3.2.2. Diseño de cebadores

El diseño de cebadores es un paso clave para el aislamiento de mutantes, estudio de la segregación y la preparación de construcciones génicas.

Para las diferentes líneas de pérdida de función (mutantes de T-DNA *SALK* y *GABI-KAT*) se utilizó el programa *T-DNA Primer Design*, disponible en la web *SIGNAL* (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Las secuencias de los cebadores (oligonucleótidos) generadas a través de esta herramienta fueron corroboradas con la ayuda de los programas *Jellyfish* y *Amplify 3.1.*, para asegurar así su estabilidad, posición y longitud de amplificado.

El resto de cebadores necesarios para el desarrollo de esta tesis doctoral fueron seleccionados a partir de sus secuencias y en función del objetivo perseguido. En general, se siguieron una serie de pautas:

- Tamaño entre 17-28 nucleótidos para asegurar una hibridación específica.
- Contenido G+C entre 50-60%. La unión G-C contiene por 3 puentes de hidrógeno, mientras que la unión A-T está constituida por dos. Por tanto, esto hace el enlace GC más fuerte y más resistente a la desnaturalización por efecto de la temperatura y permite uniones a la cadena molde más estables.
- Para el caso específico de cebadores cuyo objetivo era evaluar los valores relativos de transcritos por RT-PCR cuantitativa, éstos amplificaban como máximo fragmentos de entre 100-200 pb (Udvardi y col., 2008) y eran diseñados utilizando como cadena molde el cDNA (exones o regiones codificantes). También se procuraba, para el caso de los mutantes, que los cebadores se encontraran situados a ambos lados de la inserción. Cuando el objetivo era evaluar los niveles de expresión de las distintas isoformas utilizando un fondo genético silvestre, los cebadores se diseñaban en los extremos 3'UTR, debido a la similitud entre las secuencias de los tres genes. Finalmente, aquellos que eran utilizados para el clonaje de promotores y cDNAs, se diseñaron incluyendo los sitios de corte de las enzimas de restricción adecuadas para su posterior clonaje en el vector de interés.
- Todas las secuencias candidatas fueron evaluadas en función de sus parámetros de estabilidad y sus temperaturas de hibridación, procurando siempre que la pareja de cebadores (directo y reverso) tuvieran temperaturas de hibridación parecidas.
- Finalmente, los cebadores se compararon con todo el genoma de *Arabidopsis* (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*) para corroborar que fueran específicos del gen para el cuál habían sido diseñados. Las secuencias de todos los cebadores utilizados en esta tesis se encuentran recogidas en el Anexo (Tabla Suplementaria 1).

3.3.2.3. Purificación de productos de PCR

Para la purificación del producto de PCR se utilizó el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Ref. 11732668001) de ROCHE APPLIED SCIENCE. Mediante este procedimiento se eliminan los restos de cebadores, sales, oligonucleótidos no incorporados y la DNA Polimerasa, que pueden interferir en las subsecuentes reacciones de marcaje, secuenciado o clonaje. La cantidad de DNA que se puede recuperar depende de la cantidad de partida, pero aproximadamente ronda valores del 80% de purificación.

3.3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR y/o vectores de clonaje se separaron en geles de 0,5X TBE (45 mM de ácido bórico, 45 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 1 mM de EDTA), 0,8% agarosa D-1 de baja electroendosmosis (PRONADISA, Ref. 8016) y 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio (SIGMA, Ref. E-1510). El bromuro de etidio se intercala entre la molécula de DNA y emite fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta.

La concentración de agarosa para preparar el gel dependió del tamaño del fragmento a separar (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Concentraciones de agarosa para separar un fragmento de DNA.

Concentración (g/100 ml)	Tamaño del fragmento (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Fuente (Sambrook y col., 2001)

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 3 µl 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-HindIII* (Biotools, Ref. 31.011).

El gel fue introducido en una cubeta de electroforesis con tampón 0,5% TBE y se aplicó un voltaje constante de 100 V.

Como el DNA está cargado negativamente, debido a los grupos fosfato, la migración tiene lugar desde el polo negativo hacia el polo positivo y la distancia recorrida depende del tamaño del fragmento.

Cuando se alcanzó el grado de separación deseado, se procedió a la visualización iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda en un transiluminador UVitec UVIdoc-HD2/20.

3.3.2.5. Purificación de fragmentos de DNA en geles 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 *PCR clean-up Gel extraction, NucleoSpin® Extract II* (Ref. 740609.50) de MACHEREY-NAGEL. Con este protocolo se eliminan los restos de oligonucleótidos, enzimas, sales y otras impurezas que puedan interferir *a posteriori*.

En primer lugar, se añadió una solución tamponadora que favorece la unión de los fragmentos de DNA a la membrana de la columna. La mezcla resultante se calentó hasta disolver la agarosa y, posteriormente, se pasó por la columna para unir los fragmentos de DNA. A continuación, se eliminaron los posibles contaminantes con

una solución etanólica y, finalmente, el DNA puro fue diluido en un tampón con baja concentración de sales y ligeramente alcalino (5 mM Tris/HCl, pH 8,5). Como último paso, el purificado se cuantificó (Apartado 3.3.1.4) y se guardó a -20°C hasta su uso.

3.3.2.6. 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 general, se procuró elegir parejas de enzimas que fueran compatibles en cuanto a sus tampones y condiciones óptimas de corte, lo que permitió la realización de digestiones dobles (dos procesos de corte en la misma reacción).

En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima (1 U es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µg en una hora y en un volumen final de 50 µl) por cada microgramo de DNA a digerir. Las enzimas que utilizamos fueron de las casas comerciales TAKARA y Thermo Scientific.

3.3.2.7. 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.

3.3.2.8. Secuenciación de construcciones plasmídicas

Los insertos de los plásmidos obtenidos en la elaboración de las distintas construcciones génicas 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/), BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Jellyfish.

3.3.2.9. Secuenciación de la región flanqueante del T-DNA

La secuenciación de insertos de T-DNA de los mutantes homocigotos para los genes de la familia *PGK* se realizó para corroborar la información aportada por el distribuidor de las semillas (NASC, Apartado 3.3.1). Para ello, se llevó a cabo una PCR con cebadores que permitiesen la identificación del alelo mutante (Apartado 3.3.2.1) y se purificó el producto de PCR (Apartado 3.3.2.3), que fue enviado al SCSIE de la Universidad de Valencia. Conocida la secuencia nucleotídica, se comparó con la secuencia del gen de interés (DNA genómico o cDNA), con la finalidad de obtener una localización exacta del inserto, así como su orientación. Para ello, nuevamente, se utilizaron las aplicaciones GeneDoc, BLAST y Jellyfish.

3.3.3. Análisis de la expresión génica

3.3.3.1. Reacción de síntesis 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, el RNA (0,5 a 3 µg) se mezcló con 2 µl de tampón de reacción (5X Reaction Mix), y 1 µl de la enzima retrotranscriptasa (*Maxima® Reverse Transcriptase*), completándose 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. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR cuantitativa)

Esta técnica permite cuantificar los niveles de transcritos o RNAm de un gen de interés. Para ello se utilizó el kit *SYBR® Premix Ex Taq™, Perfect Real Time* (TAKARA, Ref. RR041A) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis por RT-PCR cuantitativa fue llevado a cabo usando un GeneAmp® 5700 *Sequence Detection System* (APPLIED BIOSYSTEMS, Ref. PN 4304472), que detecta la fluorescencia emitida por el *SYBER® GREEN I Dye* intercalado en la doble cadena de DNA. El programa 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.

El punto de partida en la cuantificación viene determinado por el valor de CT (*Threshold cycle*), que se define como el ciclo de amplificación en el que se supera el valor umbral. El valor de CT es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA (Schmittgen y Livak, 2008).

La eficiencia de la reacción de RT-PCR cuantitativa se calculó utilizando como control interno varios genes de expresión constitutiva (Czechowski y col., 2005) y en función de la eficiencia de los cebadores. La abundancia relativa del nivel de RNAm fue calculada a través del método comparativo, mediante análisis de los diferentes parámetros CT obtenidos de acuerdo con Pfaffl (2001).

3.4. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS

Para la generación de las construcciones génicas, se siguieron los métodos estándar en biología molecular recogidos en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook y col., 2001).

3.4.1. Fusión de promotores al gen reportero de la β -glucuronidasa

La β -glucuronidasa (GUS) es una enzima originaria de *E. coli* que produce un compuesto coloreado mediante un análisis histoquímico. La expresión del gen *GUS* en *A. thaliana*, bajo el control del promotor de interés, permite determinar el patrón de expresión tisular de un gen. Esta construcción génica es muy estable, de manera que las plantas transformadas continúan mostrando altos niveles de actividad GUS a pesar de que sus semillas puedan ser almacenadas durante largos períodos de tiempo (Jefferson y col., 1987).

En el estudio de los patrones de expresión tisular, se fusionaron los promotores de los genes *PGK1* (At3g12780), *PGK2* (At1g56190) y *PGK3* (At1g79550) al gen *GUS*, obteniéndose las construcciones plasmídicas *pCAMBIA1303ProPGK1:GUS*, *pCAMBIA1303ProPGK2:GUS* y *pCAMBIA1303ProPGK3:GUS*, respectivamente. La estrategia de clonaje se detalla a continuación.

Los promotores fueron amplificados utilizando como molde ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Del gen *PGK1* se amplificaron 1508 pb de la región promotora, utilizando los cebadores At3g12780PromHind3F y At3g12780PromSpeR; para el gen *PGK2*, el tamaño del amplificado fue de 1466 pb, con los cebadores At1g56190PromNcoIR y At1g56190PromXbaIF; finalmente, del gen *PGK3* se amplificaron 1284 pb con los cebadores At1g79550PromSpeIR y At1g79550PromHind3F. Los cebadores, además de la secuencia del promotor, incluían una serie de nucleótidos específicos para su posterior digestión con enzimas de restricción apropiadas para realizar el clonaje.

Los fragmentos de ADN amplificados, digeridos y purificados fueron introducidos, mediante ligación, en el vector *pCAMBIA1303* que había sido extraído y abierto previamente con las mismas enzimas de restricción con las que se había digerido el promotor al que se quería fusionar. La explicación detallada de cada técnica queda recogida en el Apartado 3.3.2 de Análisis de ácidos nucleicos. Las regiones

promotoras de los genes *PGK1* y *PGK3* se clonaron entre los sitios de restricción *HindIII* y *SpeI*, mientras que la del gen *PGK2* se hizo entre los sitios *XbaI* y *NcoI*.

A continuación, se resume el procedimiento general seguido para la obtención de líneas transgénicas que contenían estas construcciones plásmidicas.

Las células competentes de *E. coli* DH5 fueron transformadas con cada una de las construcciones obtenidas. Este paso es necesario para incrementar número de copias del plásmido y favorecer la posterior transformación de *A. tumefaciens*.

Las colonias transformantes fueron seleccionadas en medios LB con Kanamicina (gen de resistencia en el plásmido pCambia 1303) mediante *PCR colony* (Apartado 3.5.3), utilizando cebadores específicos del inserto. Posteriormente, se prepararon cultivos en medio LB líquido con kanamicina para extraer el plásmido. Parte de éste fue utilizado para secuenciar el fragmento introducido y sus zonas adyacentes. Una vez confirmado, se procedió a la transformación de *A. tumefaciens*. La selección de colonias transformantes se hizo del mismo modo que con *E. coli*, aunque en este caso, además de la kanamicina, se utilizaron como antibióticos de selección tetraciclina y gentamicina (genes de resistencia presentes en la cepa de *Agrobacterium*). Finalmente, se transformó *A. thaliana* mediante infección del botón floral (Apartado 3.5.6).

3.4.2. Construcciones de los genes *PGK1*, *PGK2* y *PGK3* fusionados a la proteína GFP

Para la sobreexpresión en plantas silvestres, complementación de los mutantes por inserción de T-DNA y determinación de la localización intracelular de las enzimas, se realizaron distintas construcciones que incluían las secuencias de cDNAs de los genes *PGK1*, *PGK2* y *PGK3* bajo el control de un promotor constitutivo (*Pro35S*, promotor del virus del mosaico de la coliflor) o el promotor endógeno (*ProPGK*).

3.4.2.1. Construcciones bajo el control del promotor constitutivo 35S

Los cDNAs de *PGK1*, *PGK2* y *PGK3* (U09198, U24877 y U17240 respectivamente) fueron proporcionados por el ABRC, en la cepa *E. coli* PIR1, y subclonados en el vector pUNI51. Cada uno de ellos fue amplificado utilizando una DNA polimerasa de alta fidelidad y bajo número de errores (*Pfu*). *PGK1* se amplificó con los cebadores At3g12780GFP-F y At3g12780GFP-R; *PGK2* con At1g56190GFP-F y At1g56190GFP-R; y *PGK3* con At1g79550GFP-F y At1g79550GFP-R. Cuando se utilizó el vector pMDC83, las secuencias de cDNA amplificadas no incluían el codón de terminación, lo que mantiene la pauta abierta de lectura y permite obtener la proteína de fusión PGK-GFP.

La clonación en el plásmido pCR8®/GW/TOPO® se realizó con el kit *pCR8®/GW/TOPO® TA Cloning Kit* (Ref. K2500-20) de INVITROGEN y requiere la presencia de desoxiadeninas en los extremos de los productos resultantes de la PCR; esto se consiguió incubando dichos productos a 72°C durante 10 minutos con 1 µL (5 U/µL) de DNA polimerasa. A continuación, *E. coli* se transformó con este plásmido y se comprobó, por secuenciación, que todos los cDNAs habían sido introducidos en la orientación correcta y sin errores en la lectura. Este cDNA fue subclonado en los plásmidos pMDC43 y pMDC83 (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando la tecnología *Gateway*, la cual está basada en los sitios de recombinación att, usando la enzima recombinasa del kit *Gateway® LR Clonase® II enzyme mix* (Ref. 11791-100) de INVITROGEN. Una vez que nuestro inserto fue introducido en los plásmidos pMDC43 y pMDC83, respectivamente, se procedió a la transformación de *E. coli*, lo que permitió la obtención de un número de copias suficiente para poder la transformación en *Agrobacterium*. Los plásmidos extraídos de *E. coli* fueron secuenciados en sus zonas de recombinación para verificar que las pautas de lectura eran las correctas. A estas construcciones se les denominó *pMDC83Pro35S:PGK1-GFP* (*Pro35S:PGK1-GFP*), *pMDC83Pro35S:PGK2-GFP*

(*Pro35S:PGK2-GFP*), *pMDC83Pro35S:PGK3-GFP* (*Pro35S:PGK3-GFP*) respectivamente.

Finalmente, se continuó con el procedimiento general de obtención de líneas transgénicas descrito en el Apartado 3.4.1, teniendo en cuenta que los plásmidos *pMDC83* y el *pMDC43* también confieren resistencia a kanamicina en bacterias.

3.4.2.2. Construcciones bajo el control del promotor endógeno

Para el diseño de estas construcciones se tomaron como punto de partida las construcciones *pCAMBIA1303ProPGK:GUS* y *Pro35S:PGK-GFP*, previamente obtenidas. Las regiones promotoras fueron amplificadas del *pCAMBIA 1303* y sustituidas por el *Pro35S* en *Pro35S:PGK-GFP* mediante digestión con enzimas de restricción y ligación. En todos los casos, la enzima para amplificar las regiones promotoras fue una DNA polimerasa de alta fidelidad y bajo número de errores (*Phusion Hot Start II DNA Polymerase*, Ref. F-549S).

En la construcción *ProPGK1:PGK1-GFP* se amplificó por PCR un fragmento de 1510 pb de la región promotora de *PGK1*, presente en *pCAMBIA1303ProPGK1:GUS*, con los cebadores At3g12780PmeIProF y At3g12780PromSpeR que contienen los sitios de restricción *PmeI* y *SpeI*. En la construcción *ProPGK2:PGK2-GFP*, el tamaño del fragmento amplificado de *pCAMBIA1303ProPGK2:GUS* fue de 1464 pb con los cebadores At1g56190FProPmeI y At1g56190RevProPacI, que incluyen los sitios de restricción *PmeI* y *PacI*. Finalmente, para el diseño de *ProPGK3:PGK3-GFP* se amplificaron 1285 pb de *pCAMBIA1303ProPGK3:GUS*

con la pareja de cebadores At1g79550ProPmeIFo y At1g79550PromSpeIR que incluyen los sitios de restricción *PmeI* y *SpeI*. Los plásmidos *Pro35S:PGK1-GFP*, *Pro35S:PGK2-GFP*, y *Pro35S:PGK3-GFP* fueron digeridos con *PmeI/SpeI*, *PmeI/PacI* y *PmeI/SpeI*, respectivamente, para extraer el *Pro35S*. Los plásmidos resultantes se ligaron con el amplificado de PCR conteniendo las regiones promotoras de los genes *PGKs* previamente digeridas con las mismas enzimas de restricción. Células

competentes DH5 de *E. coli* fueron transformadas con estas construcciones y, finalmente, se extrajeron nuevamente los plásmidos para ser secuenciados e introducidos en *A. tumefaciens*, utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

3.4.3. Diseño y clonaje de microRNAs artificiales

Para el diseño de microRNAs artificiales (amiRNAs), se siguieron las instrucciones especificadas en la página web wmd3.weigelworld.org.

El procedimiento general consiste en generar pequeñas secuencias de oligonucleótidos que originan pequeños RNAs (amiRNAs) capaces de silenciar nuestro gen mediante hibridación con el RNAm.

Para el diseño de estos amiRNAs se utilizó la herramienta “oligo” disponible en la página web (wmd3.weigelworld.org). Se introdujo la secuencia del RNAm del gen que queríamos silenciar y el programa nos proporcionó cuatro secuencias de oligonucleótidos (I-IV), que fueron utilizadas para generar un amiRNA artificial dentro de un precursor endógeno miR319a por mutagénesis dirigida (Figura 3.8).

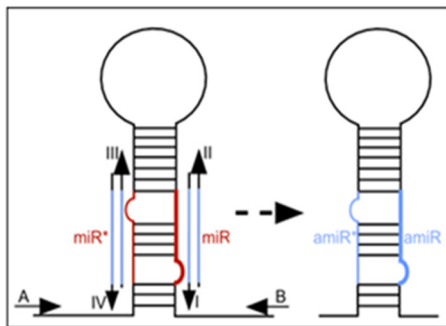


Figura 3.8. Región del plásmido pRS300 donde se localizan las zonas de unión de los cebadores A, B, I, II, III y IV.

Las secuencias de oligonucleótidos se emplearon para realizar cuatro reacciones de PCR, utilizando como molde el plásmido pRS300 (proporcionado por el Dr. Detlef Weigel del Instituto Max Planck, Tubingen), que incluía un precursor endógeno llamado miR319a. En las tres primeras reacciones se utilizó como molde el plásmido

pRS300 y la cuarta reacción tuvo como objetivo fusionar en un único producto final el resultado de las tres reacciones anteriores. La localización de los cebadores se muestra en la Figura 3.8; la pareja de cebadores usados para cada reacción se especifica en la Tabla 3.7 y las secuencias de todos los cebadores usados se pueden consultar en el Anexo (Tabla Suplementaria 1).

Tabla 3.7. Reacciones de PCR para generar un amiRNA.

Reacción	Forward Oligo	Reverse Oligo	Molde
(a)	A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS301
(c)	I	B	pRS302
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

Del mismo modo que para las construcciones bajo el control del promotor constitutivo, descritas en el Apartado 3.4.2.1, el producto final de PCR fue clonado en el plásmido pCR8®/GW/TOPO® del kit pCR8®/GW/TOPO® TA Cloning Kit (Ref. K2500-20) de INVITROGEN y subclonado en el vector de transformación pMDC83 a través de la tecnología *Gateway* [INVITROGEN *Gateway*® LR *Clonase*® II enzyme mix (Ref. 11791-100)].

Finalmente se continuó con el procedimiento general de obtención de líneas transgénicas descrito en el Apartado 3.4.1, teniendo en cuenta que el marcador de selección para el plásmido pMDC83 es kanamicina en *E. coli*.

Mediante este procedimiento se generaron dos construcciones independientes para cada uno de los genes de la *PGK*, obteniéndose en total 6 construcciones que se nombraron de la siguiente forma:

PGK1 → *pMDC83Pro35S:amiPGK1-I*, *pMDC83Pro35S:amiPGK1-J*

PGK2 → *pMDC83Pro35S:amiPGK2-G*, *pMDC83Pro35S:amiPGK2-H*

PGK3 → *pMDC83Pro35S:amiPGK3-K*, *pMDC83Pro35S:amiPGK3-L*

3.4.4. Construcción genómico de *PGK2* en pMDC99

La construcción *pMDC99ProPGK2:PGK2g* se generó para complementar el fenotipo del mutante de T-DNA SALK_016097 (*pgk2.1*).

La secuencia genómica de *PGK2*, clonada en el vector pBeloBAC-Kan, fue suministrada por el ABRC (Clon *F14G9*). En primer lugar, y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el distribuidor, se extrajo el vector de la cepa portadora (*E. coli*) y se amplificó un fragmento de *PGK2* para confirmar que la secuencia del gen de interés estaba presente. Posteriormente, se amplificaron 3718 pb de la secuencia del DNA genómico utilizando los cebadores At1g56190ForGENO, At1g56190RevGENO y con la ayuda de una DNA polimerasa de alta fidelidad y baja tasa de errores (*Phusion Hot Start II DNA Polymerase*, Ref. F-549S). Para clonar estos fragmentos, al producto de PCR resultante se le añadió 1 μ L (5 U/ μ L) de DNA polimerasa y se mantuvo 10 minutos a 72°C para la incorporación de desoxiadenucleótidos en los extremos. A continuación, se clonó este fragmento en el vector pCR8[®]/GW/TOPO[®]. El producto del *TA cloning* se empleó para transformar células competentes DH5[®] de *E. coli*. Las colonias transformantes se seleccionaron mediante *PCR colony* con cebadores específicos de nuestro inserto y en medios LB con espectinomicina (gen marcador vector TOPO); seguidamente se inocularon en 5 ml de medios LB con espectinomicina para extraer y secuenciar el vector. Además, se llevaron a cabo digestiones dobles en sitios de restricción únicos para comprobar la orientación del inserto. Una vez confirmada la secuencia y orientación, se clonó en el plásmido pMDC99 entre los sitios attR1/attR2 mediante la tecnología Gateway [INVITROGEN Gateway[®] LR Clonase[®] II enzyme mix (Ref. 11791-100)]. Finalmente, se continuó con el procedimiento general de obtención de líneas transgénicas descrito en el Apartado 3.4.1, teniendo en cuenta que la resistencia del plásmido pMDC99 es kanamicina para *E. coli*.

3.5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACIÓN

La primera referencia sobre transferencia de DNA en *E. coli* data de 1970, en un trabajo realizado por Mandel y Higa (1970) sobre la infección por bacteriófagos, concluyendo que para la transfección del virus era necesario la inducción de un estado de competencia, dependiente de la presencia de iones Ca^{2+} , a una temperatura de 0°C y un breve choque térmico entre $37\text{-}42^{\circ}\text{C}$. La presencia de iones Ca^{2+} aumentan la permeabilidad de la membrana, mientras que el posterior choque térmico a elevada temperatura facilitaría la entrada de DNA exógeno.

3.5.1. Células competentes de *E. coli*

La consecución del estado de competencia para las cepas de *E. coli* DH5 y TOP10 fue necesario para el clonaje y obtención de las diferentes construcciones génicas. Para ello, se llevó a cabo el protocolo descrito por Inoue y col. (1990) con algunas modificaciones.

Como punto de partida se tomaron $400\ \mu\text{l}$ de cultivo saturado, que fue inoculado en $200\ \text{ml}$ de medio SOB. Este cultivo se incubó entre $18\text{-}25^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar un valor de absorbancia entre $0,5\text{-}0,7$ a $600\ \text{nm}$. Alcanzado este punto, el cultivo se enfrió en hielo durante $10\ \text{min}$, para posteriormente centrifugar las células durante $10\ \text{min}$ a $5000\ \text{rpm}$ 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 $10\ \text{ml}$ de tampón de transformación (TB) frío [$20\ \text{mM}$ de PIPES ácido piperazina-N, N'-bis(2-etanosulfónico) a pH $6,7$, ajustado con KOH, $20\ \text{mM}$ de CaCl_2 , $210\ \text{mM}$ de KCl y $50\ \text{mM}$ de MnCl_2]. La mezcla se mantuvo durante $10\ \text{min}$ 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, después, con $4\ \text{ml}$ de TB frío. Finalmente, se añadieron $375\ \mu\text{l}$ 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 μ l en tubos estériles de 1,5 ml. Cada alícuota se congeló inmediatamente con N_2 líquido y se almacenó a -80°C .

Para evaluar la eficiencia de transformación de las células competentes, se transformaron varias alícuotas de 100 μ l de células con 5 μ 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 tomando como referencia los protocolos descritos por Mandel e Higa (1970) y por Inoue y col. (1990).

Se tomaron 100 μ l de células competentes de *E. coli* almacenadas a -80°C y se dejaron en hielo para su descongelación. Posteriormente, se añadieron entre 1-10 μ l del plásmido a transformar, se mezclaron mediante agitación manual y se dejaron en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se realizó un choque térmico de 42°C durante 30 segundos y posteriormente se dejó en hielo durante 5 minutos. Finalmente, se agregaron 900 μ l de medio SOC y se incubó a 37°C en agitación continua durante una hora para recuperar el metabolismo celular. Seguidamente, se tomaron alícuotas seriadas (10 μ l, 100 μ l, 300 μ l y 490 μ l) y se dispensaron sobre placas que contenía medio LB con el antibiótico de selección del plásmido portador de la construcción génica. Además, se sembraron células no transformadas en medios LB más el antibiótico de selección para evitar falsos positivos. Alternativamente, también se sembró el plásmido digerido sin ligar para tener una idea sobre la frecuencia de recircularización, la cual es importante ya que muchas de las colonias transformadas podrían crecer en medios de selección, pero no ser portadoras de nuestro inserto. Todas las placas fueron incubadas a 37°C durante al menos 12 h hasta visualizar colonias independientes.

Se tomó una muestra de varias colonias aisladas con el extremo de una punta amarilla y se realizó una “PCR colony” o PCR de colonia para determinar las colonias transformantes (Apartado 3.5.3). Las colonias positivas, se sembraron en 5 ml de medios LB con el antibiótico de selección y se incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche. Para confirmar la secuencia del inserto y orientación, los plásmidos fueron extraídos y secuenciados (Apartados 3.3.1.2 y 3.3.2.8). Sucesivamente, se hicieron glicerizados de las colonias transformantes y se guardaron a -80°C (Apartado 3.2.2.4). Finalmente, se transformó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* con el plásmido (Apartado 3.5.5), siendo esta bacteria el vehículo para facilitar la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

3.5.3. PCR de colonia (PCR colony)

Esta técnica permite la identificación de las colonias que han sido transformadas con nuestro inserto. En general, se trata de un proceso estándar de amplificación del DNA o PCR (Apartado 3.3.2.1), con la salvedad de que para este caso el DNA molde son las colonias aisladas crecidas en placas LB con los antibióticos de selección. Una adecuada selección de cebadores permite tanto la identificación de las colonias que han sido transformadas como de aquellas en las que la ligación del inserto al vector de clonación se ha hecho de la forma correcta y en la orientación adecuada. Por ello, se seleccionó un cebador específico para el plásmido y otro para el inserto. El producto de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración adecuada al tamaño del amplificado (Apartado 3.3.2.4).

3.5.4. Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la obtención de células competentes de *A. tumefaciens* se generó un cultivo saturado en 2 ml de medio LB con los antibióticos de selección para la cepa [gentamicina (25 µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml)]. A continuación, se inoculó en 100 ml de medio LB, con los mismos antibióticos, y se incubó a 28°C en agitación

constante (250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 1 a 600 nm. Las células de este cultivo se recogieron por centrifugación en frío (4000 rpm durante 10 min a 4°C). El precipitado celular resultante se resuspendió en 2 ml de una solución estéril de CaCl₂ 20 mM. Se hicieron alícuotas de 100 µl, que se congelaron rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

3.5.5. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformar la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* se utilizó una modificación del método de congelación-descongelación de Holsters y col. (1978). Para ello, se descongeló en hielo una alícuota de 100 µl de células competentes y se le añadió 5 µl del plásmido (volumen máximo de 10 µl). La mezcla se agitó suavemente con las manos y se congeló rápidamente en N₂ líquido. A continuación, se incubó a 37°C durante 5 min y, seguidamente, se añadió 1 ml de LB líquido con gentamicina y tetraciclina (antibióticos de resistencia para la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*). La suspensión transformante se incubó posteriormente a 28°C durante 4 h en agitación (250 rpm). Finalmente, se repartieron volúmenes seriados en placas con medio LB sólido suplementado con 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 a los 2 o 3 días y se verificaron mediante *PCR colony* (Apartado 3.5.3). Aquellas positivas se inocularon en 5 ml de medios 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.

3.5.6. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria parásita de dicotiledóneas que provoca una enfermedad conocida como el “tumor de la agalla” o “tumor del cuello”. En condiciones naturales, cuando una planta sufre una herida, segrega compuestos

fenólicos, como la acetosiringosina, que actúa como atrayente para *A. tumefaciens*. Es a través de estas heridas por donde se produce la infección.

Agrobacterium posee un plásmido conocido como Plásmido Ti (*Tumor induced*) que cuenta con dos regiones claramente diferenciadas. Una región denominada T-DNA, que contiene tanto los genes de biosíntesis de auxinas y citoquininas, responsables de la formación del tumor, como los genes de la síntesis de opinas, moléculas que nutren a la bacteria. La otra región es la zona de virulencia, que contiene los genes *vir*, responsables de la transferencia del T-DNA al genoma de la planta (De La Riva y col., 1998).

El mecanismo de formación del tumor consiste en la transferencia del T-DNA y su posterior integración en el genoma de la planta. Es en este momento cuando la planta se convierte en una “*esclava metabólica*”, ya que se ve obligada a sintetizar opinas que son utilizadas por *Agrobacterium* para su desarrollo. La formación del tumor, debida a un incremento en la división celular, asegura un mayor aporte de opinas. Dicho esto, podríamos decir que la ingeniería genética estaba presente en la naturaleza desde tiempos inmemorables y es ahora, desde su conocimiento, que podemos aplicarla al campo de la investigación.

Las primeras evidencias de este fenómeno se remontan a inicio del siglo XX, cuando dos investigadores estudiaron los tumores que aparecían en la zona del cuello de la margarita (Smith y Townsend, 1907). A partir de aquí, se han llevado a cabo numerosos estudios y hoy día podemos utilizar esta estrategia para incluir fragmentos de DNA exógenos en el genoma de un gran número de especies vegetales. Hasta ahora se han descrito numerosas cepas de *Agrobacterium* que provienen de la modificación del plásmido Ti original (Hellens y col., 2000). Básicamente, se elimina la zona del T-DNA (excepto los bordes), responsable de la inducción del tumor, y se sustituye por genes de resistencia a antibióticos y una región diana para enzimas de restricción o MCS (*multiple cloning site*). Así pues, la cepa de *A. tumefaciens* C58 GV3101, que además había sido transformada

previamente con el vector de interés (Apartado 3.5.5), se utilizó para transformar *A. thaliana* mediante el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998).

Como material de partida se utilizaron las colonias positivas para la *PCR colony*, obtenidas según se especifica en el Apartado 3.5.3. Las colonias se cultivaron en 3-5 ml de LB con tetraciclina, gentamicina y el antibiótico de selección de nuestro vector, y se incubaron durante una noche a 28°C. Seguidamente, alícuotas de 300 y 500 µl se inocularon, por separado, en 200 ml de medio LB con los mismos antibióticos de selección, incubándose a 28°C durante toda la noche en agitación continua hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,6-0,9 a 600nm. A continuación, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min a 4°C y el sedimento celular resultante se resuspendió en 400 ml de la solución de transformación [5% (p/v) de sacarosa, 10 mM de MgCl₂, 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, siendo retiradas transcurridas 24 h.

3.6. SELECCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana*

Las semillas (T₀) obtenidas de las plantas que habían sido transformadas se sembraron en medio MS 1/2 con 0,5% sacarosa (Apartado 3.2.1.2) y el antibiótico (s) de selección adecuado (s) para cada línea transgénica. Con el fin de inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*, el medio de selección utilizado para el cultivo de las semillas T₀ también se suplementó con cefotaxima.

Tras la siembra, las placas se mantuvieron 3 días a 4°C para favorecer y sincronizar la germinación de las semillas. Seguidamente, las placas se transfirieron a una cámara de crecimiento con temperatura y fotoperiodo controlados (Apartado 3.2.1.2) y, tras 2 semanas, se observaron plantas T₁ resistentes al antibiótico de

selección. Dado que cada una de ellas procede de un evento de transformación independiente, se consideraron líneas independientes. Cada una de las líneas independientes se trasplantó a tierra para obtener, por autofecundación, una siguiente generación T_2 . Las semillas T_2 de cada línea transgénica se sembraron nuevamente en medios de selección para estudiar su segregación.

Dado que al transformar con *A. tumefaciens* el número de copias del transgén (inserto) puede ser variable, se realizó un análisis de la segregación de la resistencia al antibiótico de la descendencia para asegurarnos que las plantas T_1 productoras de las semillas T_2 poseían una sola copia del transgén. Para ello, se seleccionaron aquellas placas que presentaban una segregación 1:4 (1/4 de plantas sensibles por cada 3/4 de plantas resistentes), obteniéndose al menos 10 líneas independientes que siguieron esta proporción. De acuerdo con las proporciones mendelianas, estas líneas T_2 eran portadoras de una sola copia del transgén. Para obtener la siguiente generación (T_3) de semillas transgénicas, de cada línea T_2 se trasplantaron a tierra entre 15-30 plántulas. Por cada línea transgénica independiente, al menos 1/3 de las trasplantadas en T_2 , deben ser 100% resistentes al antibiótico de selección y el resto volverían a segregar 1/4. Las plantas 100% resistentes fueron seleccionadas como líneas transgénicas homocigotas puras, ya que eran portadoras de una copia del transgén en los dos alelos (homocigotas para el transgén) (Figura 3.9).

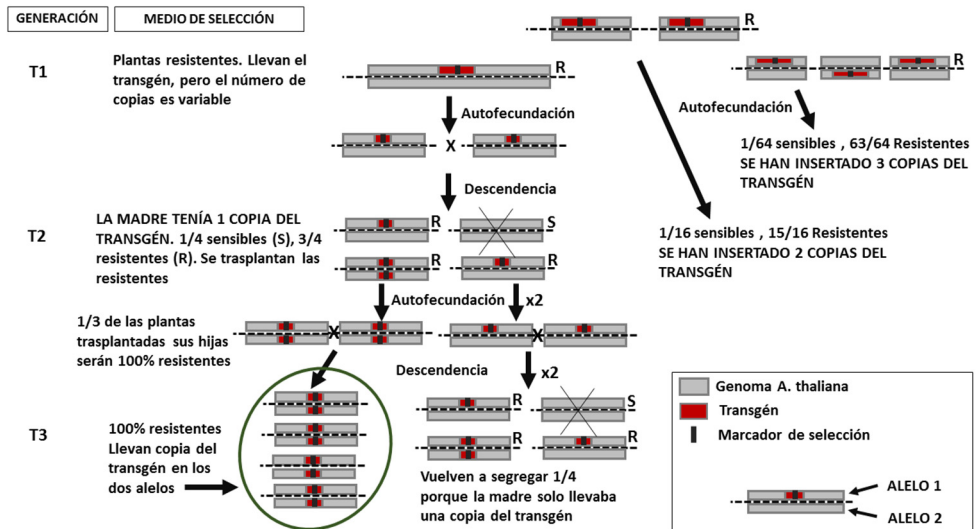


Figura 3.9. Selección de líneas transgénicas homocigotas de *A. thaliana*. Segregación según proporciones mendelianas.

3.7. CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

3.7.1. Caracterización fenotípica in vitro

Para la caracterización de las líneas mutantes simples, mutante doble, sobreexpresoras y amiRNAs de los genes *PGK1*, *PGK2* y *PGK3*, las semillas se sembraron en placas cuadradas que contenían medios MS 1/5. Una vez transcurrido el período de estratificación de las semillas, las placas se transfirieron a cámaras de crecimiento, con fotoperiodo y temperatura controlados (Apartado 3.2.1.2), donde se colocaron en posición vertical. Los parámetros utilizados en la caracterización fenotípica (peso fresco de la parte aérea y de la raíz, y longitud de las raíces) se evaluaron transcurridos 18-22 días.

Los parámetros evaluados fueron el peso fresco de la parte aérea y la longitud y peso fresco de las raíces.

3.7.2. Caracterización fenotípica en invernadero

Todas las líneas transgénicas para cada uno de los genes de la familia *PGK* fueron cultivadas, durante 25-30 días, en macetas redondas. Al cabo de este tiempo, se cuantificó el peso de la roseta.

3.8. MICROSCOPIA

3.8.1. Localización subcelular de las proteínas PGK1, PGK2, PGK3

Los ensayos de localización subcelular de las 3 isoformas fueron realizados con las líneas: *Pro35S:PGK1-GFP*, *Pro35S:GFP-PGK1*, *Pro35S:PGK2-GFP*, *Pro35S:GFP-PGK2* *Pro35S:PGK3-GFP*.

El procedimiento empleado para la localización subcelular de proteínas está basado en la visualización de la fluorescencia de la proteína GFP fusionada con la proteína de interés. La visualización se realizó con un microscopio confocal modelo LEICA TCS-SP (*Leica Microsystems Heidelberg GmbH*, Heidelberg, Alemania) a una longitud de onda de 488 nm. En general la preparación de las muestras se hizo en fresco, sin necesidad de tratamientos adicionales.

Para el marcaje de núcleos se utilizó la solución Hoechst a una concentración de 10 g/ml. A cada muestra se le añadieron 100 µl de la solución y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para su posterior observación por microscopía confocal.

Los análisis se realizaron en el Servicio de Microscopia de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (Universidad de Valencia).

3.8.2. Localización tisular de las proteínas PGK1, PGK2 y PGK3

Para determinar específicamente en qué tejidos estaban presentes cada una de las proteínas de la familia, se emplearon plantas transgénicas para las construcciones que llevaban el gen *GUS* bajo el control del promotor endógeno de los genes *PGK1*,

PGK2 y PGK3 (*pCAMBIA1303ProPGK1:GUS*, *pCAMBIA1303ProPGK2:GUS* y *pCAMBIA1303ProPGK3:GUS*, respectivamente).

Se tomaron muestras de todos los tejidos, tanto de plántulas (*seedlings*) crecidas *in vitro*, como de plantas adultas crecidas en invernadero, a las que se añadieron 1-1,5 ml de 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] y se mantuvieron en una estufa a 37°C durante 8h. Posteriormente, las muestras se lavaron con etanol al 70%, para eliminar la clorofila y restos de colorante, y se montaron en portaobjetos (Jefferson y col. 1987). El precipitado azulado insoluble (5,5'-dibromo-4,4'-dicloroíndigo), resultante de la acción de la β -glucuronidasa sobre el sustrato X-GlcA, se observó con un microscopio que tenía incorporado una cámara digital LEICA DC350 con la que se tomaron las imágenes.

Una vez determinado el patrón tisular, se utilizaron las construcciones *ProPGK1:PGK1-GFP*, *ProPGK2:PGK2-GFP*, *ProPGK3:PGK3-GFP* para una identificación más precisa de las proteínas. La visualización se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Apartado 3.8.1.

3.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN

La cuantificación del contenido en almidón de las diferentes líneas transgénicas se realizó durante una estancia de la doctoranda (Beca del Ministerio de Economía y Competitividad, Ref. de la ayuda EEBB-I-13-07046) en el *Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology* (Potsdam-Golm, Germany), Las plantas fueron crecidas en invernadero durante 30 días en condiciones de día largo (12 h luz y 8 h de oscuridad). La recogida del material se realizó coincidiendo con el contenido máximo de almidón (final del día o del período de luz). Para la extracción y cuantificación de almidón, se siguió el protocolo descrito por Smith y Zeeman (2006) y Trethewey y col (1998), con algunas modificaciones. Específicamente, se

tomaron entre 40-60 mg de material congelado y triturado con N₂ líquido. El almidón fue separado de los azúcares solubles mediante extracción etanólica al 80%. Posteriormente, fue degradado hasta glucosa con la enzima amiloglucosidasa. La cuantificación se realizó mediante ensayo enzimático en el que la HK y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) son utilizadas para degradar la glucosa a 6-fosfogluconato, con la consecuente producción de NADPH⁺ (Figura 3.10).

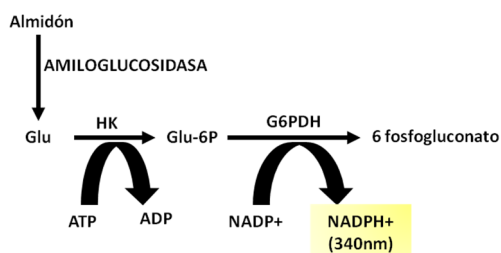


Figura 3.10. Ensayo enzimático para cuantificar el almidón. G6PDH, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; Glu, glucosa; Glu-6P, glucosa 6-fosfato; HK, hexoquinasa.

La absorbancia del NADPH⁺ fue determinada mediante un lector de microplacas (EL808 *Ultra Microplate Reader*, BIO-TEK INSTRUMENTS) a una longitud de onda de 340 nm. Para eliminar posibles restos de azúcares libres no procedentes del almidón, primero se añadió la enzima G6PDH y se realizó una primera medida. Posteriormente, se añadió la HK y se volvió a medir. La diferencia de densidades ópticas fue el valor tomado para la determinación de almidón, ya que la medida de NADPH⁺ viene determinada por la glucosa proveniente, única y exclusivamente, del almidón.

Las enzimas amiloglucosidasa, G6PDH y HK fueron suministradas por Roche.

3.10. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

3.10.1. Extracción proteica

Las muestras (hojas, raíces o plántulas frescas o congeladas a -80°C) fueron homogeneizadas con N₂ 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 µl de

tampón de extracción proteica (140 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄·7 H₂O; 2 mM KH₂PO₄; 10 mM KCl; pH 7,4) y 16,5 µl 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 ditioneitol, 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 inmediatamente para la electroforesis, se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.10.2. Electroforesis SDS-PAGE

En las electroforesis se emplearon cantidades comprendidas entre 60 y 120 µg de proteínas. Las muestras que habían sido previamente almacenadas a -80°C, fueron calentadas a 95°C durante 3 min.

Los geles de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma-Aldrich, Solución 30%, A3699) se componen de 2 partes: el gel de empaquetamiento (Tabla 3.8) y el gel de separación (Tabla 3.9).

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 3.8. Composición del gel de empaquetamiento al 4% Acrilamida/Bis-Acrilamida.

Componentes	Volumen (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 100 g/l	0,040
APS 100 g/l	0,050
TEMED	0,005

Tabla 3.9. Composición del gel de separación al 8% Acrilamida/Bis-Acrilamida.

Componentes	Volumen (ml) para 7,5 ml de gel
Agua	2,7200
Glicerol	0,7500
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,8750
Acrilamida/Bis-Acrilamida	2,0000
SDS 100 g/l	0,0750
APS 100 g/l	0,0750
TEMED	0,0075

3.10.3. 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 (*Phosphate Buffer Saline*; 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄; 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 (concentración 1:25000) 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. El anticuerpo primario utilizado fue 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*). Seguidamente, las membranas se escurrieron 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 h.

3.11. ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO

A día de hoy, se han establecido distintos métodos que permiten analizar el metaboloma con bastante precisión y sensibilidad. Estos métodos incluyen GC-MS: *gas chromatography mass spectrometry*; LC-MS: *liquid chromatography mass spectrometry*; CE-MS: *capillary electrophoresis mass spectrometry*; NMR: *nuclear magnetic resonance* (Obata y Fernie, 2012). Entre todos ellos, GC-MS permite la identificación y cuantificación de entre 100-400 metabolitos con un peso molecular comprendido entre 50-800 Da, incluyendo azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos, algunos intermediarios fosforilados y vitaminas, que abarcan las principales rutas del metabolismo primario. Todo el procedimiento, desde el muestreo hasta la cuantificación de los metabolitos, queda recogido en los trabajos de Lisec y col. (2006) y Luedemann y col. (2008).

La determinación de metabolitos se realizó en colaboración con el laboratorio del doctor Alisdair Fernie (*Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Germany*) gracias a la concesión de una beca para estancias breves del Ministerio de Economía y Competitividad (Ref. de la ayuda EEBB-I-13-07046).

3.11.1. Preparación de las muestras

Las plantas fueron crecidas en condiciones estándar *in vitro* durante 21 días o bien en invernadero durante 30 días (Apartado 3.2.1). Después de su recolección, el material fue congelado inmediatamente con N₂ líquido para detener el metabolismo. Posteriormente, las muestras se trituraron en N₂ con ayuda de un mortero y se pesaron alrededor de 50 mg por muestra en tubos con tapón de rosca, anotando el peso de cada una para su posterior utilización en la realización de los cálculos. De cada línea transgénica y sus controles se hicieron 6 réplicas.

A continuación, se llevó a cabo la extracción de metabolitos y su derivatización (Figura 3.11).

3.11.2. Extracción de metabolitos

Para disminuir lo máximo posible la variabilidad, las muestras se distribuyeron por réplicas; es decir, la primera réplica de todas las muestras, seguida de la segunda réplica y así sucesivamente.

Previo a la extracción de los metabolitos, se llevó a cabo una inactivación enzimática con metanol, para detener todos los procesos biológicos y se añadió un control interno de la fase polar (ribitol) que no estuviese presente en las muestras. La finalidad de este procedimiento fue reducir los errores experimentales durante el procesado de las muestras. Específicamente, se hacía una premezcla que contenía 0,46 ml/muestra de metanol (Merck, cat. Nº 1.06007.1000) y 20 µl/muestra de ribitol (0,2 mg/ml; Sigma, cat. no. 488-81-3) y se añadían 480 µl de la mezcla a cada muestra (congelada). Seguidamente, se agitaban vigorosamente para una correcta homogenización y se incubaban durante 15 min a 70°C en agitación (650 rpm). Durante este tiempo, cada dos minutos, se abrían los tubos para eliminar el exceso de presión. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante transferido a un nuevo tubo Eppendorf®. A cada tubo se le añadieron 0,25 ml de cloroformo (Merck, cat. Nº 1.02444.1000) y 0,5 ml de agua Milli-Q® y se agito en vórtex durante 15 s. Se volvieron a centrifugar durante 15 min a 4000 rpm y se tomaron 150 µl de la fase superior (fase polar), que se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf®. Las muestras se secaron en un concentrador de vacío a temperatura ambiente y se rellenaron con N₂ gaseoso. El N₂ gaseoso establece un ambiente reductor en el interior del tubo, evitando así los procesos de oxidación que pueden alterar la composición metabólica.

3.11.3. Derivatización

La derivatización de los metabolitos es un trámite necesario para su detección mediante GC-MS, ya que se reduce su polaridad y facilita su separación (Halket y col. 2005). Esto se consigue mediante un proceso de metoxiaminación, que simplifica la estructura conformacional de los metabolitos, y una trimetilsililación que les otorga la capacidad de volatilizarse. En primer lugar, 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)]. Seguidamente, se añadieron 20 µl de esta solución a las muestras, que se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación continua (900 rpm). Durante la incubación, se preparó una mezcla de N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA; Macherey-Nagel, cat. Nº 24589-78-4) con 20 µl/ml de FAMEs (*Fatty acid methyl esters*). Transcurridas las 2 h de agitación, se añadieron 35 µl de dicha mezcla a las muestras, que se volvieron a incubar a 37°C durante 30 min con agitación continua. La solución de FAMEs, constituida por 13 metil ésteres (C8:0, C9:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0, C30:0), se utilizó para calibrar el tiempo de retención en el cromatograma (Apartado 3.11.5). 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).

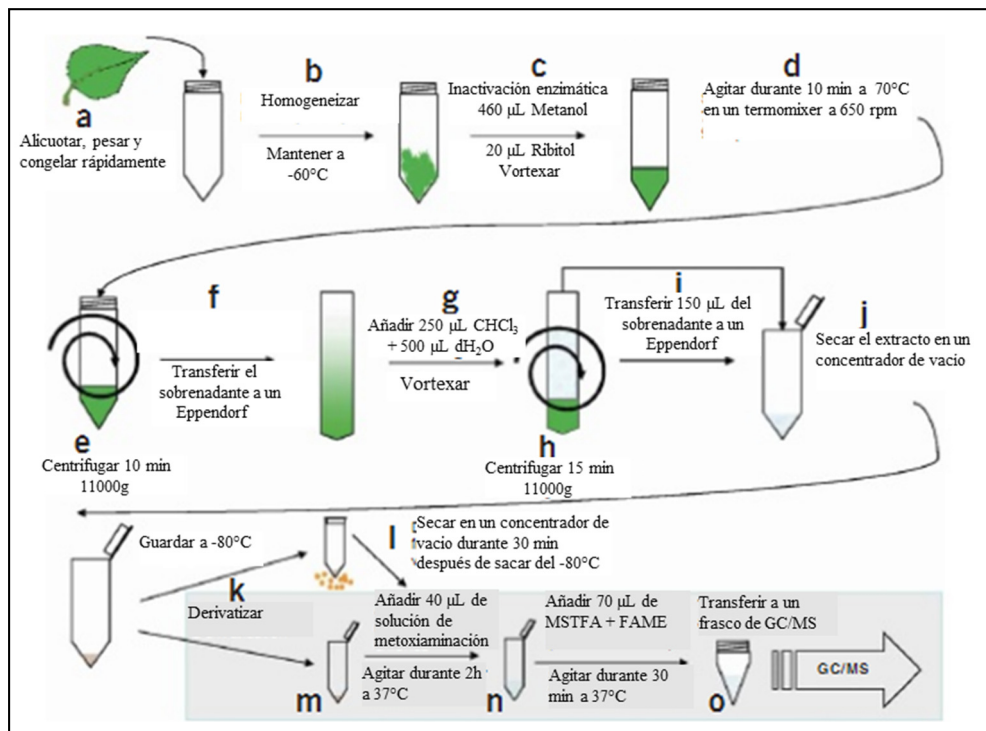


Figura 3.11. Protocolo modificado para la preparación de las muestras. Extracción de los metabolitos (a-j) y la derivatización (k-o). MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos. Esquema modificado de Lisec y col. (2006).

3.11.4. GC-TOF-MS

En primer lugar, los metabolitos fueron separados mediante cromatografía de gases (Cromatógrafo de gases, 6890N, Agilent). La separación de cada metabolito es dependiente de su volatilidad y de su interacción con el interior de la columna ($30\ \mu\text{m}$) del cromatógrafo. Seguidamente, tiene lugar una fragmentación de los analitos mediante impacto electrónico. El patrón de fragmentación es específico para cada metabolito, lo cual facilita la anotación (asignación) de los picos en el cromatograma (Apartado 3.11.5).

Finalmente, para la detección se realizó una espectrometría de masas (*TOF-MS*, *Pegasus III time-of-flight mass spectrometer*), donde la separación ocurre según el ratio masa/carga.

3.11.5. Análisis de los cromatogramas

La evaluación de los cromatogramas se realizó con el programa *TagFinder*, basado en el sistema de programación *Java™*.

Debido al gran número de metabolitos detectados, los cromatogramas obtenidos fueron muy complejos. Por ello, previo a su análisis, se realizó una deconvolución (separar distintas áreas dentro de un mismo pico) con el programa *Chroma-TOF* (Versión 1, 2002, *Pegasus driver 1.61*). De esta manera, se obtuvieron archivos *.txt* que fueron importados al programa *TagFinder*. El siguiente paso fue ajustar (calibrar) los tiempos de retención relativos a los tiempos reales de los componentes estándar (FAMES) que se incluyeron en las muestras.

Así, se obtuvieron los tiempos de retención para cada metabolito, tomando como referencia los tiempos de retención de los componentes estándar (FAMES). A continuación, se creó un archivo con el nombre real de cada muestra, el número de réplica y las condiciones del experimento para que el programa asignara cada número con su muestra. Finalmente, se ejecutó el programa y se obtuvo un listado de metabolitos candidatos y sus correspondientes espectros de masas.

Para asignar cada pico a un metabolito, se utilizó como referencia la base de datos de *Golm* (*Golm metabolic database*, GMD) y posteriormente se evaluaron en función de diferentes parámetros: tiempo de salida, desviación de tiempo, tiempo esperado y su semejanza con el espectro del estándar. Cuando fue necesario, se utilizó el programa *Pegasus III* para la visualización de los cromatogramas. Una vez evaluados y seleccionados los metabolitos, éstos se exportaron a un archivo *.txt* para su evaluación.

3.11.6. Tratamiento de datos

El archivo de texto generado por el programa *TagFinder* fue exportado a una hoja de cálculo (*Microsoft Office Excell*). Para su cuantificación, se anotaron las intensidades correspondientes al fragmento con la masa específica del metabolito en cuestión. Finalmente, cada valor fue normalizado con respecto al control interno (ribitol) y el peso de la muestra.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante comparación de medias según el estadístico *t-Student* (Apartado 3.14).

Para el análisis de los componentes principales (PCA: *Principal Component Analysis*) se utilizó el programa *Multibase 2014*.

La representación gráfica mediante *Heat maps* se realizó con el programa *MeV* (*Multiexperiment Viewer*) disponible en la web <http://www.tm4.org/mev/>.

3.12. PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS

Para la determinación de los valores instantáneos de fijación neta de CO₂ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$), conductividad estomática ($\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$), tasa de transpiración ($\text{mmol}/\text{m}^2 \text{ s}$) y concentración subestomática de CO₂ ($\mu\text{mol}/\text{mol}$), se utilizó un analizador portátil de intercambio de gases y fluorescencia de las clorofilas LI-6400 (LICOR Biosciences, Lincoln, USA). Las medidas se realizaron en condiciones de luz saturante ($800 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$), a 400 ppm de CO₂ y una humedad relativa del 60-70%. Simultáneamente, se determinó la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (PhiPS2) empleando el fluorímetro. Las plantas se mantuvieron con una intensidad de luz de 700-800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ mediante una lámpara de luces LED durante 45 minutos antes de las determinaciones.

Las medidas de eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) en hojas adaptadas a oscuridad durante 30 min se realizaron empleando un fluorímetro portátil (*MINI PAM*, *Walz Effeltrich, Germany*).

En cada uno de los genotipos, los valores para cada parámetro analizado son media de 8 a 10 determinaciones en plantas diferentes.

3.13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en la caracterización genética y fenotípica se analizaron utilizando la media aritmética, desviación típica, y error estándar, 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 test conocidos como Chi-cuadrado y *t-Student* (Zar 1999 y 2010).

Para los análisis de segregación se utilizó el estadístico Chi-cuadrado a un nivel de significación de 0,05 (p-valor 0,05).

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.

4. RESULTADOS

4.1. FILOGÉNESIS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN *IN SILICO* DE LOS GENES DE LA FAMILIA *PGK*

4.1.1. Alineamiento y árbol filogenético

Partiendo de estudios previos, en los que se habían identificado dos genes que codifican isoformas de la *PGK* en trigo, espinaca y tabaco (Köpke-Secundo y col., 1990; Jones y col., 1995; Bringloe y col., 1996), se realizó un rastreo en la base de datos del TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) para buscar proteínas homólogas en Arabidopsis. Logramos identificar tres genes, anotados como At3g12780, At1g56190 y At1g79550, que fueron denominados *PGK1*, *PGK2* y *PGK3*, respectivamente. Aunque inicialmente utilizamos otra nomenclatura, optamos por utilizar la indicada, como se describe en el Apartado 3.1.1.

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas mostró un elevado grado de conservación entre las tres isoformas (Figura 4.1), presentando *PGK2* y *PGK3* un porcentaje de identidad del 91% y 84% respectivamente con respecto a *PGK1*. El porcentaje de identidad entre *PGK2* y *PGK3* fue del 85%.

El árbol filogenético confirmó la estrecha relación evolutiva entre las isoformas *PGK1* y *PGK2* (Figura 4.2). El rastreo de las secuencias aminoacídicas para la búsqueda de señales de localización plastidial, mediante la herramienta ChloroP, confirmó que ambas proteínas incluían el péptido señal en posición N-terminal (Emanuelsson y col., 1999). Así, la hipótesis de partida era que los genes *PGK1* y *PGK2* codificaban para dos isoformas plastidiales, mientras que el gen *PGK3* codificaba para la isoforma citosólica.

RESULTADOS

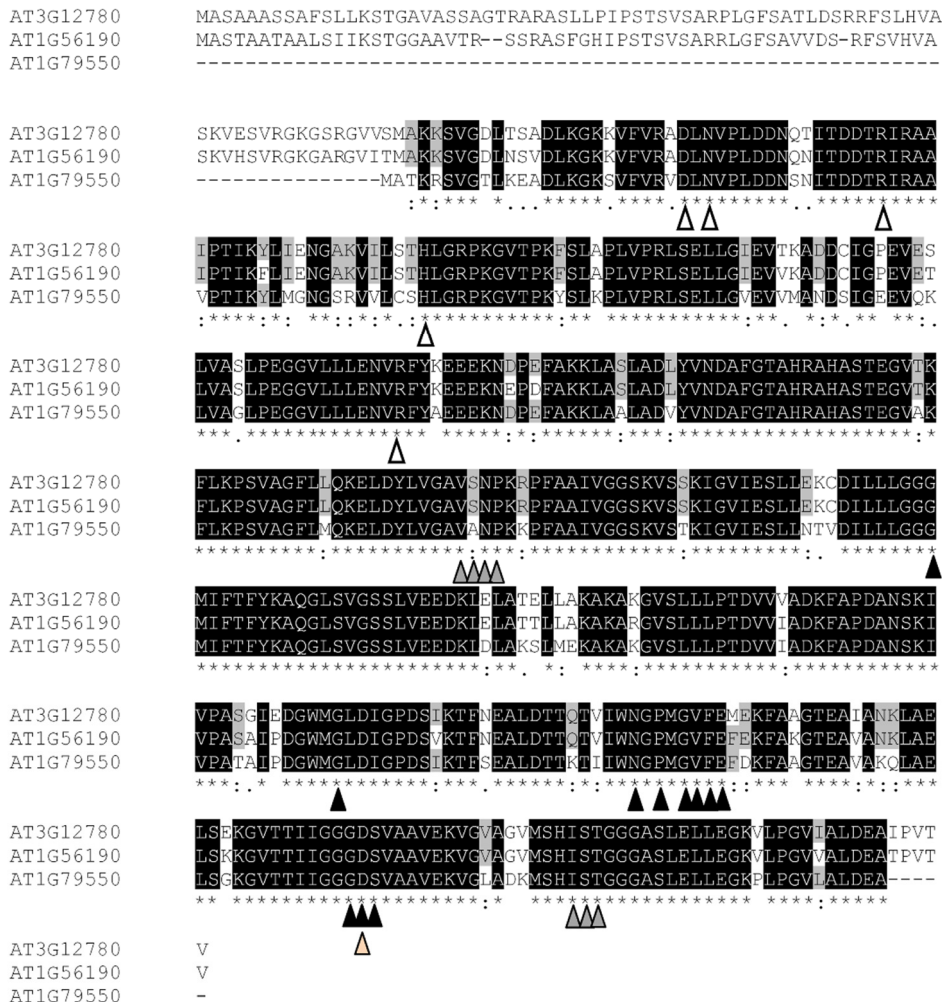


Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas PGK1 (At3g12780), PGK2 (At1g56190) y PGK3 (At1g79550) de *Arabidopsis thaliana* utilizando el programa ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; McWilliam y col. (2013). Los asteriscos denotan aminoácidos iguales entre las secuencias; las zonas conservadas se señalan con dos puntos y la ausencia de marca indica las zonas poco conservadas. Los residuos relacionados con la unión al sustrato se han marcado con un triángulo blanco, la zona de bisagra con triángulos grises, las zonas de unión de ADP con triángulos negros y, finalmente, un triángulo rosa para el sitio catalítico.

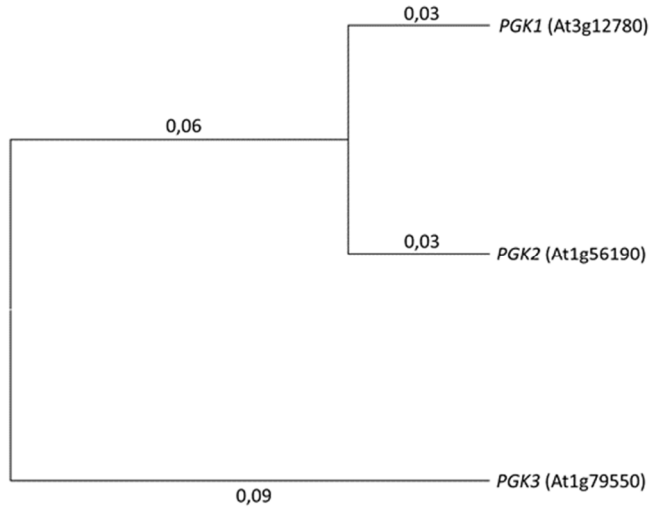


Figura 4.2. Árbol filogenético de las proteínas PGK mediante el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987). Las longitudes de cada rama están dibujadas a escala, siendo proporcional a la distancia evolutiva, la cual se determinó usando el método de corrección de Poisson (Zuckerkanndl y Pauling, 1965). Las unidades vienen representadas por el número de sustituciones de aminoácidos por sitio en tanto por uno. El análisis fue llevado a cabo mediante la herramienta Mega6 (Tamura y col., 2013).

4.1.2. Análisis *in silico* de los patrones de expresión de los genes de la familia *PGK*

Los análisis de expresión *in silico* de los genes de la familia *PGK* se realizaron a partir de la información existente en bases de datos de *microarrays*. Se utilizó la herramienta *eFP Browser* (*electronic Fluorescent Pictograph*) que utiliza datos originados a partir del consorcio de *AtGenExpress* (*Gene Expression Atlas of Arabidopsis*) y otros laboratorios colaboradores, para generar una figura que representa, de una forma muy intuitiva, la información de la base de datos de *microarrays*. Los valores absolutos de expresión para cada uno de los órganos o estadios del desarrollo son suministrados por el consorcio *AtGenExpress* en colaboración con *Affimetrix ATH1* (Winter y col., 2007; Schmid y col., 2005; Nakabayashi y col., 2005).

Los análisis mostraron una mayor expresión del gen *PGK1* a nivel de los cotiledones y prácticamente en todas las hojas de la roseta, excepto en hojas senescentes (Figura 4.3). Se observaron niveles de expresión intermedios en los primeros estadios del desarrollo tanto de silicuas y semillas (estadios 3 a 5) como de flores (estadios 10 y 11). Los valores más bajos de expresión se observaron en semillas, raíces (de plántula y planta adulta) y polen. Los valores de expresión absolutos aparecen recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 2).

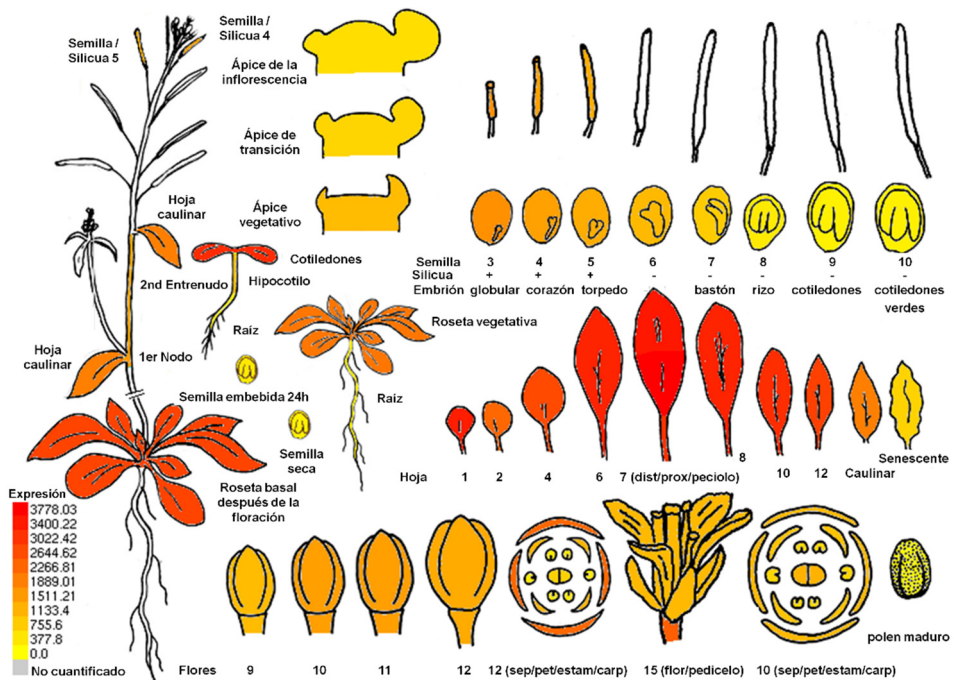


Figura 4.3. Patrón de expresión tisular del gen *PGK1* (*At3g12780*) de *A. thaliana* en diferentes estadios de desarrollo mediante el uso de la herramienta informática *eFP Browser* (Winter y col., 2007; Schmid y col., 2005). Los valores absolutos quedan recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 2).

Para el gen *PGK2*, el valor máximo de expresión tiene lugar en el pedicelo de la flor en estadio 15 (Figura 4.4). También hay niveles de expresión muy elevados en el estadio 12 de la flor y en la sexta, séptima (mitad proximal), octava, décima y doceava hoja de la roseta, además de los cotiledones y las dos primeras hojas de la roseta. En cuanto a las semillas y silicuas, la mayor expresión se limitó a los primeros estadios del desarrollo (estadios 3, 4 y 5). Los valores más bajos de expresión se produjeron en los últimos estadios del desarrollo de la semilla (estadios 8, 9 y 10) y polen maduro. Los valores de expresión absolutos aparecen recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 3).

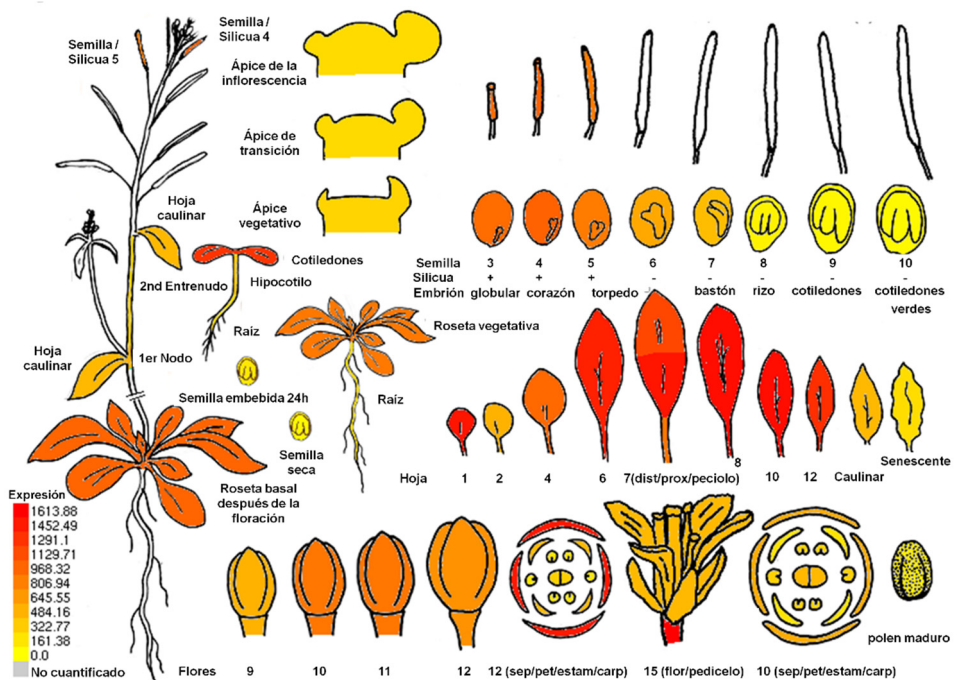


Figura 4.4. Patrón de expresión tisular del gen *PGK2* (*At1g56190*) de *A. thaliana* en diferentes estadios de desarrollo mediante el uso de la herramienta informática *eFP Browser* (Winter y col., 2007; Schmid y col., 2005). Los valores absolutos quedan recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 3).

Por último, el gen *PGK3* mostró un patrón más homogéneo de expresión en los diferentes tejidos u órganos. Los valores de expresión absolutos más altos se observaron en raíces (tanto en plántula como en individuos adultos), en el estadio 5 de la semilla y en los pétalos del estadio 15 de la flor (Figura 4.5). Los niveles de expresión más bajos se observaron en el polen maduro, hojas caulinares y últimos estadios del desarrollo de la semilla (estadios 8, 9 y 10). Los valores de expresión absolutos aparecen recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 4).

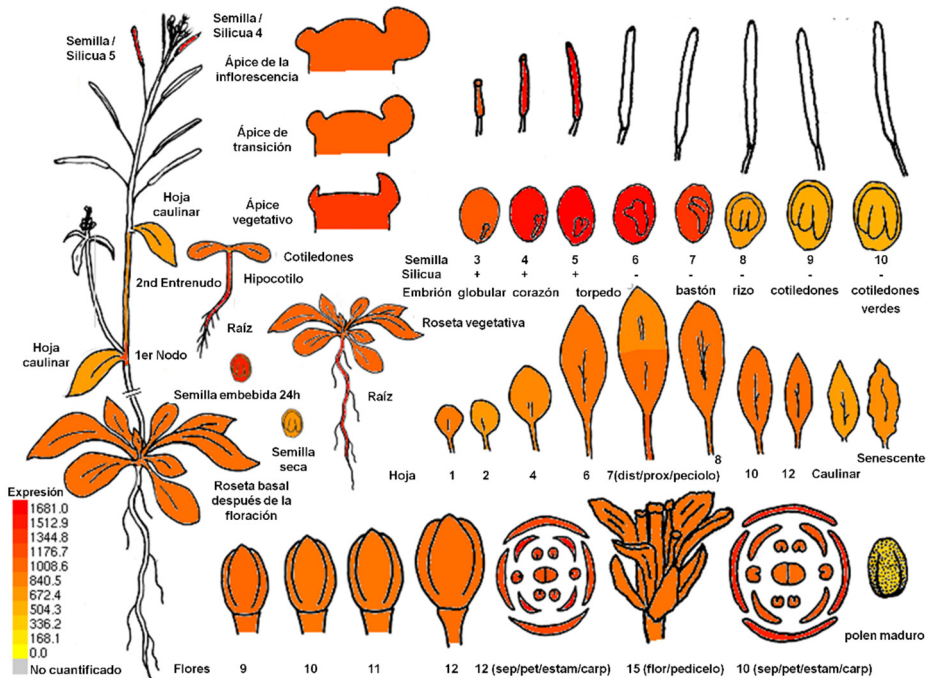


Figura 4.5. Patrón de expresión tisular del gen *PGK3* (*At1g79550*) de *A. thaliana* en diferentes estadios de desarrollo mediante el uso de la herramienta informática *eFP Browser* (Winter y col., 2007; Schmid y col., 2005). Los valores absolutos quedan recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 4).

4.2. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN *IN VIVO* DE LOS GENES DE LA FAMILIA *PGK*

4.2.1. Patrón de expresión tisular mediante la reacción histoquímica GUS

Para la determinación del patrón de expresión tisular de las proteínas de la familia *PGK* se tomaron como referencia tanto plántulas de 15-20 días de edad, crecidas en condiciones *in vitro* estándar (MS 1/5, Apartado 3.2.1.2) como plantas de 30-35 días de edad crecidas en invernadero. De ese modo, fue posible determinar tanto el patrón de expresión en los primeros estadios de desarrollo (cotiledones y radícula) como el de los tejidos vegetativos (tallo, raíces y hojas) y reproductivos (flor, semilla y embrión) en estadio adulto.

Los análisis de expresión de *PGK1* en plántulas revelaron una fuerte expresión en cotiledones y hojas. En los cotiledones, la expresión fue más intensa en las nervaduras, mientras que en las hojas lo fue en los estomas y zonas adyacentes a los mismos. En raíces no se apreció expresión de *PGK1*, excepto en la zona de unión al hipocotilo (Figura 4.6.A-F). En plantas adultas, *PGK1* se expresó de forma generalizada en las hojas, tanto las de la roseta como las caulinares; en las primeras, el nivel de expresión fue más intenso en estomas y zonas adyacentes, mientras que en las segundas la expresión fue máxima en las nervaduras. En flores se observó expresión en los pétalos y sépalos. A nivel de las semillas, no se apreció expresión, pero sí en la vaina de las silicuas. Al igual que en las de las plántulas, las raíces adultas no mostraron actividad GUS (Figura 4.6.G-L).

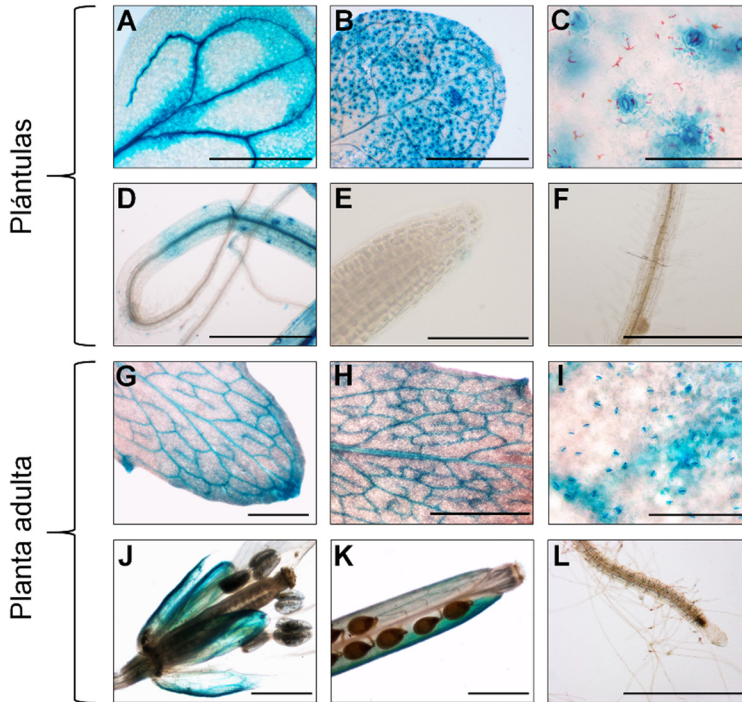


Figura 4.6. Ensayo de expresión *GUS* bajo el control del promotor del gen *PGK1* en plántulas de 15-20 días y en plantas adultas de 30-35 días de edad de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran imágenes de cotiledones (A), hojas (B,C), zona de unión de la raíz y la parte aérea (D), raíces (E,F), hojas caulinares (G,H), hojas de roseta (I), flores (J), silicuas (K) y raíces (L). Escalas = 1 mm (A, B, D, G, K, J), 0,5 mm (F, L), 0,2 mm (H, J) y 0,1 mm (C, E).

En plántulas, el nivel de expresión del gen *PGK2* fue máximo en los cotiledones, especialmente en las nervaduras, mientras que en las hojas, la expresión fue mayor en los bordes y nervaduras; en raíces, el gen solo se expresó a nivel de los haces vasculares (Figura 4.7.A-D). En las plantas adultas, la expresión del gen *PGK2* fue máxima en hojas de la roseta, sobre todo en los bordes foliares y en la zona de formación de los tricomas. En flores, se observó una fuerte expresión a nivel de los pedicelos, pétalos, sépalos y estigma. En silicuas maduras la expresión se limitó a la vaina. Finalmente, en raíces la expresión de *PGK2* sólo se observó en los haces vasculares (al igual que en plántulas) y en el ápice radicular, especialmente en la caliptra (Figura 4.7.E-J).

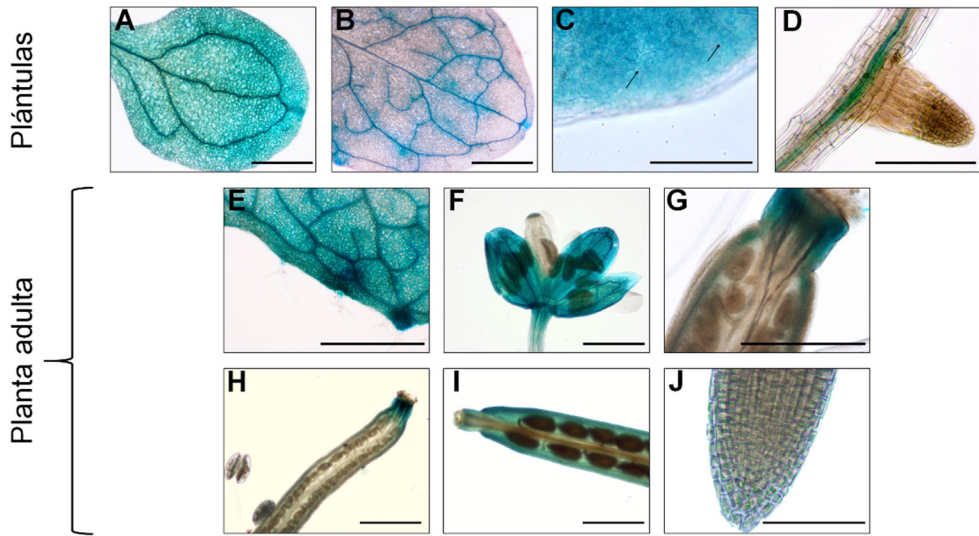


Figura 4.7. Ensayo de expresión *GUS* bajo el control del promotor del gen *PGK2* en plántulas de 15-20 días y en plantas adultas de 30-35 días de edad de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran imágenes de cotiledones (A), hojas (B), estomas de la hoja indicados por flechas (C), raíces (D), hoja roseta (E), flores (F), estigma (G), anteras y estigma (H), silicuas (I) y raíces (J). Escalas = 1 mm (A, B, E, F, H, I), 0,5 mm (G), 0,2 mm (D) y 0,1 mm (C, J).

El gen *PGK3* mostró una expresión generalizada en todos los órganos y/o tejidos, tanto en plántulas como en individuos adultos. En plántulas, el nivel de expresión fue más acentuado en las nervaduras de cotiledones y hojas, así como en los bordes de estas últimas. A diferencia de las otras dos isoformas de la familia, se observó una expresión generalizada del gen *PGK3* en la raíz (Figura 4.8.A-C). En plantas adultas, el gen *PGK3* se expresó en todas las hojas de la roseta, con las zonas de máxima expresión localizadas en los bordes foliares. También se observó expresión generalizada de *PGK3* en los órganos florales (pétalos, sépalos, estambres, y carpelos) granos de polen y vaina de las silicuas. Por último, la actividad *GUS* también fue muy patente tanto en raíces primarias como secundarias (Figura 4.8.D-I).

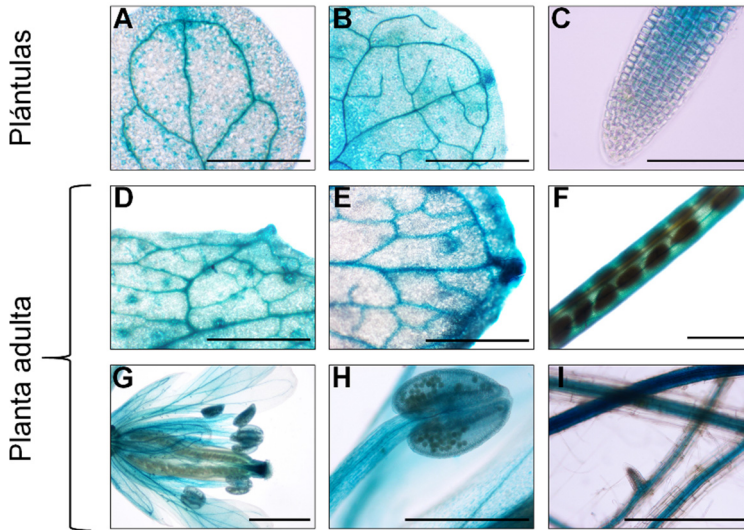


Figura 4.8. Ensayo de expresión *GUS* bajo el control del promotor del gen *PGK3* en plántulas de 15-20 días y planta adulta de 30-35 días de edad de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran imágenes de cotiledones (A), hojas (B), raíces (C), hojas de la roseta (D,E), silicuas (F), flores (G), anteras (H) y raíces (I). Escalas = 1 mm (A, B, D, E, F, G), 0,5 mm (H, I) y 0,1 mm (C).

Todos estos resultados confirman los estudios *in silico* previamente descritos en el Apartado 4.1.2.

4.2.2. Análisis cuantitativo de la expresión en diferentes órganos

La determinación de la expresión relativa de los genes de la familia *PGK* se realizó cuantificando los niveles de transcritos (RNAm) mediante RT-PCR cuantitativa. Al igual que para los ensayos GUS, las determinaciones se realizaron en las partes aéreas y raíces de plántulas (15-20 días de edad), cultivadas *in vitro* (Figura 4.9), como en flores, tallos, hojas, raíces y silicuas de plantas adultas (30-35 días de edad), crecidas en invernadero (Figura 4.10).

Los análisis mediante RT-PCR cuantitativa realizados en plántulas mostraron que los genes *PGK1* y *PGK2* se expresan, fundamentalmente, en la parte aérea, mientras que *PGK3* se expresa principalmente en raíces. Además, los valores de expresión en raíces son prácticamente nulos para *PGK1*, mientras que para *PGK2* sólo representan un 0,3 respecto a los obtenidos en la parte aérea (valor 1).

En plantas adultas se confirmó que *PGK1* se expresa fundamentalmente en hojas y flores, confirmándose, de nuevo, valores muy bajos de expresión en raíces. El gen *PGK2* se expresó mayoritariamente en hojas, flores y silicuas; también se observó expresión en las raíces, aunque con valores más bajos con respecto al tejido control (tallo). El gen *PGK3* presentó el patrón de expresión más homogéneo de las tres isoformas en todos los órganos y/o tejidos estudiados.

Los resultados del análisis cuantitativo confirmaron los obtenidos tanto en los análisis *in silico* como en los experimentos realizados mediante la reacción histoquímica GUS (Apartados 4.1.2 y 4.2.1).

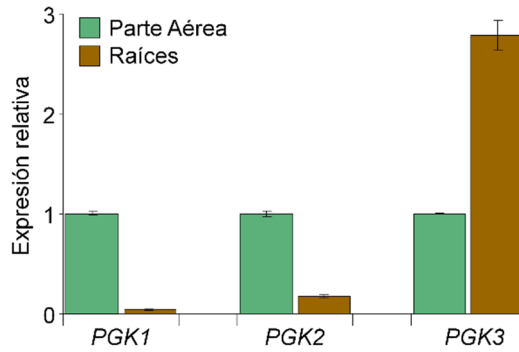


Figura 4.9. Valores de expresión relativa de los genes de las PGKs en parte aérea y raíces de plántulas de 15-20 días crecidas en condiciones *in vitro*. Para cada gen fue tomado como referencia (valor 1) los valores de expresión de las partes aéreas. Se representa la media \pm SE; n = 3 réplicas biológicas independientes.

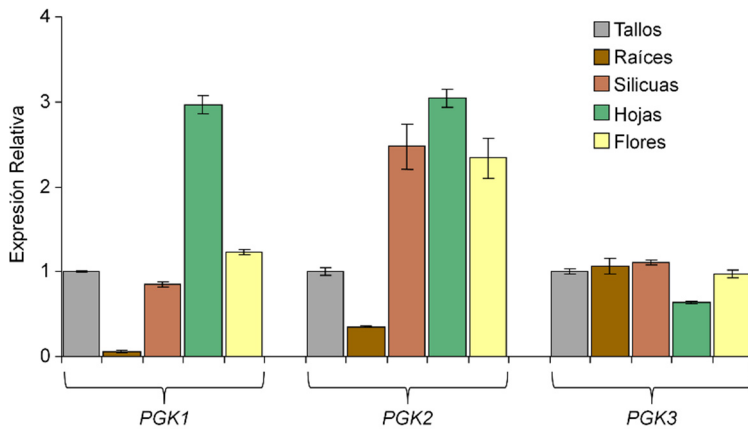


Figura 4.10. Valores de expresión relativa de los genes de las PGKs en diferentes órganos y/o tejidos de plantas de 30-35 días crecidas en invernadero. Los valores de expresión relativa para cada gen fueron normalizados al tallo (valor 1). Se representa la media \pm SE; n = 3 réplicas biológicas independientes.

4.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y TISULAR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA PGK

Para el estudio de localización subcelular de las proteínas PGKs se utilizaron plantas transgénicas T₃ que expresaban una construcción en la que se habían fusionado los cDNAs de los genes *PGK1*, *PGK2* o *PGK3* con la proteína GFP en los plásmidos pMDC43 y pMDC83. Teniendo en cuenta que la hipótesis de partida era la posible localización plastidial de las proteínas PGK1 y PGK2 (Apartado 4.1.1.), las construcciones de referencia para el estudio fueron las que llevaban la proteína GFP en posición C-terminal (*Pro35S:PGK1-GFP*, *Pro35S:PGK2-GFP*, *Pro35S:PGK3-GFP*), ya que si la proteína GFP se localizaba en posición N-terminal (*Pro35S:GFP-PGK1* y *Pro35S:GFP-PGK2*) no era adecuada para proteínas de localización plastidial. Aunque los dos tipos de construcción se utilizaron para los análisis de localización subcelular, en esta tesis doctoral sólo se presentan los resultados correspondientes a las construcciones del plásmido pMDC83 (*Pro35S:PGK-GFP*).

Las imágenes fueron tomadas mediante microscopia confocal. En primer lugar, se evaluó la fluorescencia emitida por la proteína GFP en las partes aéreas y raíces de plantas T₃ transgénicas que expresaban sólo la proteína GFP bajo el control del *Pro35S*. A continuación, se analizaron los patrones de expresión de las proteínas PGKs.

Los resultados de los ensayos de fluorescencia de las proteínas PGK1-GFP y PGK2-GFP mostraron total coincidencia entre la fluorescencia emitida por la GFP y la autofluorescencia de las clorofilas de los cloroplastos de células del mesófilo y células guarda de la epidermis (Figura 4.11, Figura 4.12). Además, en ambos casos, también se localizó la proteína GFP en los cromoplastos de las raíces.

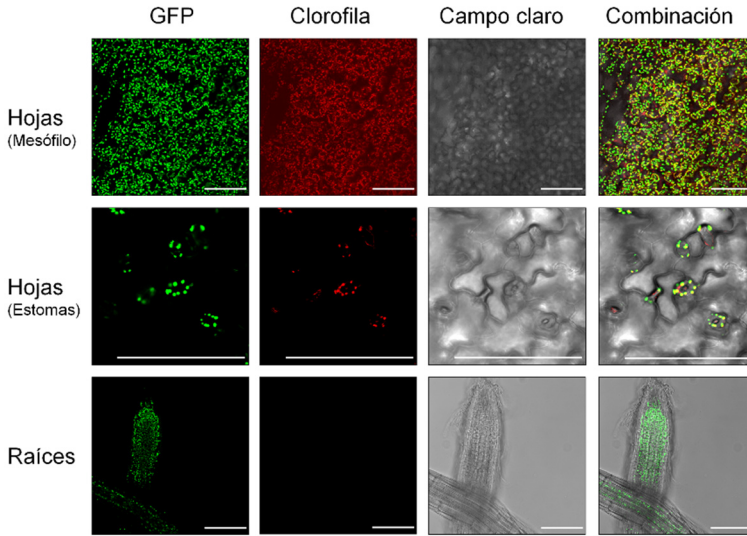


Figura 4.11. Localización subcelular de la proteína PGK1 mediante el análisis de fluorescencia de la proteína GFP en la construcción *Pro35S:PGK1-GFP*. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. Escala = 100 μ m.

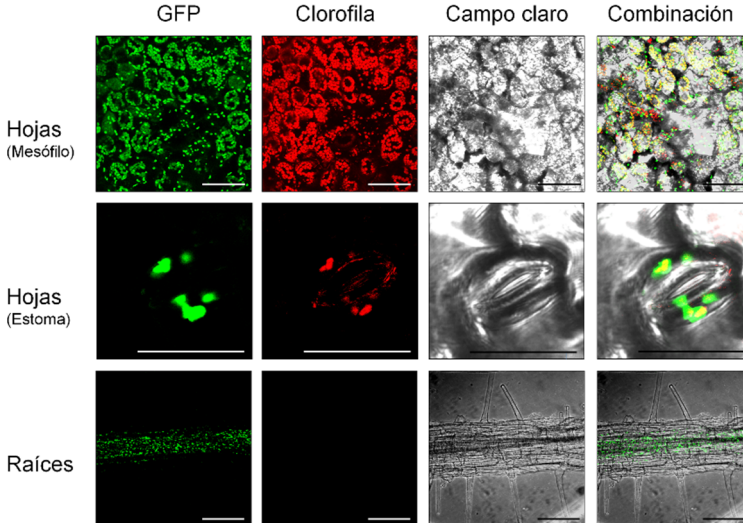


Figura 4.12. Localización subcelular de la proteína PGK2 mediante el análisis de fluorescencia de la proteína GFP en la construcción *Pro35S:PGK2-GFP*. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. Escala = 100 μ m (mesófilo y raíces) y 25 μ m en estomas.

Los análisis de fluorescencia para la proteína PGK3-GFP mostraron un patrón característico de localización citoplasmática, tanto en células epidérmicas de las hojas como en las células radiculares (Figura 4.13.A). Asimismo, se observó la presencia de puntos localizados en los extremos celulares, que se atribuyeron a una posible localización nuclear. Por ello, y para corroborar esta idea, se realizó un experimento complementario de marcaje de núcleos mediante la tinción Hoechst. Una vez marcados los núcleos en las muestras, se realizó una nueva observación mediante microscopía confocal y se co-localizó la señal GFP con el color azul emitido por el colorante Hoescht en los núcleos de células epidérmicas de raíz (Figura 4.13.B). Así, se llegó a la conclusión de que PGK3 se localiza tanto en el citosol como en núcleos.

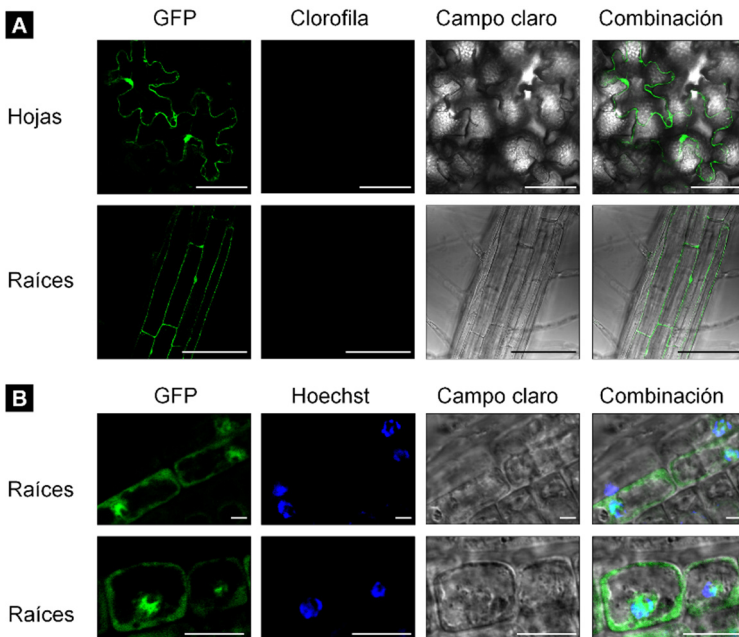


Figura 4.13. Localización subcelular de la proteína PGK3 en la construcción *Pro35S:PGK3-GFP*. (A) Análisis de fluorescencia de la proteína GFP. (B) Análisis de fluorescencia de la proteína GFP en núcleos marcados mediante Tinción Hoechst. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. Escalas = 100 μm (A), 10 μm (B).

Determinado el patrón de expresión subcelular, se consideró importante profundizar en el estudio de la expresión a nivel tisular. Para ello, se utilizaron plantas T₃ que expresaban los cDNAs de los genes de la familia *PGK* fusionados al gen *GFP*, bajo el control del promotor endógeno (*ProPGK1:PGK1-GFP*, *ProPGK2:PGK2-GFP*, *ProPGK3:PGK3-GFP*). Nuevamente se evaluó la fluorescencia de la proteína GFP mediante microscopía confocal.

Los resultados obtenidos demostraron que PGK1 y PGK2 se expresan en los cloroplastos, tanto de células del mesófilo (Figura 4.14.A) como en los de células guarda de la epidermis (datos no mostrados en la figura), lo que corrobora los resultados obtenidos mediante la tinción histoquímica GUS (Apartado 4.2.1. Figura 4.6.C, I; Figura 4.7.C).

En raíces, PGK2 se localizó en los cromoplastos, a lo largo de todo el haz vascular, aunque la señal GFP fue más intensa en el ápice radicular (Figura 4.14.B). PGK1 también se localizó a nivel del haz vascular de la raíz, pero la señal fue muy baja, indicando que la proteína estaría prácticamente ausente en las raíces. Finalmente, la proteína PGK3 se localizó en citoplasma y núcleo, tanto en parte aérea como en raíz (Ver también Figura 4.14.B).

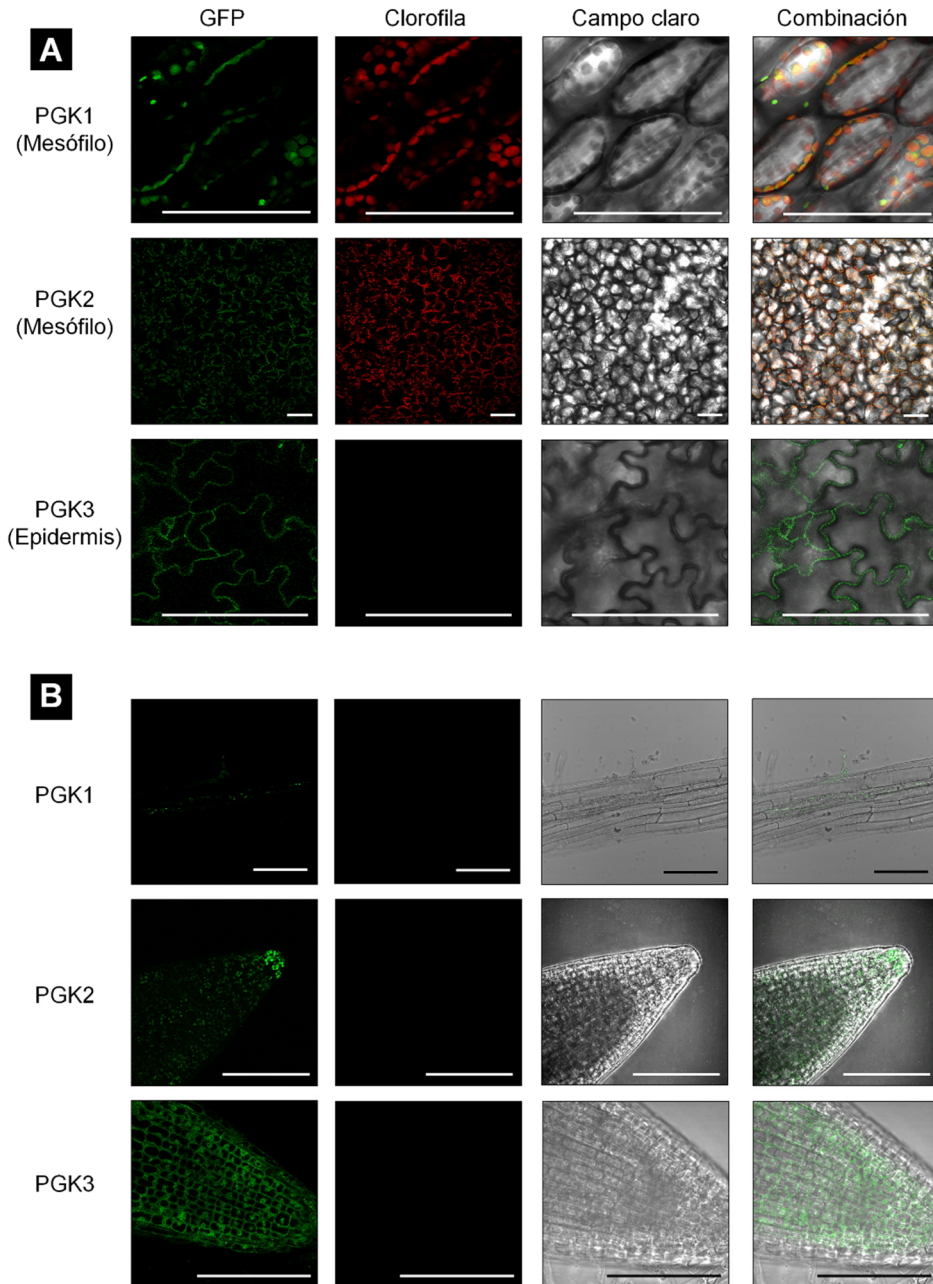


Figura 4.14. Localización subcelular y tisular de las proteínas PGK en las construcciones *ProPGK1:PGK1-GFP*, *ProPGK2:PGK2-GFP* y *ProPGK3:PGK3-GFP*. (A) Parte aérea. (B) Raíces. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. Escala = 100 μ m.

4.4. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN PARA LOS GENES *PGK1*, *PGK2* Y *PGK3*

Las semillas procedentes de las líneas transgénicas por inserción de T-DNA (Apartado 3.1.1) fueron sembradas *in vitro* en medios de crecimiento estándar. Las plántulas obtenidas, se utilizaron para la identificación de mutantes homocigotos para cada una de las inserciones mediante genotipado por PCR (Apartado 3.3.2.1). Una vez aisladas las líneas mutantes homocigotas, se verificaron los sitios de inserción mediante secuenciación. Para ello, se tomó el producto de PCR amplificado con un cebador localizado a la derecha de la inserción y otro situado en el borde de la región de T-DNA. Los resultados de la secuenciación para la localización del sitio de inserción del T-DNA se muestran en la Tabla 4.1.

Para el gen *PGK1* se identificaron dos mutantes simples que denominamos *pgk1.1* (GK_172A12) y *pgk1.2*. (GK_908E11), con las inserciones de T-DNA localizadas en el extremo 5'UTR. Para *PGK2* se identificó el mutante *pgk2.1* (SALK_016097) en el primer exón y el mutante *pgk2.2* (SALK_071724) en el quinto exón. Para *PGK3* se identificaron los mutantes *pgk3.1* (SALK_066422) y *pgk3.2* (SALK_062377), localizados en el cuarto y quinto exón respectivamente (Figura 4.15).

Tabla 4.1. Localización genómica del T-DNA en los mutantes de la familia *PGK*. Se muestra la información aportada por el suministrador de semillas (NASC) y los resultados de la secuenciación. Posición tomando como referencia el codón de inicio (ATG).

Gen	T-DNA	Mutante	Localización según NASC	Localización según los resultados de secuenciación
At3g12780 (<i>PGK1</i>)	GK_172A12	<i>pgk1.1</i>	-38 pb (5'UTR)	-38 pb (5'UTR)
	GK_908E11	<i>pgk1.2</i>	-161 pb (5'UTR)	-161 pb (5'UTR)
At1g56190 (<i>PGK2</i>)	SALK_016097	<i>pgk2.1</i>	+367 pb (1 ^{er} exón)	+ 363 pb (1 ^{er} exón)
	SALK_071724	<i>pgk2.2</i>	+1605 pb (5 ^o exón)	+1676 pb (5 ^o exón)
At1g79550 (<i>PGK3</i>)	SALK_062377	<i>pgk3.1</i>	+946 pb (3 ^{er} intrón)	+1194 pb (4 ^o exón)
	SALK_066422	<i>pgk3.2</i>	+1463 pb (5 ^o exón)	+1465 pb (5 ^o exón)

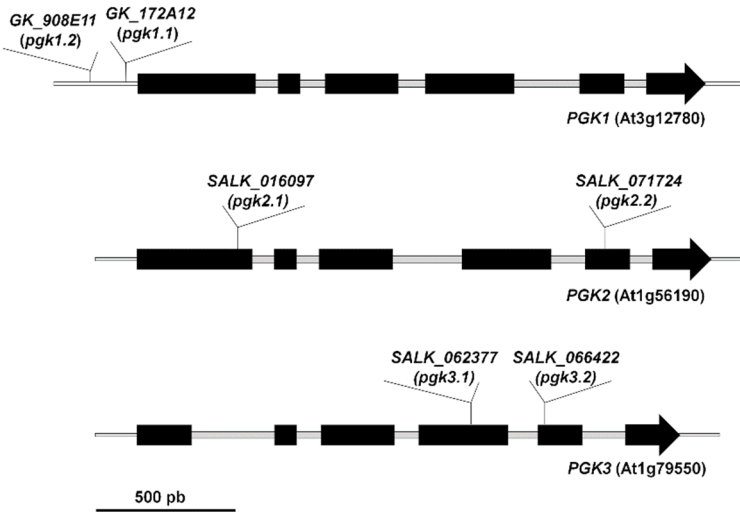


Figura 4.15. Localización de la inserción de T-DNA en las líneas mutantes seleccionadas para los genes de la familia *PGK*. Las regiones de color negro se corresponden con los exones, las grises con los intrones y las blancas con los extremos 5'UTR (izquierda) y 3'UTR (derecha). Las longitudes de los exones, intrones y genes están representados a escala con respecto al tamaño real, tomando como referencia el gen de mayor tamaño. *PGK1*, *PGK2* y *PGK3* se corresponden con tamaños de 2014 pb, 2052 pb y 1949 pb respectivamente.

Con el fin de profundizar en el estudio de las relaciones entre genes de la misma familia, se obtuvo un mutante doble, al que nombramos *pgk1.1 pgk3.2*, procedente del cruzamiento entre los mutantes simples *pgk1.1* y *pgk3.2*.

Una vez identificados y aislados los mutantes de T-DNA, se realizó un análisis de expresión, mediante RT-PCR, tanto para los mutantes simples como para el mutante doble. En los mutantes *PGK1* (*pgk1.1* y *pgk1.2*) se produjo una reducción significativa de la expresión del gen (mutantes *knock-down*), mientras que en todos los mutantes de los genes *PGK2* (*pgk2.1* y *pgk2.2*) y *PGK3* (*pgk3.1* y *pgk3.2*) no se detectó la expresión de dichos genes (mutantes *knock-out*) (Figura 4.16.A).

Para el doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* se realizó un análisis de la expresión de los genes *PGK1* y *PGK3* (Figura 4.16.B). Los resultados obtenidos mostraron

reducciones próximas al 80% y 100% en los niveles de transcritos (RNAm) de los genes *PGK1* y *PGK3*, respectivamente.

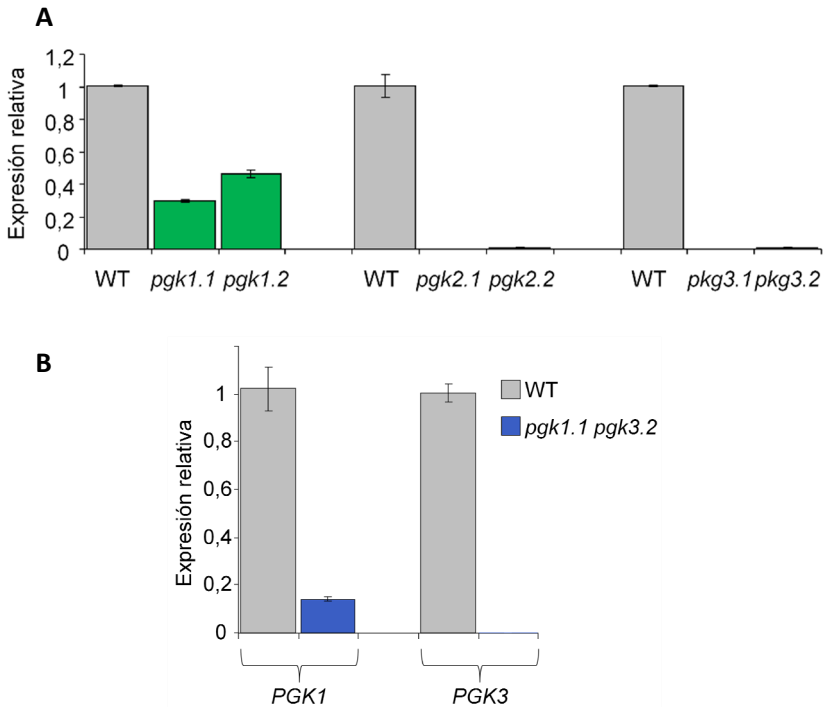


Figura 4.16. Análisis de la expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa. (A) Mutantes simples de los genes *PGK1* (*pgk1.1pgk1.1*, *pgk1.2pgk1.2*), *PGK2* (*pgk2.1pgk2.1*, *pgk2.2pgk2.2*), y *PGK3* (*pgk3.1pgk3.1*, *pgk3.2pgk3.2*). (B) Mutante doble *pgk1.1pgk1.1 pgk3.2pgk3.2* (*pgk1.1 pgk3.2*). Los niveles de expresión de los genes *PGK* en los mutantes se comparan con la expresión de dichos genes en la plantas silvestres (WT). Se representa la media \pm SE, n = 3 muestras biológicas independientes. Plántulas 15-20 días de edad en condiciones estándar de crecimiento.

4.4.1. Análisis de la segregación de los alelos mutantes y estudio de la correlación fenotipo-genotipo

Para confirmar que los mutantes simples seleccionados eran portadores de una sola copia del transgén (T-DNA), se realizó un primer rastreo en el que analizamos tanto la segregación del alelo mutante como los fenotipos asociados a éste. Para

ello, semillas de las líneas mutantes en heterocigosis *PGK1pgk1.1*, *PGK1pgk1.2*, *PGK2pgk2.1*, *PGK2pgk2.2*, *PGK3pgk3.1* y *PGK3pgk3.2* se sembraron (aproximadamente 200/línea) en condiciones de invernadero e *in vitro*.

Tanto las líneas heterocigotas del gen *PGK1* como las del gen *PGK3* segregaron el alelo mutante según las proporciones mendelianas esperadas (1:3) y mostraron una correlación positiva genotipo/fenotipo. El mutante *pgk1.1* presentó un fenotipo de reducción del crecimiento asociado a la mutación, mientras que el mutante *pgk1.2* no mostró diferencias significativas a nivel fenotípico con respecto a su control singénico silvestre. Los mutantes *pgk3.1* y *pgk3.2* exhibieron un fenotipo de reducción del crecimiento tanto en parte aérea como en raíces.

En la descendencia del mutante *pgk2.2* del gen *PGK2* no se observaron las proporciones mendelianas esperadas en la segregación del alelo mutante, ya que una parte de la progenie homocigota para el transgén (T-DNA) mostró un fenotipo drástico de reducción del crecimiento y otra parte era similar a las plantas WT singénicas. El mutante *pgk2.1* fue fenotípicamente albino; aunque su segregación se ajustó a las proporciones mendelianas 1:3 y presentó una correlación positiva genotipo-fenotipo, no pudo complementar con ninguna de las construcciones ensayadas (*Pro35S:PGK2-GFP*, *ProPGK2:PGK2-GFP* y *ProPGK2:PGK2g-GFP*). En este caso, se llegó a la conclusión de que el fenotipo albino podría deberse a la presencia de una segunda inserción de T-DNA en una región cercana a *PGK2* que, al estar localizada muy próxima a la primera, segregaba conjuntamente en la descendencia. Una vez analizada la segregación de los alelos mutantes y la correlación genotipo-fenotipo, los mutantes elegidos para profundizar en la caracterización funcional y molecular de los genes *PGK1* y *PGK3* fueron: *pgk1.1* y *pgk3.2*, como mutantes simples por inserción única de T-DNA y *pgk1.1 pgk3.2*, como doble mutante generado por el cruzamiento recíproco de sendos mutantes simples.

4.5. SELECCIÓN DE LÍNEAS SOBREENPRESORAS Y DE SILENCIAMIENTO GÉNICO PARA LOS GENES *PGK1*, *PGK2* Y *PGK3*

La obtención de líneas sobreexpresoras se llevó a cabo mediante la transformación de plantas silvestres de *Arabidopsis* (ecotipo Columbia) con las construcciones *Pro35S:PGK1-GFP*, *Pro35S:PGK2-GFP* y *Pro35S:PGK3-GFP*; que para simplificar su nomenclatura se las nombró como *OexPGK1*, *OexPGK2* y *OexPGK3*, respectivamente seguido del número de la línea transgénica. Se seleccionaron líneas transgénicas T₃ homocigotas para el transgén y de copia única. Del mismo modo, las líneas de silenciamiento génico (amiRNA) se obtuvieron mediante la transformación de plantas silvestres con las construcciones *Pro35S:amiPGK1-I*, *Pro35S:amiPGK1-J*, *Pro35S:amiPGK2-G*, *Pro35S:amiPGK2-H*, *Pro35S:amiPGK3-K*, y *Pro35S:amiPGK3-L* que para simplificar la nomenclatura se las nombró como *amiPGK1-I/J*, *amiPGK2-G/H* y *amiPGK3-K/L* respectivamente, seguido del número de la línea transgénica. Las líneas transgénicas obtenidas se analizaron por RT-PCR cuantitativa con el fin de seleccionar aquellas con altos niveles de expresión del transgén (*Oex: Overexpressed*) o con bajos niveles de expresión del gen endógeno (amiRNA).

Como líneas sobreexpresoras del gen *PGK1* se eligieron las líneas L7 y L20; del gen *PGK2*, las líneas L60 y L68; y del *PGK3*, las líneas L1, L11 y L15 (Figura 4.17). Las líneas de silenciamiento génico elegidas fueron I3 e I16, para el gen *PGK1*; H35 y H56, para el gen *PGK2*, y L8 y L23 para el gen *PGK3* (Figura 4.18).

Debe señalarse que no se muestran los resultados del análisis por RT-PCR de las líneas obtenidas con la construcción *amiPGK3-K*, ya que todas presentaron un nivel de expresión superior a las plantas WT. También se descartaron las líneas *amiPGK3-L*, ya que el mutante de T-DNA *pgk3.2* tenía un nivel de expresión nulo.

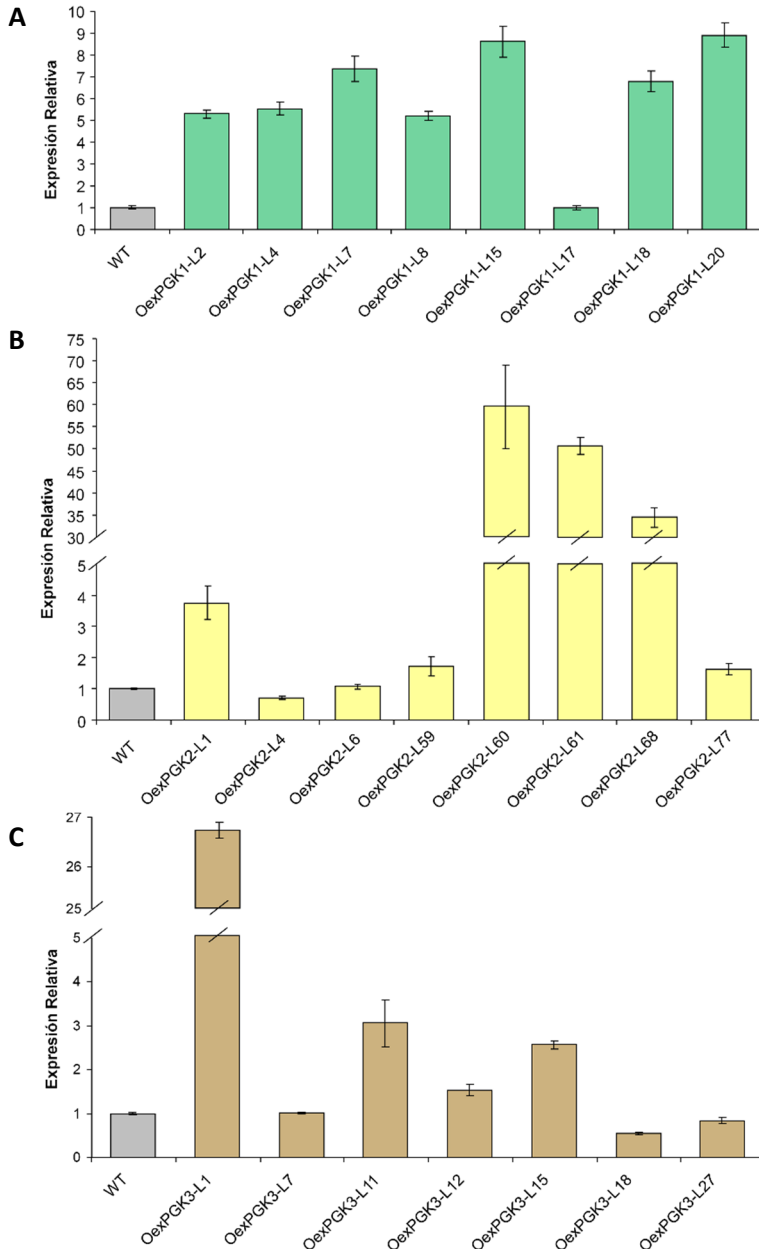


Figura 4.17. Análisis por RT-PCR cuantitativa de las líneas sobreexpresoras de los genes de la familia *PGK*. Plantas silvestres fueron transformadas con las construcciones (A) *Pro35S:PGK1-GFP*, (B) *Pro35S:PGK2-GFP* y (C) *Pro35S:PGK3-GFP*. Para simplificar se les nombra con el prefijo *Oex* seguido del nombre del gen y el número de la línea (Lxx). Valores normalizados con respecto a las plantas control (WT) que se les asignó el valor de 1. Se representa la media \pm SE, n = 3 muestras biológicas independientes.

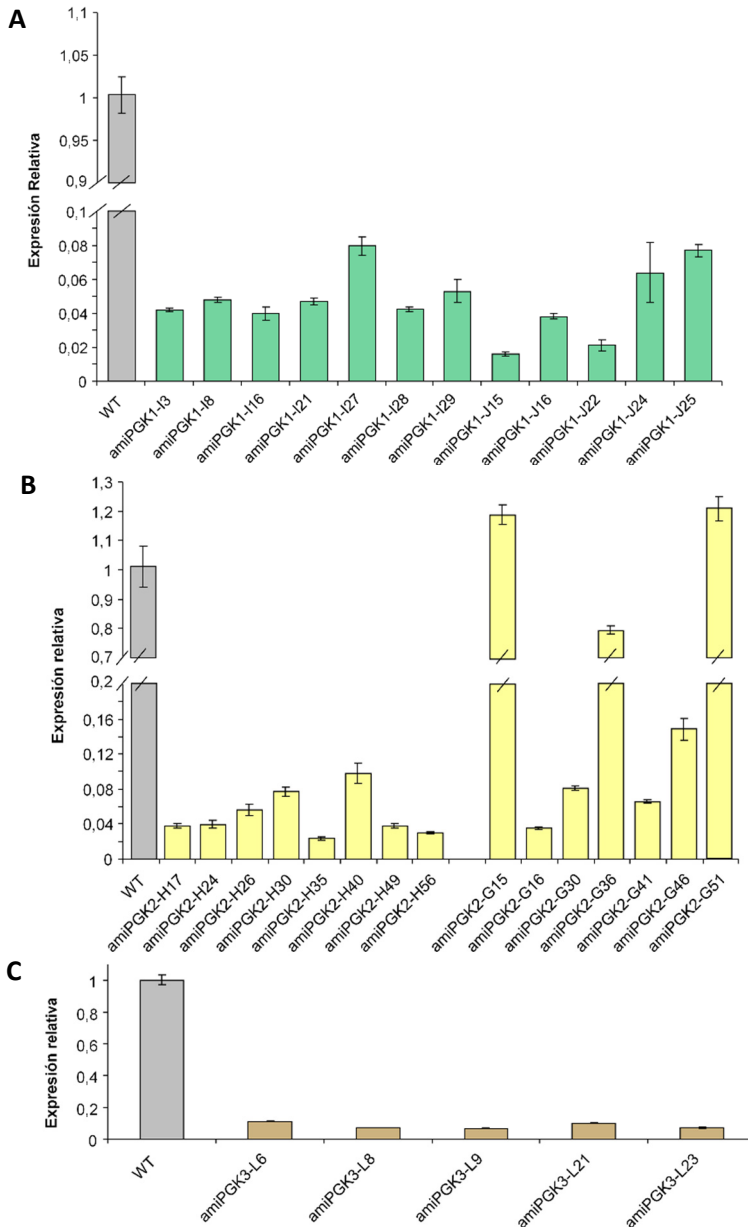


Figura 4.18. Análisis por RT-PCR cuantitativa de las líneas de silenciamiento génico de los genes de la familia *PGK*. Plantas silvestres fueron transformadas con las construcciones (A) *Pro35S:amiPGK1-I*, *Pro35S:amiPGK1-J*, (B) *Pro35S:amiPGK2-G*, *Pro35S:amiPGK2-H*, (C) *Pro35S:amiPGK3-L*. Para simplificar se les nombra con el prefijo *ami* (*amiRNA*) seguido del nombre del gen, la letra de la construcción y el número de la línea. Valores normalizados con respecto a las plantas silvestres control (WT) que se les asignó el valor de 1. Se representa la media \pm SE, $n = 3$ muestras biológicas independientes.

La confirmación de los niveles de expresión proteica de las líneas sobreexpresoras (*Pro35S:PGK-GFP*) se realizó mediante Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra la GFP fusionada a las PGKs (Figura 4.19). En los análisis de las líneas PGK1 y PGK3 se utilizó la construcción del promotor endógeno (*ProPGK1:PGK1-GFP* y *ProPGK3:PGK3-GFP*) como control para confirmar que el contenido proteico de las plantas sobreexpresoras fuera mayor que el de las silvestres.

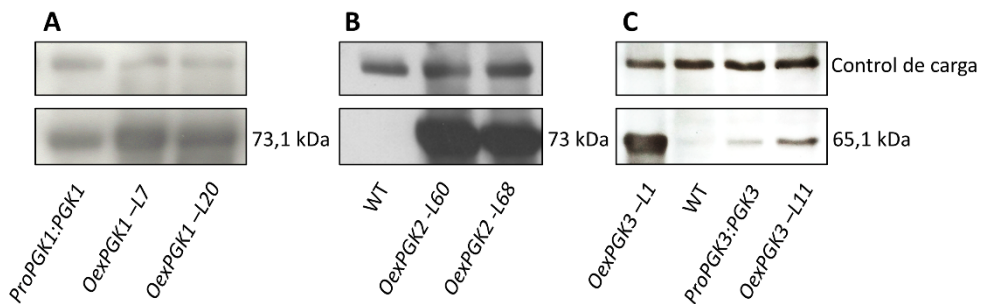


Figura 4.19. Western blot de las líneas sobreexpresoras (*Pro35S:PGK-GFP*) de los genes de la familia *PGK*. La banda observada se corresponde a la proteína de fusión PGK-GFP. El control de carga está representado por bandas inespecíficas (A) Abundancia de PGK1-GFP en las líneas OexPGK1 L7 y L20 llevando la construcción *Pro35S:PGK1-GFP* con respecto a la abundancia en la línea *ProPGK1:PGK1-GFP* expresando PGK1 bajo el control del promotor endógeno. (B) Abundancia de proteínas en las líneas OexPGK2 L60 y L68. (C) Abundancia de proteínas en las líneas OexPGK3 L1 y L11 llevando la construcción *Pro35S:PGK3-GFP* con respecto a la línea *ProPGK3:PGK3-GFP* expresando PGK3 bajo el control del promotor endógeno. En el caso de PGK2 y PGK3 se utilizó un extracto proteico del WT que sirvió como control negativo dado que no llevaban la proteína GFP.

4.6. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES *PGK1*, *PGK2* Y *PGK3*

4.6.1 Mutantes por inserción de T-DNA

Con el fin de determinar las posibles funciones asociadas a la pérdida de función de los genes *PGK1* y *PGK3*, se cuantificaron diversos parámetros fenotípicos en los mutantes simples (*pgk1.1* y *pgk3.2*) y en el mutante doble (*pgk1.1 pgk3.2*), crecidos tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero.

En condiciones estándar de crecimiento *in vitro* se cuantificó el peso de la parte aérea, peso de las raíces y su longitud. Las tres líneas mutantes mostraron una disminución en peso fresco de la parte aérea con respecto a las plantas WT, aunque las diferencias sólo fueron significativas para el mutante simple *pgk3.2* y el mutante doble *pgk1.1 pgk3.2* (Figura 4.20.A-D). Las diferencias más notables se observaron a nivel del desarrollo de la raíz, donde *pgk3.2* mostró una disminución del peso y la longitud de la raíz. En el doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* también fue evidente la reducción del crecimiento de la raíz (Figura 4.20.B, C y D). El doble mutante siempre presentó fenotipos intermedios entre *pgk1.1* y *pgk3.2*, no observándose un efecto sinérgico de la doble mutación en ninguno de los parámetros fenotípicos medidos. En las plantas crecidas en condiciones de invernadero, las tres líneas mutantes mostraron una disminución significativa del peso de la roseta con respecto al WT, siendo, nuevamente, *pgk3.2* el que mostró la mayor reducción (Figura 4.21.A, B). El peso de la roseta del doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* fue, de nuevo, intermedio entre el peso de los mutantes simples, lo que sugiere un efecto compensatorio de la doble mutación. En este sentido, se destaca que el peso de la roseta del mutante *pgk3.2* fue significativamente menor que el del doble mutante.

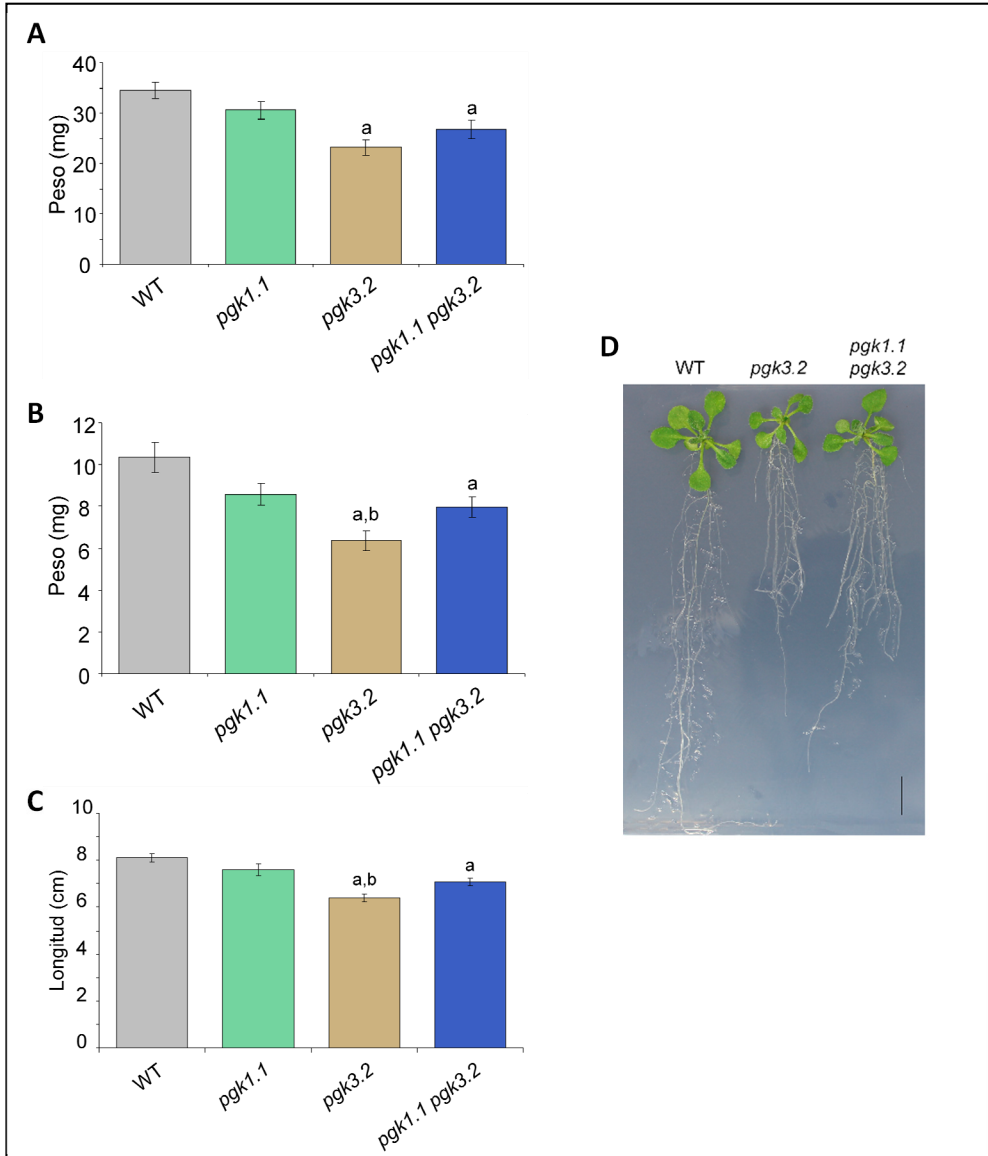


Figura 4.20. Caracterización fenotípica de plantas silvestres (WT), mutantes simples y doble de las isoformas *PGK1* y *PGK3* cultivadas en condiciones *in vitro* durante 20 días. (A) Peso fresco de la parte aérea, (B) Peso fresco de las raíces, (C) Longitud de las raíces. Se representa la media \pm SE ($n \geq 30$). Las letras minúsculas representan diferencias significativas con respecto al WT (a) y/o al doble mutante (b) ($P < 0,05$). (D) Fotografía de plántulas de 21 días crecidas *in vitro*. Escala = 1 cm.

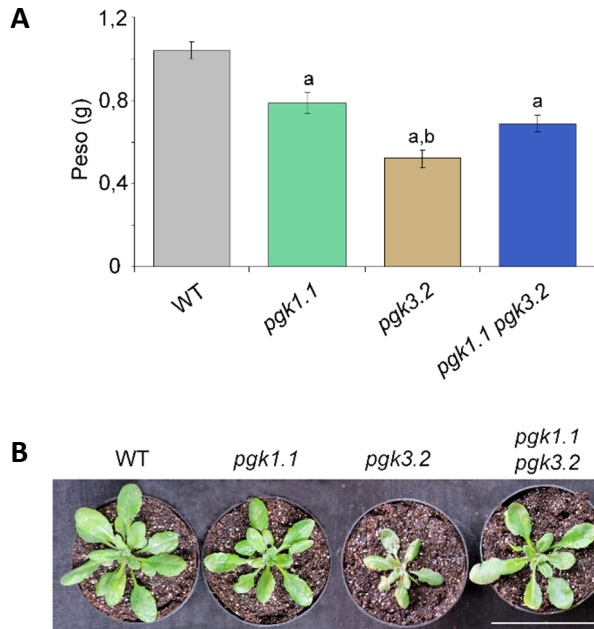


Figura 4.21. Caracterización fenotípica de plantas silvestres (WT), mutantes simples y doble de las isoformas *PGK1* y *PGK3* cultivadas en invernadero durante 32 días. (A) Peso fresco de la roseta. Se representa la media \pm SE ($n \geq 30$). Las letras minúsculas representan diferencias significativas con respecto al WT (a) y/o al doble mutante (b) ($P < 0,05$). (B) Fotografía de plántulas de 33 días. Escala = 7 cm.

4.6.2 Líneas sobreexpresoras y de silenciamiento génico

El análisis fenotípico de las líneas *Oex* y *amiRNA* se realizó evaluando los mismos parámetros descritos en el apartado anterior.

En condiciones *in vitro*, las plantas *amiPGK1* presentaron una disminución significativa de todos los parámetros cuantificados (peso fresco de la parte aérea, peso fresco de las raíces y su longitud) con respecto a las plantas WT. En las plantas *OexPGK1* y *OexPGK3* se observó la tendencia opuesta, obteniéndose un mayor peso fresco, tanto de la parte aérea como de las raíces, y una mayor longitud de éstas con respecto a las plantas control. Las plantas *amiPGK2* y *OexPGK2* no mostraron diferencias significativas respecto a las plantas WT en ninguno de los parámetros fenotípicos cuantificados (Figura 4.22.A, B, C).

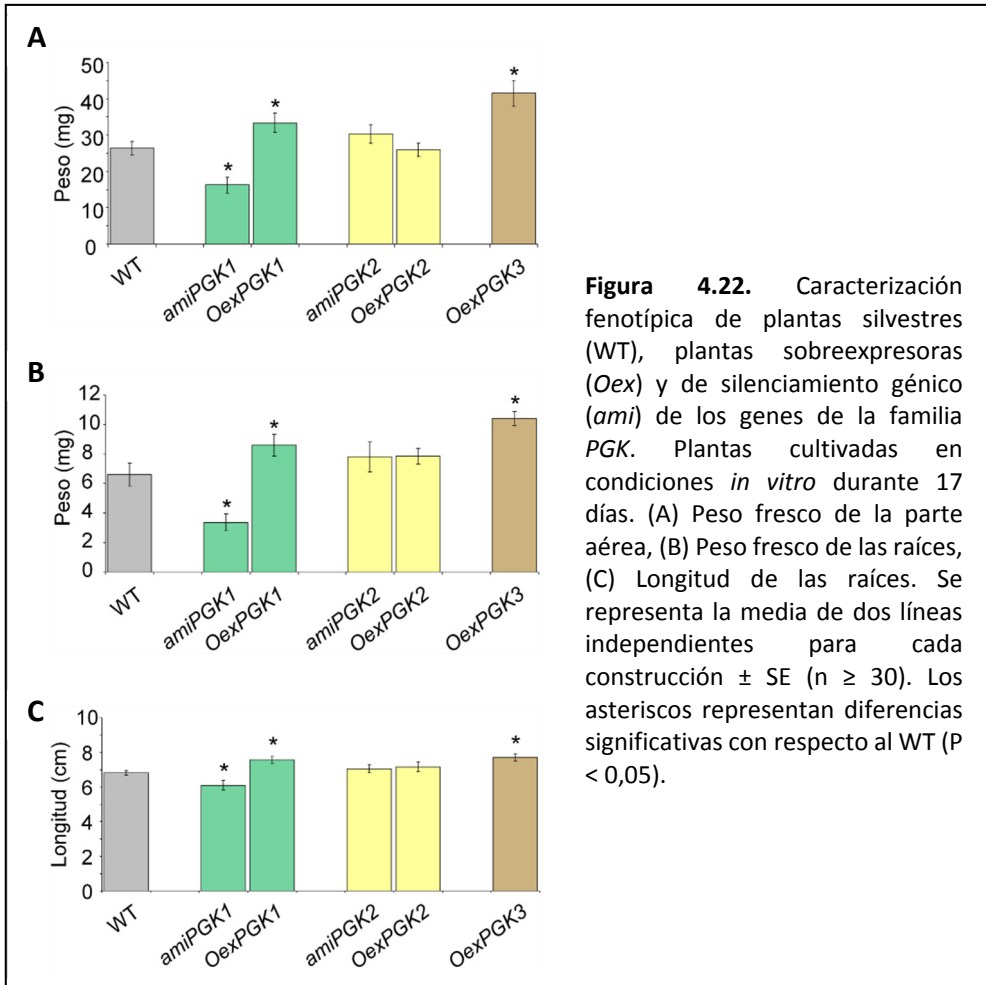
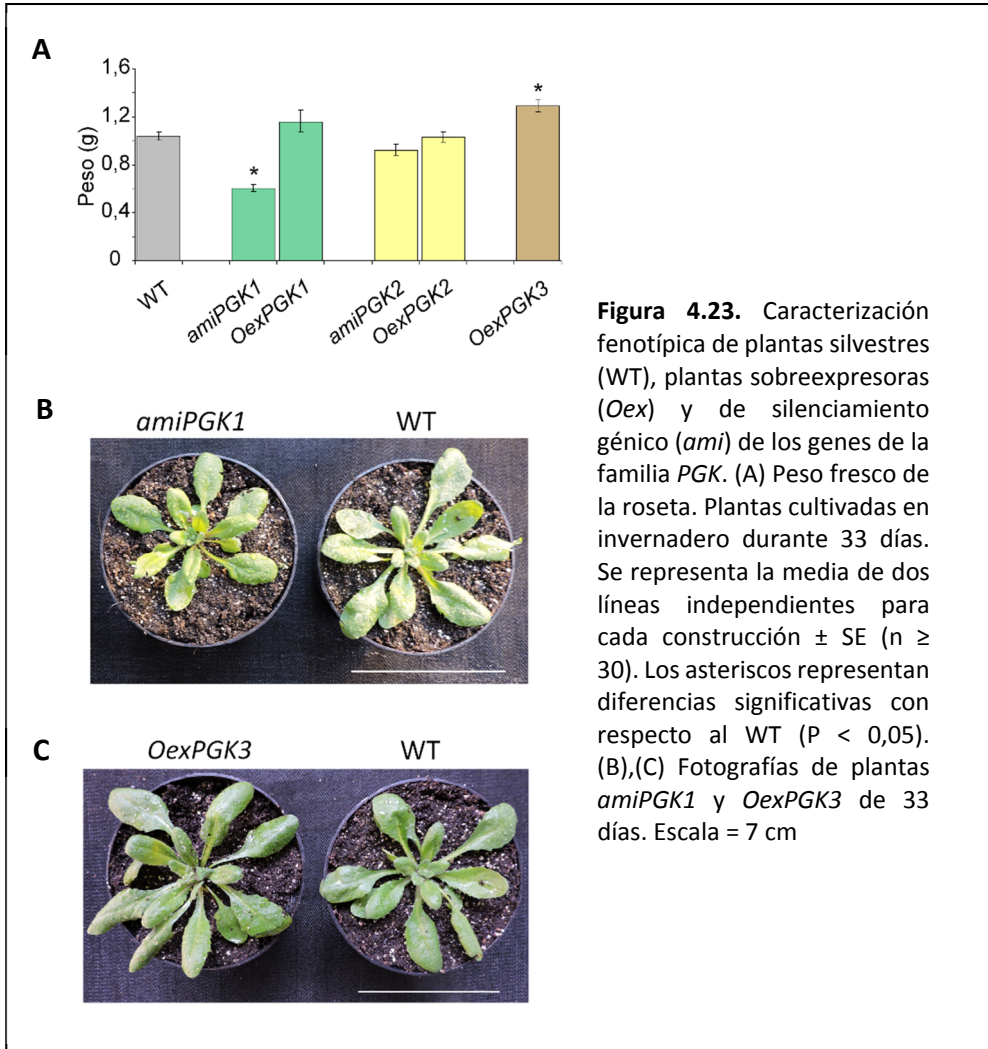


Figura 4.22. Caracterización fenotípica de plantas silvestres (WT), plantas sobreexpresoras (Oex) y de silenciamiento génico (ami) de los genes de la familia PGK. Plantas cultivadas en condiciones *in vitro* durante 17 días. (A) Peso fresco de la parte aérea, (B) Peso fresco de las raíces, (C) Longitud de las raíces. Se representa la media de dos líneas independientes para cada construcción \pm SE ($n \geq 30$). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al WT ($P < 0,05$).

En las plantas crecidas en invernadero, se cuantificó el peso de las rosetas en plantas de 33 días. El peso de las rosetas de las plantas *amiPGK1* fue menor que el de las plantas WT (Figura 4.23.A, B), lo que apoya la reducción del crecimiento, como consecuencia de la menor actividad de la enzima, comportamiento ya observado en el mutante *pgk1.1*. En contraste, las plantas *OexPGK3* fueron significativamente más grandes que las silvestres (Figura 4.23.A, C).



Es importante destacar que, a partir de la segunda semana de cultivo, algunas hojas de la roseta de las plantas sobreexpresoras de las isoformas plastidiales *PGK1* y *PGK2* (*OexPGK1* y *OexPGK2*) comenzaron a mostrar signos evidentes de clorosis y/o necrosis. Además, cuando las plantas crecían en cámaras de crecimiento, dónde las condiciones de luz eran óptimas, comenzaban a desarrollar el escapo floral a partir de la tercera semana de edad. Se concluyó que este fenotipo podría estar asociado

a una aceleración del desarrollo, que conduciría a una senescencia precoz, como se recoge en el Apartado 4.12.

4.7. ANÁLISIS DE LA COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN *PGK1* Y *PGK3*

Para corroborar la correlación fenotipo-genotipo, el gen silvestre fue reintroducido en las líneas mutantes *pgk1.1* y *pgk3.2* mediante cruzamiento. Concretamente, el mutante *pgk1.1* se cruzó con plantas silvestres que habían sido transformadas con la construcción *Pro35S:PGK1* (T_3 de copia única para el transgén y en homocigosis) y el mutante *pgk3.2* con plantas silvestres transformadas con *Pro35S:PGK3*. Cada mutante se cruzó con dos líneas transgénicas independientes y se obtuvo la generación F_3 constituida por plantas homocigotas para el alelo mutante y para el transgén. Como resultado, se obtuvieron líneas *pgk1.1 Pro35:PGK1* y *pgk3.2 Pro35S:PGK3*. Para comprobar la complementación de los fenotipos asociados a cada una de las mutaciones se procedió a realizar la caracterización fenotípica de las líneas.

Como se especifica en el Apartado 4.6.1, el mutante *pgk3.2* crecido in vitro presenta un fenotipo de raíz corta y de menor peso, tanto de la parte aérea como de las raíces, comparado con los controles. En las líneas *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L1* y *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L11* fue posible rescatar tanto el fenotipo de la raíz como el del peso de parte aérea, lo que confirma la correlación entre los fenotipos observados y el genotipo de la planta (Figura 4.24).

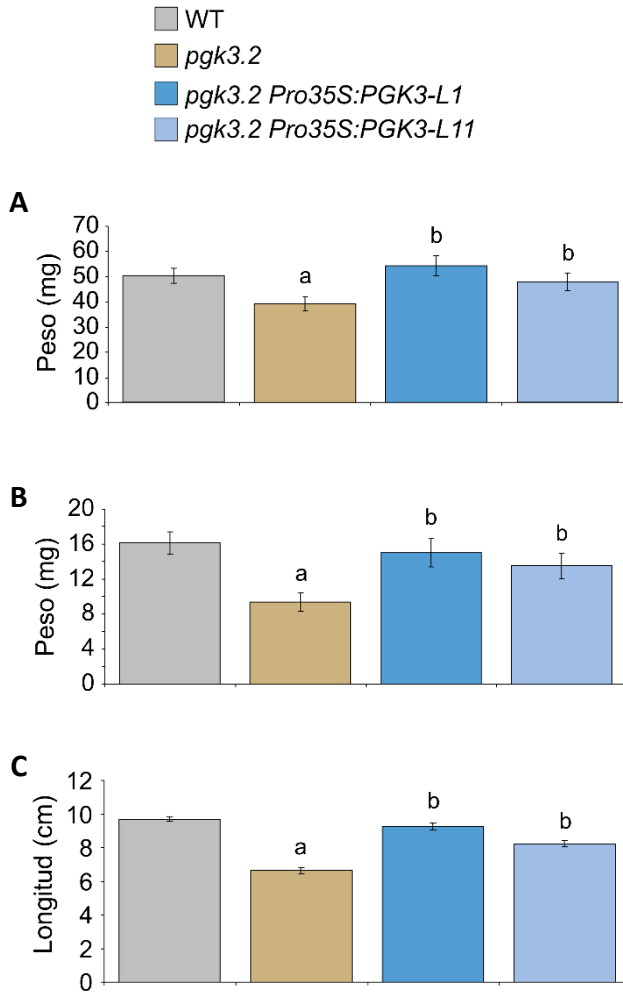


Figura 4.24. Caracterización fenotípica de mutantes *pgk3.2* y de las líneas complementadas *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L1* y *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L11*. Las plantas se cultivaron en condiciones *in vitro* durante 20 días. (A) Peso fresco de la parte aérea, (B) Peso fresco de las raíces, (C) Longitud de las raíces. Se representa la media \pm SE ($n \geq 37$). Las letras minúsculas representan diferencias significativas con respecto al WT (a) y/o al mutante *pgk3.2* (b) ($P < 0,05$).

La complementación de los mutantes *pgk3* también se consiguió en las plantas crecidas en invernadero (Figuras 4.25 y 4.26.B). Las dos líneas *pgk3.2 Pro35S:PGK3* complementaron el fenotipo de menor crecimiento de la roseta del mutante *pgk3.2*. El grado de complementación dependió, sin embargo, del nivel de expresión del transgén en cada línea, siendo más evidente en la línea *Pro35S:PGK3-L1*, que mostró un mayor nivel de expresión, tanto del gen como de la proteína PGK3 que la línea *Pro35S:PGK3-L11*, en la que el nivel de expresión del transgén fue inferior (Figuras 4.17.C, 4.19.C y 4.25). Las plantas *pgk1.1 Pro35S:PGK1* mostraron el mismo fenotipo de clorosis observado en las líneas WT sobreexpresoras de *PGK1*. Dado que la sobreexpresión de *PGK1* podría ser la responsable de estos fenotipos, intentamos complementar el mutante *pgk1.1* con una construcción que expresase PGK1 bajo el control de su propio promotor. Para ello, se realizaron nuevos cruzamientos con plantas silvestres que habían sido transformadas con la construcción *ProPGK1:PGK1*. Se obtuvieron dos líneas transgénicas independientes (*pgk1.1 ProPGK1:PGK1-L3* y *pgk1.1 ProPGK1:PGK1-L15*), que complementaron el fenotipo de menor peso de la roseta del mutante *pgk1.1* (Figura 4.25 y 4.26.A).

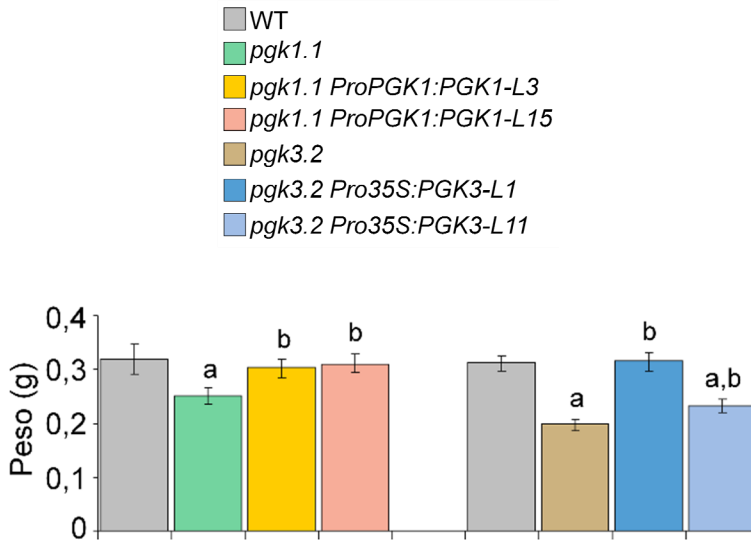


Figura 4.25. Caracterización fenotípica de plantas silvestres (WT), mutantes simples (*pgk1.1* y *pgk3.2*) y de líneas complementadas *pgk1.1 ProPGK1:PGK1-L3*, *pgk1.1 ProPGK1:PGK1-L15*, *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L1* y *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L11*. Valores correspondientes al peso fresco de la roseta en plantas de 28 días de edad cultivadas en invernadero. Se representa la media \pm SE ($n \geq 20$). Las letras minúsculas representan diferencias significativas con respecto al WT (a) y/o al mutante (b) ($P < 0,05$).

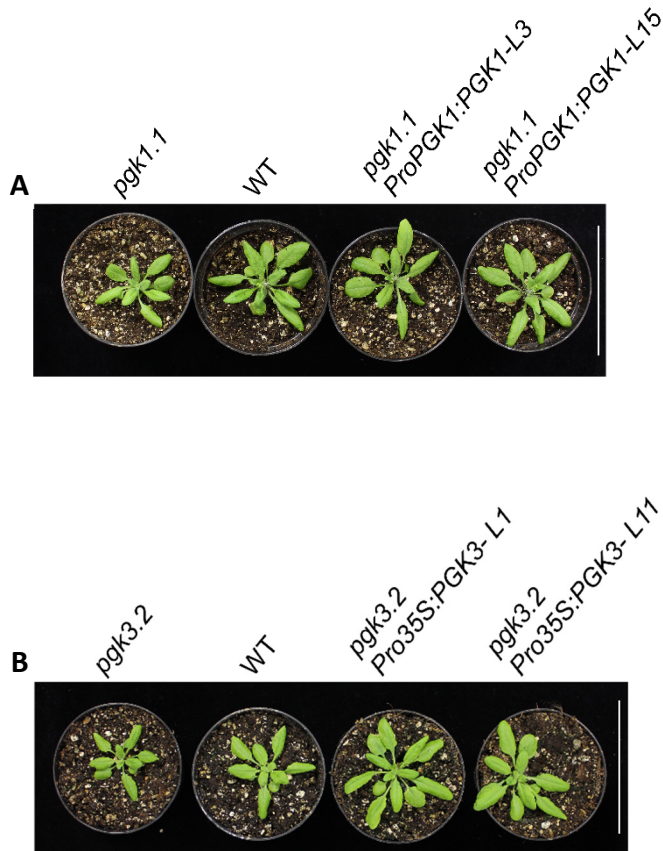


Figura 4.26. Fotografía de plantas silvestres (WT), mutantes y mutantes complementados. (A) Complementación mutante *pgk1.1* con las líneas *pgk1.1 ProPGK1:PGK1-L3*, *pgk1.1 ProPGK1:PGK1-L15*. (B) Complementación mutante *pgk3.2* con las líneas *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L1* y *pgk3.2 Pro35S:PGK3-L11*. Plantas crecidas en invernadero durante 31 y 28 días respectivamente. Escala = 8,5 cm.

4.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES *PGK1*, *PGK2* Y *PGK3*

El contenido en almidón de las líneas de pérdida de función *pgk1.1* y *amiPGK1* fue significativamente menor que el de las plantas silvestres. En contraste, el comportamiento del mutante *pgk3.2* fue el opuesto ya que su contenido en almidón fue significativamente superior al de las plantas control. En el doble mutante (*pgk1.1 pgk3.2*) se observaron valores intermedios entre *pgk1.1* y *pgk3.2*, no siendo significativamente distintos al contenido en almidón de las plantas control (Figura 4.27.A). Tampoco se observaron diferencias significativas en las líneas *amiPGK2*.

Dado que líneas sobreexpresoras de las isoformas plastidiales (*PGK1* y *PGK2*) presentaban síntomas de clorosis foliar a partir de la 2-3 semana de desarrollo, las determinaciones analíticas se realizaron en dos lotes de plantas, que diferían en el grado de clorosis. Uno de los lotes lo constituían las plantas que estaban menos afectadas (*OexPGK1_A*, *OexPGK2_A*), mientras que el otro incluía aquellas plantas con una clorosis más patente (*OexPGK1_B*, *OexPGK2_B*) (Figura 4.27.B). El contenido en almidón de todas las líneas fue inferior al de las plantas WT, pero las plantas con mayor grado de clorosis presentaron una caída más brusca en el contenido de almidón (Figura 4.27.B). En las líneas sobreexpresoras del gen *PGK3* no se encontraron alteraciones, respecto a las plantas WT, en la cantidad de almidón.

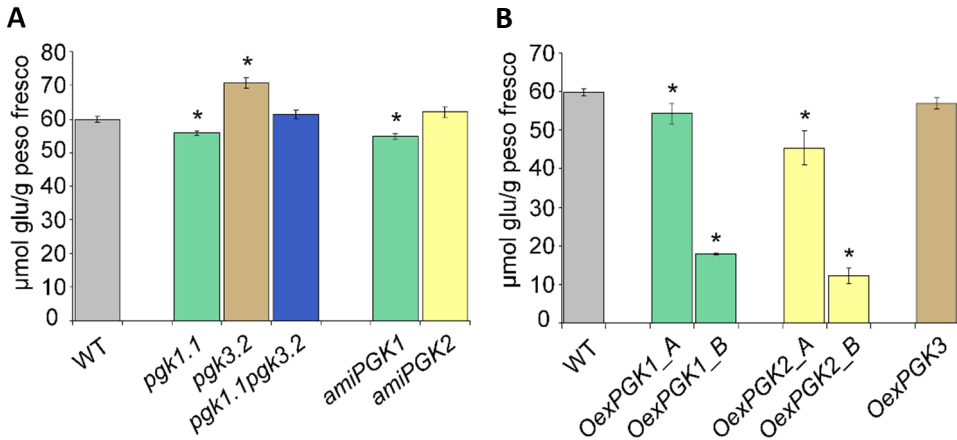


Figura 4.27. Contenido de almidón al final del período de luz representado en μmol glucosa/g peso fresco de plantas silvestres (WT) y líneas transgénicas de los genes de la familia *PGK*. (A) Líneas de pérdida de función (mutantes de T-DNA y amiRNA). (B) Líneas sobreexpresoras. Las plantas se cultivaron en invernadero durante 30 días. Se representa la media de dos líneas independientes para cada construcción \pm SE ($n = 10$). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al WT ($P < 0,05$).

4.9. CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES *PGK1*, *PGK2* Y *PGK3*

Con el fin de dilucidar el origen de los cambios en el contenido de almidón, se cuantificaron diversos parámetros fotosintéticos en dos estadios del desarrollo antes de la formación del tallo floral. En primer lugar, se realizaron medidas previas utilizando el sistema DUAL-PAM-100 que lleva incorporado una cámara donde se introducían las plantas; los resultados obtenidos, nos permitieron descartar todas aquellas líneas transgénicas que no mostraron cambios en la actividad fotosintética, lo que simplificó el desarrollo del experimento final. Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 4.2 y 4.3.

La actividad fotosintética del mutante *pgk1.1* disminuyó significativamente con respecto a las plantas WT, tanto a los 20 días como a los 30 días de desarrollo, ya que los valores de fijación neta de CO_2 (A_N) y eficiencia de transporte electrónico del PSII (ΦPS2) se redujeron de manera drástica en comparación con las plantas

control. Además, los resultados de las medidas de eficiencia máxima cuántica del PSII (Fv/Fm) a los 20 días sugieren la existencia de un fenómeno de fotoinhibición o daño fotosintético (Tabla 4.2).

La actividad fotosintética de los mutantes *pgk3.2* con 20 días de edad no difiere significativamente con respecto a las plantas WT, aunque se observa una tendencia hacia una mayor fijación neta de CO₂ (A_N). Por el contrario, cuando las plantas mutantes *pgk3.2* alcanzaron los 30 días de edad, su actividad fotosintética, medida como fijación neta de CO₂ (A_N) y eficiencia de transporte electrónico del PSII (PhiPS2), se redujo significativamente con respecto a los controles (Tabla 4.2)

La actividad fotosintética del doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* se redujo significativamente, tanto a los 20 como a los 30 días, con respecto a los controles, aunque esta reducción fue ligeramente inferior a la observada en el mutante simple *pgk1.1* (Tabla 4.2), sugiriendo, de nuevo, la falta de efecto aditivo de las dos mutaciones.

Tabla 4.2. Parámetros fotosintéticos de plantas control, mutantes simples (*pgk1.1* y *pgk3.2*) y mutante doble (*pgk1.1 pgk3.2*) a los 20 días y 30 días de edad. Se representa los valores medios de A_N (fijación neta de CO₂, μmol/m² s), PhiPS2 (eficiencia efectiva del PSII) y Fv/Fm (eficiencia cuántica máxima del PSII) ± SE (n = 10). En negrita aquellos que muestran diferencias significativas con respecto al WT (P < 0,05).

		A _N	PhiPS2	Fv/Fm
20 días de edad	WT	7,0 ± 0,348	0,139 ± 0,004	0,769 ± 0,003
	<i>pgk1.1</i>	4,7 ± 0,332	0,112 ± 0,004	0,745 ± 0,008
	<i>pgk3.2</i>	7,5 ± 0,408	0,151 ± 0,007	0,766 ± 0,006
	<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	5,0 ± 0,365	0,128 ± 0,006	0,768 ± 0,007
30 días de edad	WT	9,1 ± 0,295	0,174 ± 0,004	0,766 ± 0,003
	<i>pgk1.1</i>	6,2 ± 0,115	0,130 ± 0,004	0,765 ± 0,004
	<i>pgk3.2</i>	7,5 ± 0,276	0,160 ± 0,004	0,758 ± 0,006
	<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	7,0 ± 0,222	0,140 ± 0,004	0,767 ± 0,004

Los parámetros fotosintéticos también se cuantificaron en las líneas sobreexpresoras de las isoformas plastidiales *OexPGK1* y *OexPGK2*; presumiblemente, estas líneas presentarían una menor actividad fotosintética debido al desarrollo de clorosis y/o necrosis foliares a partir de las 2-3 semanas de vida. Las medidas también se realizaron en dos fases del desarrollo de las plantas, aunque procurando que la primera de ellas se realizara antes de que las hojas mostraran signos de clorosis (15 días). Las determinaciones efectuadas cuando la edad de las plantas fue de 15 días pusieron de manifiesto un aumento de la actividad fotosintética de las plantas *OexPGK1* (Tabla 4.3). Sin embargo, las determinaciones efectuadas a los 25 días demostraron que tanto las plantas *OexPGK1* como las *OexPGK2* presentaban una menor fijación neta de CO₂ (A_N), lo que se traduce en una menor actividad fotosintética. Además, las líneas sobreexpresoras de la proteína PGK2 presentaban una reducción severa de la eficiencia en el transporte electrónico y de la eficiencia máxima cuántica del PSII. El bajo valor de este último parámetro sugiere la existencia de un fenómeno de fotoinhibición.

Tabla 4.3. Parámetros fotosintéticos de plantas control y líneas sobreexpresoras plastidiales (*OexPGK1* y *OexPGK2*) a los 15 y 20 días de edad. Se representa los valores de A_N (fijación neta de CO₂, μmol/m² s), PhiPS2 (eficiencia efectiva del PSII) y Fv/Fm (eficiencia cuántica máxima del PSII) correspondientes a la media de dos líneas transgénicas independientes ± SE (n ≥ 14). En negrita aquellos que muestran diferencias significativas con respecto al WT (P < 0,05).

		A _N		PhiPS2		Fv/Fm	
15 días de edad	WT	5,3	± 0,324	0,149	± 0,006	0,746	± 0,006
	<i>OexPGK1</i>	6,1	± 0,213	0,155	± 0,006	0,736	± 0,006
	<i>OexPGK2</i>	5,6	± 0,226	0,155	± 0,005	0,741	± 0,004
25 días de edad	WT	8,3	± 0,218	0,195	± 0,006	0,765	± 0,004
	<i>OexPGK1</i>	7,3	± 0,189	0,184	± 0,004	0,767	± 0,002
	<i>OexPGK2</i>	4,9	± 0,630	0,129	± 0,014	0,717	± 0,018

4.10. ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA LOS GENES *PGK1*, *PGK2* Y *PGK3*

Para estudiar la contribución de las proteínas PGK al metabolismo primario y conocer las redes metabólicas en que participan las isoformas de la familia PGK, se decidió realizar un estudio del perfil metabólico de las líneas transgénicas con ganancia y pérdida de función.

En primer lugar, se efectuó un PCA del perfil metabólico obtenido tanto en la parte aérea (Figura 4.28.A) como en las raíces (Figura 4.28.B). Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que los perfiles metabólicos de las líneas transgénicas difieren entre sí y respecto al de las plantas WT. De hecho, pudimos identificar grupos claramente diferenciados y que se explicaban por un conjunto específico de metabolitos. Concretamente, se comparó el perfil metabólico de los mutantes simples (*pgk1.1* y *pgk3.2*), el mutante doble (*pgk1.1 pgk3.2*) y el de las plantas WT. También se compararon los mutantes simples *pgk1.1* y *pgk3.2* con respecto a sus líneas sobreexpresoras *OexPGK1* y *OexPGK3* respectivamente. Por último, se comparó la línea de pérdida de función *amiPGK2* con la línea sobreexpresora *OexPGK2*. Una vez establecidos los diferentes grupos, se procedió a identificar cuáles eran los metabolitos responsables de estos cambios. Para ello, se comparó el perfil metabólico de las líneas mutantes y el de las líneas sobreexpresoras con respecto a las plantas WT, tanto en las partes aéreas como en las raíces (Figuras 4.29 y 4.30). Seguidamente se comprobó si las diferencias más notables a nivel metabólico de las líneas de pérdida de función se compensaban sobreexpresando la proteína. Esto se llevó a cabo calculando la relación línea sobreexpresora/línea pérdida de función para los valores obtenidos en cada uno de los metabolitos (Tabla 4.4).

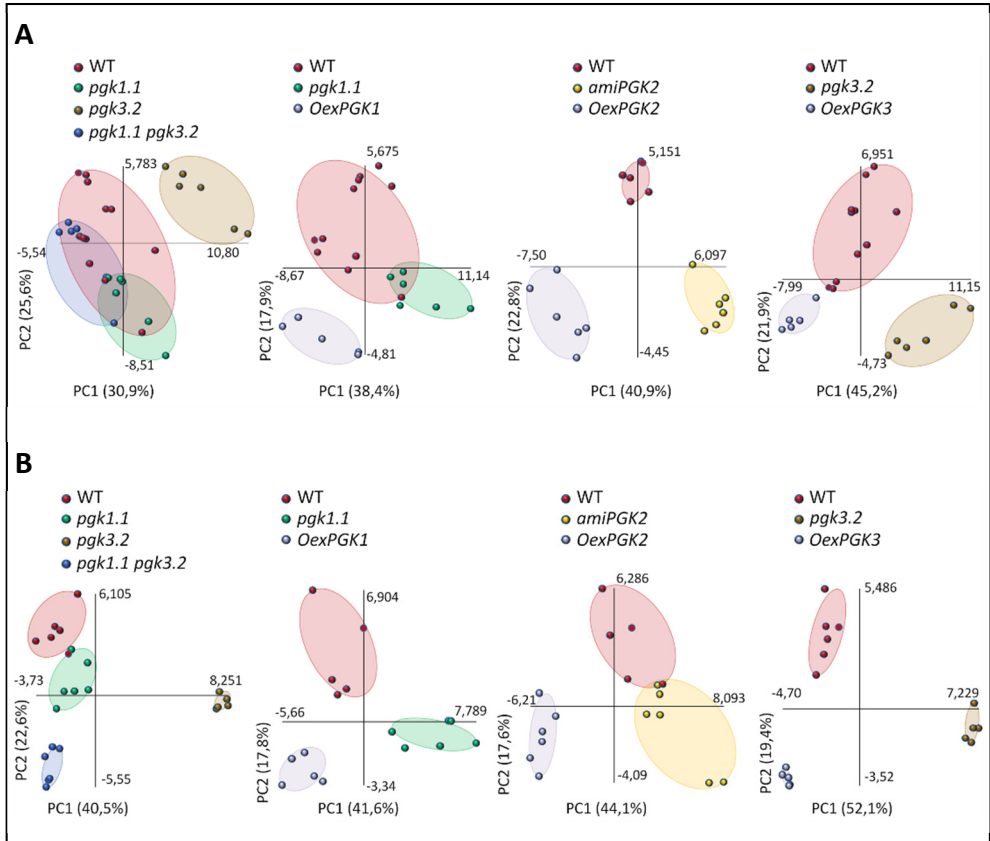


Figura 4.28. Análisis de los componentes principales (PCA). (A) Parte aérea, (B) Raíces. De izquierda a derecha se compara el perfil metabólico de plantas *pgk1.1*, *pgk3.2*, *pgk1.1 pgk3.2* y silvestres (WT); seguido de las líneas de pérdida de función (*pgk1.1*, *amiPGK2* y *pgk3.2*) comparadas cada una de ellas con su correspondiente línea sobreexpresora (*OexPGK1*, *OexPGK2* y *OexPGK3* respectivamente) y el WT. Plantas crecidas en condiciones *in vitro*.

Los resultados de nuestros estudios pusieron de manifiesto que, a nivel cuantitativo, los cambios más significativos en los niveles de metabolitos se produjeron en los mutantes.

En la parte aérea del mutante *pgk1.1*, los cambios más importantes se observaron en aminoácidos (alanina, beta-alanina, aspartato, prolina y ácido treónico) y ácidos orgánicos, como el succinato, que incrementaron más del 40% con respecto al control (Figura 4.29 y Tabla Suplementaria 5); en los azúcares, sin embargo, no se

encontraron cambios superiores al 40%, a diferencia de las líneas *OexPGK1*, donde se observaron cambios de hasta el 50% en fructosa y del 30% en glucosa (Figura 4.29 y Tablas Suplementarias 5 y 6). La comparación entre el mutante y las líneas sobreexpresoras muestra que no todos los cambios de metabolitos en el mutante *pgk1.1* se produjeron en sentido contrario al observado en la línea *OexPGK1*. No obstante, este comportamiento si fue evidente en algunos metabolitos, como metionina, glicolato, Fru-6P y glicerol-3-P, cuyo contenido disminuyó en las líneas *OexPGK1* e incrementó en el mutante *pgk1.1* (Tabla 4.4).

En raíces, el patrón de modificación de metabolitos del mutante *pgk1.1* fue diferente del obtenido en la parte aérea y afectó, especialmente, a los niveles de azúcares. Así, todos los azúcares cuantificados, excepto el GAP, aumentaron significativamente; cuantitativamente, los cambios más relevantes fueron los de la fructosa (100% de incremento) y la glucosa (50% de incremento). Aunque estos dos cambios no se revirtieron completamente en las líneas *Oex*, sus niveles se acercaron o igualaron con los del WT (Figura 4.30). El ratio *OexPGK1/pgk1.1*, que mide la relación entre el contenido en metabolitos de las líneas sobreexpresoras y mutantes, muestra que algunos de ellos como serina, o-acetil serina, piruvato, rafinosa y sacarosa disminuyen en las líneas *OexPGK1* e incrementan en el mutante *pgk1.1* (Tabla 4.4).

El análisis del perfil metabólico de la parte aérea del mutante *pgk3.2* mostró un aumento, prácticamente, generalizado de aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares (Figura 4.29). De los 23 aminoácidos detectados, los incrementos fueron significativos en 8, mientras que las disminuciones solo fueron significativas en tres; se destacan, al respecto, incrementos del 40% en glutamina y O-acetil serina. En el caso de los ácidos orgánicos, 9 de un total de 14, mostraron un aumento considerable, especialmente succinato, citrato, piruvato y malato (incrementos del 121%, 41%, 26% y 22% respectivamente). Además, se observaron incrementos en más de la mitad de los azúcares cuantificados, siendo destacables los de azúcares

los de azúcares solubles, como la fructosa (incremento de hasta un 164%) y glucosa (113% de incremento).

En contraste, los resultados obtenidos en la línea *OexPGK3*, mostraron que más de la mitad de los aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares redujeron su contenido, siendo notables disminuciones de hasta el 50% en glutamina, 35% en o-acetil serina y 22% en ácido treónico (Figura 4.29 y Tabla Suplementaria 6). También disminuyó significativamente el contenido de varios ácidos orgánicos como citrato, fumarato, malato y piruvato. En relación a los azúcares, cabe mencionar la reducción tanto de glucosa como de sacarosa, lo que podría indicar una actividad metabólica más rápida de la línea sobreexpresora.

Los cambios más acusados en la relación *OexPGK3/pgk3.2* se observaron en la glutamina (0,3), o-acetil serina (0,5), piruvato (0,5) y glucosa (0,4), cuyos valores relativos fueron significativamente mayores en el mutante en comparación con las plantas sobreexpresoras (Tabla 4.4).

A diferencia del mutante *pgk1.1*, en las raíces del mutante *pgk3.2* las variaciones en el perfil metabólico encontradas fueron similares a las de la parte aérea. Cuantitativamente, los cambios más importantes fueron observados en la lisina, con una reducción del 41%, y en algunos ácidos orgánicos, como el succinato y citrato, que incrementaron, al igual que en la parte aérea, un 50% y 100% respectivamente (Figura 4.30 y Tabla Suplementaria 7). En cuanto a los azúcares solubles, el incremento fue superior al observado en la parte aérea, destacando el de la glucosa (230%) y la fructosa (290%).

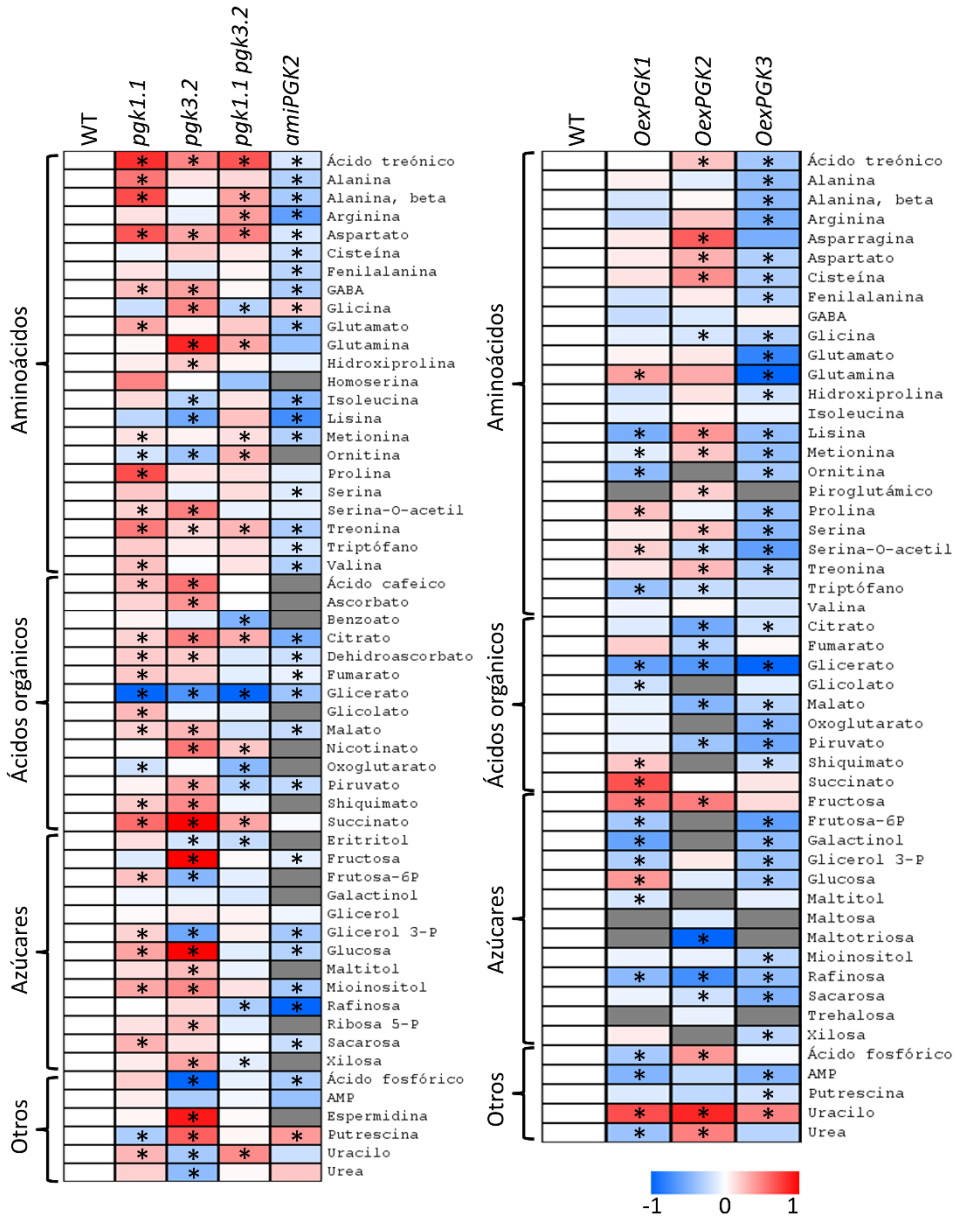


Figura 4.29. Niveles de metabolitos en las partes aéreas de las líneas de pérdida de función *pgk1.1*, *amiPGK2*, *pgk1.1 pgk3.2* y WT (a la izquierda) y las líneas sobreexpresoras *OexPGK1*, *OexPGK2*, *OexPGK3* y WT (a la derecha). Para el caso de las líneas sobreexpresoras y la línea *amiRNA* se muestra la media de dos líneas transgénicas independientes. Se representa el log2 de los valores relativos de metabolitos primarios ($5 \leq n \leq 12$). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto a las plantas WT ($P < 0,05$). El color azul denota valores inferiores a las plantas WT y rojo valores superiores. En gris aquellos metabolitos que no fueron determinados. Valores relativos recogidos en el Anexo (Tablas Suplementarias 5 y 6).

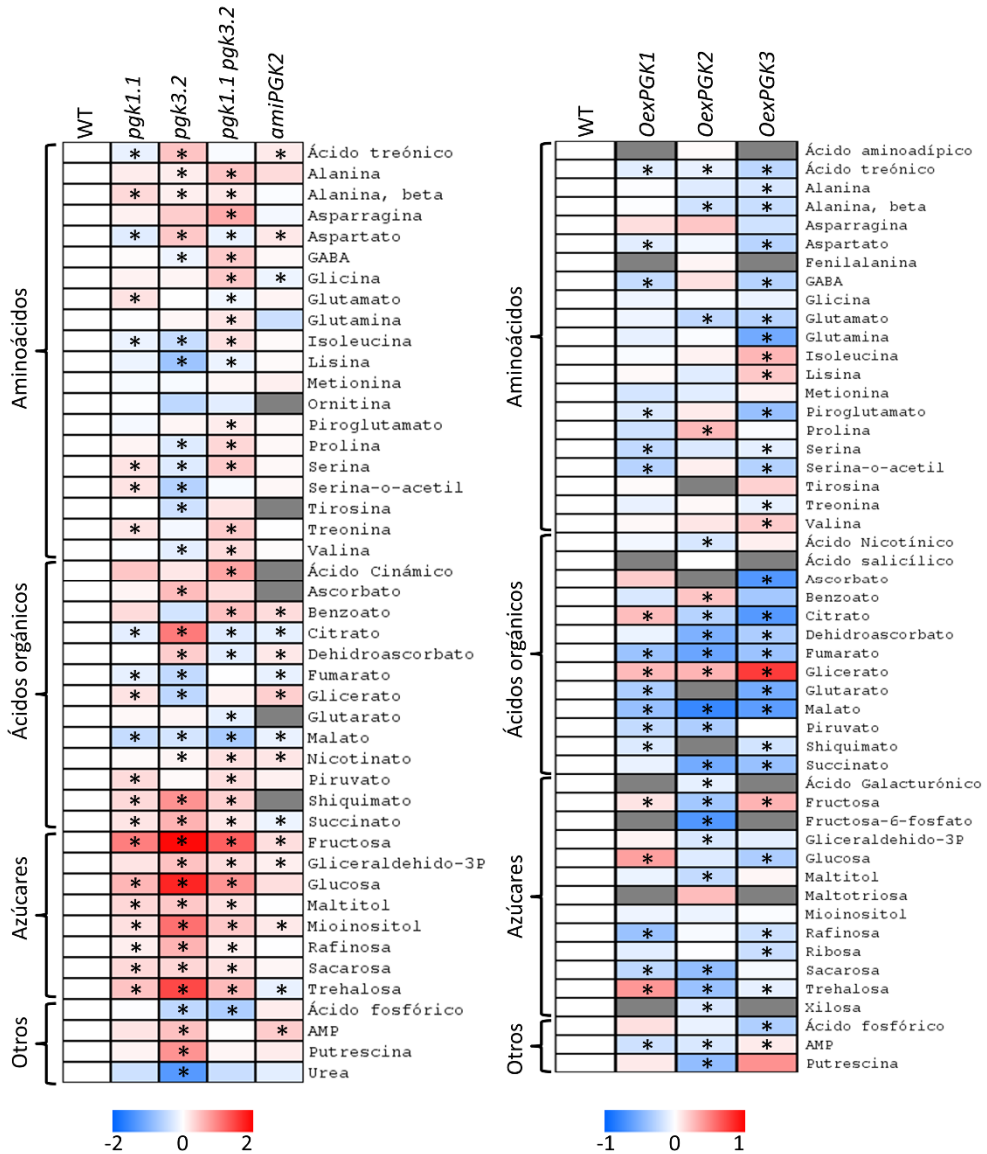


Figura 4.30. Niveles de metabolitos en las raíces de las líneas de pérdida de función *pgk1.1*, *amiPGK2*, *pgk1.1 pgk3.2* y WT (a la izquierda) y las líneas sobreexpresoras *OexPGK1*, *OexPGK2*, *OexPGK3* y WT (a la derecha). Para el caso de las líneas sobreexpresoras y la línea *amiRNA* se muestra la media de dos líneas transgénicas independientes. Se representa el log2 de los valores relativos de metabolitos primarios ($5 \leq n \leq 12$). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto a las plantas WT ($P < 0,05$). El color azul denota valores inferiores a las plantas control y rojo valores superiores. En gris aquellos metabolitos que no fueron determinados. Valores relativos recogidos en el Anexo (Tablas Suplementarias 7 y 8).

El perfil metabólico de las raíces de las líneas *OexPGK3* fue, de nuevo, opuesto al observado en las raíces del mutante *pgk3* (Figura 4.30 y Tabla Suplementaria 8). Así, mientras que el contenido en lisina aumenta, se reducen significativamente los niveles de succinato y citrato. El mismo comportamiento se observó con los azúcares, donde disminuye la glucosa y la mayoría de los determinados.

Los cambios más importantes en el ratio *OexPGK3/pgk3.2* se observaron en la isoleucina, lisina, valina y glicerato, que aumentan en las líneas sobreexpresoras y se reducen en el mutante. Por el contrario, los contenidos en citrato, succinato, glucosa, trehalosa y fructosa incrementan en el mutante y disminuyen en las líneas sobreexpresoras (Tabla 4.4).

El doble mutante *pgk1.1 pgk3.2*, que presentó un fenotipo de crecimiento y niveles de almidón intermedios entre los fenotipos de los mutantes simples *pgk1.1* y *pgk3.2*, mostró la misma tendencia en su perfil metabólico, como se deduce del estudio mediante PCA (Figura 4.28 y Tabla Suplementaria 5 del Anexo). En este sentido, se destaca que del análisis de los metabolitos a nivel individual no se observa un efecto aditivo de la doble mutación, sino un efecto compensatorio. Así, los contenidos en alanina, beta-alanina y prolina de la parte aérea del mutante *pgk1.1* incrementaron más de un 40% respecto al WT. Sin embargo, el nivel de estos metabolitos en el mutante *pgk3.2* no difirió significativamente respecto al encontrado en WT. En el doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* tampoco se encontraron diferencias significativas en los contenidos de estos metabolitos con respecto al control, o se observaron valores intermedios a los de los dos mutantes simples. En el mutante *pgk3.2*, los metabolitos que variaron su nivel más de un 40%, pero cuyo contenido no difirió respecto al WT en el mutante *pgk1.1* fueron la glutamina (80%) y la fructosa (160%) (Figura 4.29 y Tabla Suplementaria 5 del Anexo). En el doble mutante, el contenido en glutamina fue significativamente mayor que en el control, pero se redujo hasta el 30%, mientras que el de la fructosa no mostró diferencias significativas. Por otra parte, el sentido del cambio en el nivel de numerosos

metabolitos fue idéntico en los dos mutantes simples; sin embargo, sus contenidos en el doble mutante no fueron superiores a los de los mutantes simples sino intermedios o más parecidos al WT, lo que confirmaría el efecto compensatorio de la doble mutación. A continuación, se especifica el comportamiento de algunos de los metabolitos detectados. El nivel de succinato aumentó 50% y 120% en los mutantes *pgk1.1* y *pgk3.2*, respectivamente, mientras que en el doble mutante el incremento fue solo del 28%. El aspartato aumentó un 60% en *pgk1.1*, un 27% en *pgk3.2*, mientras que en el doble mutante alcanzó un valor intermedio del 40%. El nivel de o-acetil serina incrementó 13% y 40% en los mutantes simples *pgk1.1* y *pgk3.2* respectivamente, mientras que el del doble mutante no fue significativamente distinto al WT. El contenido en citrato de los mutantes *pgk1.1* y *pgk3.2* también fue un 13% y 40% mayor, respectivamente, que en el WT, mientras que en el mutante doble alcanzó un incremento del 25%. Finalmente, el incremento en el contenido en glucosa fue un 30% y 120% superior al del WT en los mutantes simples, pero en el doble mutante no difirió significativamente del contenido en el WT.

En raíces, donde los dos mutantes simples mostraron mayor contenido en azúcares que el WT, tampoco se observó un efecto aditivo, ya que los niveles de la mayoría de metabolitos analizados en el mutante doble fueron intermedios o inferiores a los de los mutantes simples *pgk1.1* y *pgk3.2* (Figura 4.30 y Tabla Suplementaria 7 del Anexo).

Finalmente, pasamos a comentar los perfiles metabolómicos de las líneas de ganancia y pérdida de función del gen *PGK2*. Los niveles de los metabolitos analizados en la parte de las plantas *amiPGK2* disminuyeron significativamente respecto al WT, aunque sólo la rafinosa mostró una disminución superior al 40% (Figura 4.29 y Tabla Suplementaria 5 del Anexo). En las líneas sobreexpresoras *OexPGK2*, el contenido en asparragina, fructosa y uracilo incrementó más de un 40% con respecto a las plantas WT. En general, los metabolitos que mostraron

comportamientos opuestos en líneas sobreexpresoras y silenciadas fueron aminoácidos (ácido treónico, aspartato, cisteína, lisina, metionina, serina y treonina), ácido fosfórico y fructosa (Tabla 4.4). Sin embargo, la mayoría de los ácidos orgánicos y el resto de azúcares siguieron el mismo patrón en las líneas silenciadas (*amiPGK2*) y sobreexpresoras (*OexPGK2*).

Los cambios en los niveles de la mayoría de los metabolitos detectados en las raíces de las líneas *amiPGK2* se situaron en torno al 10% de incremento y nunca fueron superiores al 40% (Figura 4.30). En relación con los niveles de aminoácidos, sólo se observaron diferencias significativas respecto al WT en los contenidos de ácido treónico, aspartato y glicina. Los cambios más generalizados se produjeron en intermediarios del ciclo de Krebs, como citrato, malato, fumarato, y succinato, cuyo contenido disminuyó, al igual que en parte aérea. Este patrón también se observó en las líneas sobreexpresoras, aunque en este caso los porcentajes de disminución fueron más acusados (30% o superior). En relación con los azúcares, los cambios más importantes afectaron a la fructosa, cuyo contenido aumentó significativamente en el mutante y disminuyó en las líneas sobreexpresoras, lo contrario que en parte aérea.

El análisis pormenorizado de los ratios de los valores relativos de metabolitos en las líneas mutantes y sobreexpresoras tanto en la parte aérea como en las raíces, puso de manifiesto que en las líneas *OexPGK3* la mayoría de estos ratios cambiaron en el mismo sentido en la parte aérea y en las raíces (Tabla 4.4). Así, en 27 metabolitos el ratio *OexPGK3/pgk3.2* varió en el mismo sentido, mientras que sólo en 7 lo hizo en sentido contrario. En el caso de las líneas *OexPGK1* solo 17 metabolitos cambiaron en el mismo sentido y 10 en sentido contrario y finalmente, en las líneas *OexPGK2*, 9 cambiaron en el mismo sentido, y 17 en sentido contrario.

Por otra parte, de los metabolitos que cambian significativamente tanto en las líneas sobreexpresoras como en los mutantes, la mayoría lo hicieron en sentido contrario en ambas líneas, tanto en parte aérea como en raíces en el caso de *PGK3*.

Así, más del 70% de los metabolitos con diferencias significativas tanto en las líneas *OexPGK3* como en el mutante *pgk3.2*, muestran una tendencia opuesta en ambas líneas, tanto en la parte aérea como en las raíces. Concretamente, de 52 metabolitos medidos en la parte aérea, 22 cambian significativamente en las *OexPGK3* y *pgk3.2*; y de ellos, 17 metabolitos (77%) muestran tendencia opuesta en las dos líneas. En raíces, de 45 metabolitos medidos, 23 cambian significativamente en las *OexPGK3* y en el mutante *pgk3.2*, y de ellos 17 metabolitos (74%) muestran tendencia opuesta en ambas líneas.

Esta tendencia opuesta no fue tan clara para las líneas con ganancia y pérdida de función de los genes PGK1 y PGK2, especialmente para PGK1. En este sentido, en la parte aérea de las líneas *OexPGK1* y *pgk1.1* solo 11 de los 52 metabolitos medidos cambia significativamente en las dos, y de ellos solo 4 van en sentido contrario. En raíces se observó un comportamiento similar.

Puesto que estudio del perfil metabólico de líneas de pérdida de función y sobreexpresoras de las isoformas plastidiales reveló que muchos de los cambios de metabolitos observados en el mutante *pgk1.1* y la línea silenciada *amiPGK2* no se compensaban en las líneas sobreexpresoras *OexPGK1* y *OexPGK2*, sino que seguían la misma tendencia en muchos casos (Tabla 4.4), se decidió estudiar con mayor detalle los fenotipos asociados a la sobreexpresión de las isoformas plastidiales PGK1 y PGK2 (Apartado 4.12).

Tabla 4.4. Ratio de los valores relativos de cada metabolito en las líneas sobreexpresoras (*OexPGK1*, *OexPGK2* y *OexPGK3*) con respecto a su línea de pérdida de función (*pgk1.1*, *amiPGK2* y *pgk3.2*). Los valores marcados con asterisco son aquellos cuyos valores relativos son significativamente diferentes a las plantas WT tanto en la línea sobreexpresora como en la línea de pérdida de función.

Metabolito	<i>OexPGK1/pgk1.1</i>		<i>OexPGK2/amiPGK2</i>		<i>OexPGK3/pgk3.2</i>	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
AMINOÁCIDOS						
Ácido treónico	0,6	1*	1,3*	0,8*	0,6*	0,6*
Alanina	0,7	0,9	1,1	0,8	0,7	0,8*
Alanina, beta	0,5	0,8	1,3	0,9	0,8	0,8*
Arginina	0,8	-	1,8	-	0,7	-
Asparagina	1,1	1,0	2,1	1,2	0,6	0,7
Aspartato	0,7	1,1*	1,4*	0,8	0,6*	0,6*
Cisteína	1,1	-	1,6*	-	0,7	-
Fenilalanina	0,8	-	1,3	0,9	0,9	-
GABA	0,7	0,8	1,1	1,0	0,8	0,9*
Glicina	1,1	0,9	0,8*	1,1	0,6*	0,9
Glutamato	0,8	0,8	1,4	0,8	0,6	0,8
Glutamina	1,3	0,9	1,7	1,3	0,3*	0,6
Hidroxiprolina	0,8	-	1,1	-	0,8*	-
Isoleucina	0,9	1,1	1,4	1,0	1,2	1,6*
Lisina	0,8	1,1	2,2*	0,9	1,1*	2*
Metionina	0,8*	0,9	1,4*	0,8	0,7	1,1
Ornitina	0,8*	1,3	-	-	1*	1,6
Piroglutámico	-	1,0	1,3	1,0	-	0,7
Prolina	0,7*	0,8	1,0	1,2	0,7	1,2
Serina	0,9	0,7*	1,3*	0,9	0,8	1,1*
Serina-O-acetil	1*	0,7*	0,9	1,0	0,5*	1,2*
Tirosina	-	1,0	-	-	-	1,5
Treonina	0,7	0,8	1,5*	1,0	0,7*	1,0
Triptófano	0,7	-	1*	-	0,8	-
Valina	0,8	1,0	1,3	1,0	0,9	1,3*
ÁCIDOS ORGÁNICOS						
Ascorbato	1,0	1,1	-	-	0,7	0,4*
Benzoato	0,8	0,7	-	1*	0,9	1,0
Citrato	0,8	1,4*	1*	0,9*	0,6*	0,3*
Dehidroascorbato	0,8	0,9	1*	0,6*	0,7*	0,6*
Fumarato	1,0	0,9*	0,9*	0,8*	0,9	1,1*
Glicerato	2,0	1*	0,8*	0,9*	0,7*	2,4*
Glicolato	0,7*	-	-	-	1,0	-
Malato	0,8	1*	0,8*	0,6*	0,7*	0,8*
Nicotinato	0,7	0,9	-	-	0,7	1,0
Oxoglutarato	1,1	-	-	-	0,7	-
Piruvato	0,9	0,7*	0,9*	0,7	0,5*	1,0
Shiquimato	1*	0,7*	-	-	0,6*	0,5*
Succinato	1,1*	0,8	1,0	0,8*	0,5	0,5*
AZÚCARES Y ALCOHOLES DE AZÚCAR						
Eritritol	0,9	-	-	-	1,0	-
Fructosa	1,6	0,5*	1,5*	0,7*	0,4	0,3*
Frutosa-6P	0,7*	-	-	0,7	0,9*	-
Galactinol	0,7	-	-	-	0,8	-
Gliceraldehído-3P	-	0,9	-	0,8*	-	0,7
Glicerol 3-P	0,7*	-	1,4	-	1,1*	-
Glucosa	1*	0,9*	1,1	0,8	0,4*	0,2*
Maltitol	0,8	0,8	-	0,9	0,8	0,8
Maltosa	-	-	1,2	-	-	-
Maltotriosa	-	-	1,2	0,9	-	-
Mioinositol	0,7	0,8	1,2	0,8	0,6*	0,5
Rafinosa	0,7	0,7*	1,6	1,0	0,7	0,6*
Ribosa	-	1,0	-	1,1	-	0,9
Sacarosa	0,8	0,7*	1*	0,7	0,7	0,8
Trehalosa	-	1*	1,2	0,9*	-	0,3*
Xilosa	1,0	-	-	0,8*	0,6*	-
OTROS						
Ácido fosfórico	0,7	1,1	1,7*	0,9	2,2	1,1*
AMP	0,7	0,8	1,1	0,7	0,9	0,8
Putrescina	1,1	1,0	0,6	0,7	0,6*	0,7
Uracilo	1,3*	-	2,1	1,2	1,8*	-
Urea	0,7	1,0	1,2	1,1	1,1	2,2

4.11. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS GENES DE LA FAMILIA *PGK* EN LAS DISTINTAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS

Una de las hipótesis iniciales de esta Tesis Doctoral fue que los genes de la familia *PGK* se encontraban estrechamente regulados entre sí. Por ello, se decidió investigar las variaciones de la expresión génica en las distintas líneas transgénicas. En primer lugar, se estudió la regulación génica en los mutantes simples *pgk1.1* y *pgk3.2* y el mutante doble *pgk1.1 pgk3.2*, tanto en plantas de 15-20 días de edad como en plantas de 30 días de edad (Figura 4.31). En plantas con 15-20 días de edad, la expresión de los genes *PGK2* y *PGK3* en los mutantes *pgk1.1*, no difiere de la observada en las plantas WT (Figura 4.31.A); en contraste, en plantas con 30 días de edad, ambos genes redujeron su expresión en comparación con la que muestran las plantas WT (Figura 4.31.B).

En el mutante *pgk3.2*, e independientemente de la edad de las plantas (15-20 días o 30 días), se observó la inducción del gen *PGK2*, que codifica para la isoforma glicolítica plastidial (PGK2). Por el contrario, el gen *PGK1* sólo se indujo en las plantas más jóvenes (Figura 4.31.A), aunque su expresión se redujo drásticamente, a niveles incluso menores que en el mutante *pgk1.1*, en plantas con 30 días de edad (Figura 4.31.B). Estos resultados apoyarían la disminución de la actividad fotosintética encontrada en este mutante (Apartado 4.9, Tabla 4.2). La edad de la planta no ejerció efectos notables sobre la expresión del gen *PGK2* en el mutante doble *pgk1.1 pgk3.2*.

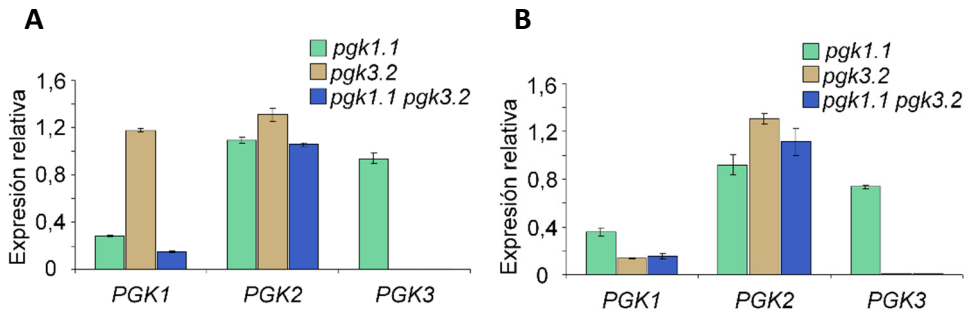


Figura 4.31. Expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de los genes de la familia *PGK* en los mutantes simples (*pgk1.1* y *pgk3.2*) y el mutante doble *pgk1.1 pgk3.2* (A) Plantas de 15-20 días crecidas en condiciones *in vitro*. (B) Plantas cultivadas en invernadero durante 30 días. Valores normalizados con respecto a las plantas control cuyo valor es igual a 1 (barras no mostradas). Se representa la media \pm SE ($n = 3$ réplicas biológicas independientes).

Los estudios de expresión de los genes *PGK* en la línea de silenciamiento génico *amiPGK2* y en las líneas sobreexpresoras de dichos genes se realizó en plantas de entre 15-20 días de edad crecidas en condiciones *in vitro*. Los estudios de expresión génica también se realizaron en plantas de las líneas sobreexpresoras de los genes *PGK1* y *PGK2* que mostraban un fenotipo de clorosis a los 30 días.

La expresión de los genes *PGK* en las líneas sobreexpresoras no difirió significativamente de la observada en las plantas WT (Figura 4.32). En la línea de silenciamiento génico *amiPGK2*, se produjo la inducción de los genes *PGK1* y *PGK3*. Los resultados obtenidos, en plantas de 30 días de edad, de las líneas sobreexpresoras de las isoformas plastidiales (*OexPGK1* y *OexPGK2*), mostraron que el fenotipo de clorosis está muy vinculado con una reducción severa de la expresión de los genes de la familia (Figura 4.33). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de las isoformas de la familia *PGK* tiene efectos negativos sobre el desarrollo; además parece clara la existencia de mecanismos de silenciamiento, a nivel transcripcional, que podrían estar relacionados con un adelanto de la senescencia (Apartado 4.12).

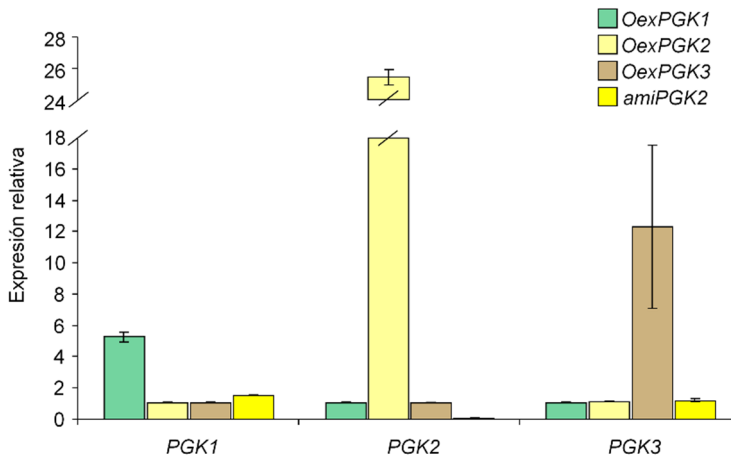


Figura 4.32. Expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de los genes de la familia *PGK* en las líneas sobreexpresoras (*OexPGK1*, *OexPGK2* y *OexPGK3*) y la línea de silenciamiento génico *amiPGK2* en plantas de 15-20 días crecidas en condiciones *in vitro*. Valores normalizados con respecto a las plantas control (1, barras no mostradas). Se representa la media \pm SE (n = 3 réplicas biológicas independientes).

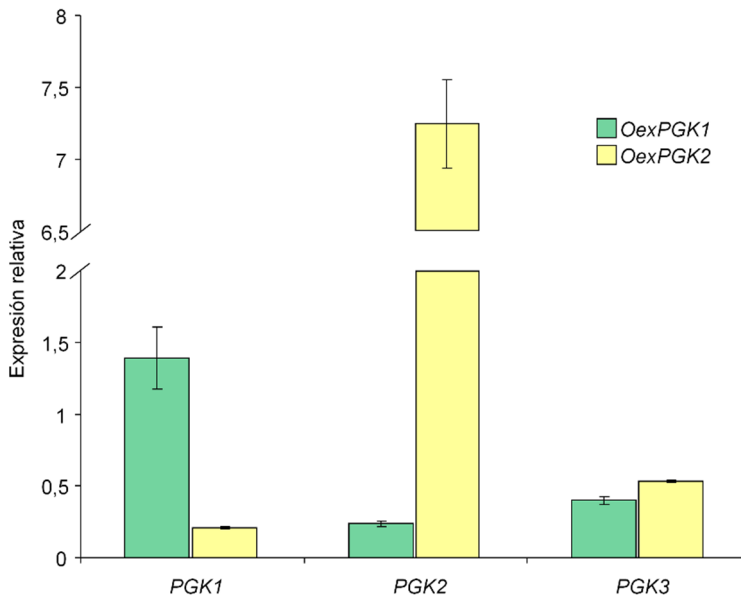


Figura 4.33. Expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de los genes de la familia *PGK* en las líneas sobreexpresoras de las isoformas plastidiales *OexPGK1* y *OexPGK2* en plantas crecidas en invernadero y que mostraban un fenotipo de clorosis a los 30 días de edad. Valores normalizados con respecto a las plantas control (1, barras no mostradas). Se representa la media \pm SE (n = 3 réplicas biológicas independientes).

4.12. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DEL FENOTIPO DE SENESCENCIA EN LAS LÍNEAS SOBREENPRESORAS DE LAS ISOFORMAS PLASTIDIALES DE LOS GENES *PGK1* Y *PGK2*.

Con el fin de determinar si los fenotipos de clorosis observados en las líneas sobreenpresoras de las isoformas plastidiales *PGK1* y *PGK2* están asociados a un adelanto de la senescencia, se evaluaron parámetros fenotípicos, moleculares y metabólicos en estas líneas.

El análisis visual demostró que cuando las plantas aún se encontraban en estadio de roseta, las líneas sobreenpresoras mostraban una gradación, tanto en el grado de clorosis foliar como en el momento de aparición de ésta. Esta variabilidad fue incluso evidente entre las diferentes plantas de una misma línea sobreenpresora (Figura 4.34. A). Aunque el gradiente en el grado de clorosis también se observó en el estadio adulto, todas las plantas sobreenpresoras (tanto de las líneas *OexPGK1* como *OexPGK2*) mostraron un adelanto de la clorosis con respecto a las plantas WT. En los individuos adultos, la clorosis apareció tanto en las hojas de la roseta como en las hojas caulinares más jóvenes. También se observó una correlación positiva entre el grado de sobreexpresión de los genes *PGK* y la incidencia de clorosis. En este sentido, las plantas *OexPGK2* fueron las que mostraron signos de clorosis más patentes (algunas plantas mostraban clorosis antes de alcanzar el estadio adulto) y senescencia precoz (Figura 4.34.B, C).

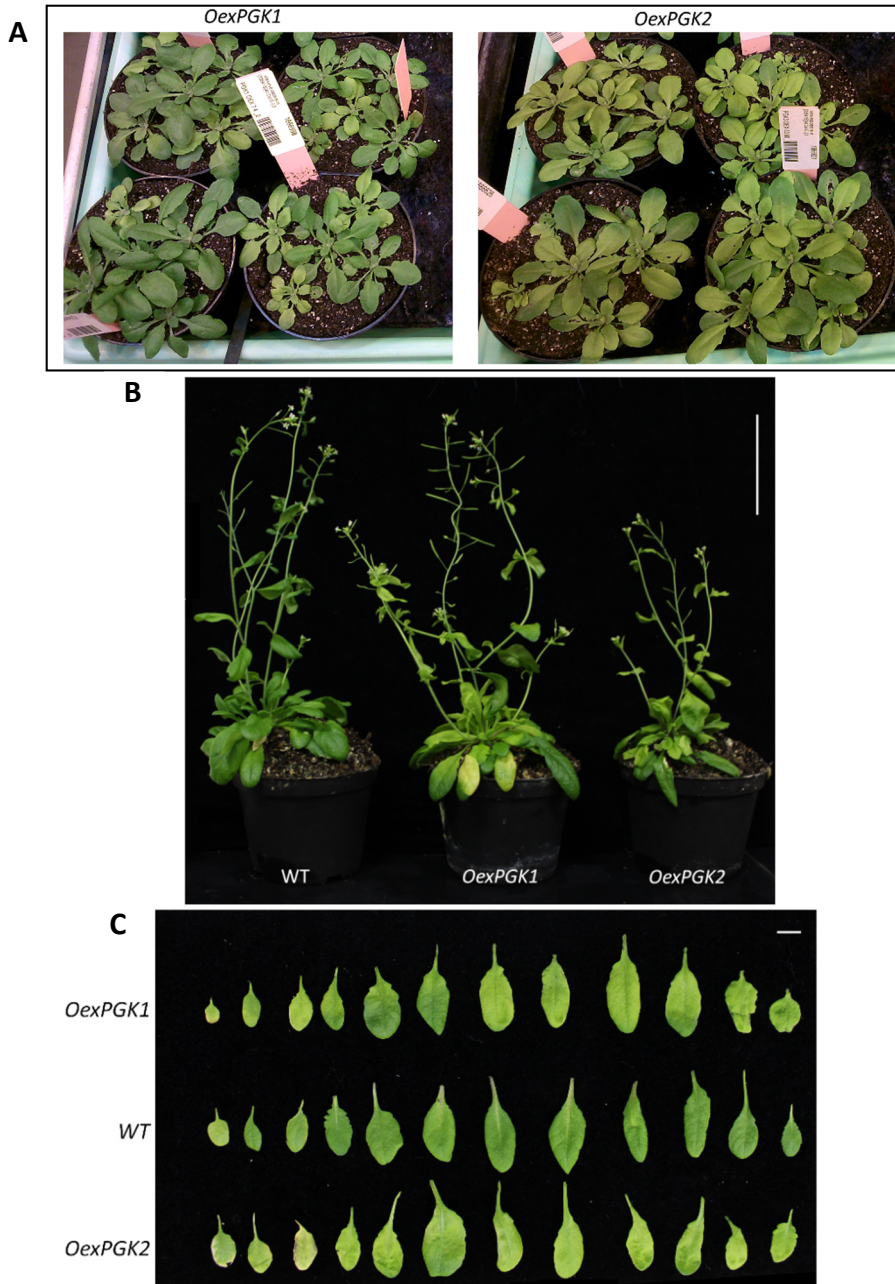


Figura 4.34. Fotografías de líneas sobreexpresoras de las isoformas plastidiales crecidas en invernadero. (A) Fenotipo donde se muestra la gradación de la clorosis en varias líneas de plantas sobreexpresoras *OexPGK1* (Izquierda) y *OexPGK2* (derecha) de cuatro semanas de edad. (B) Plantas *OexPGK1*, *OexPGK2* y WT de seis semanas de edad. Escala = 8 cm (C) Doce primeras hojas de la roseta por orden de emergencia de plantas de seis semanas de edad. Escala = 1 cm.

La senescencia precoz podría estar relacionado con un adelanto generalizado del desarrollo en las plantas sobreexpresoras de *PGK1* y *PGK2*, en comparación con las plantas WT. Corroborando lo anterior, se comprobó que aproximadamente el 50% de las plantas *OexPGK1* y *OexPGK2* ya habían desarrollado el tallo floral a los 23 días de edad (Figura 4.35.A) y las primeras flores aparecían a los 26 días, mientras que en las plantas WT estos procesos se iniciaban varios días más tarde (Figura 4.35.B).

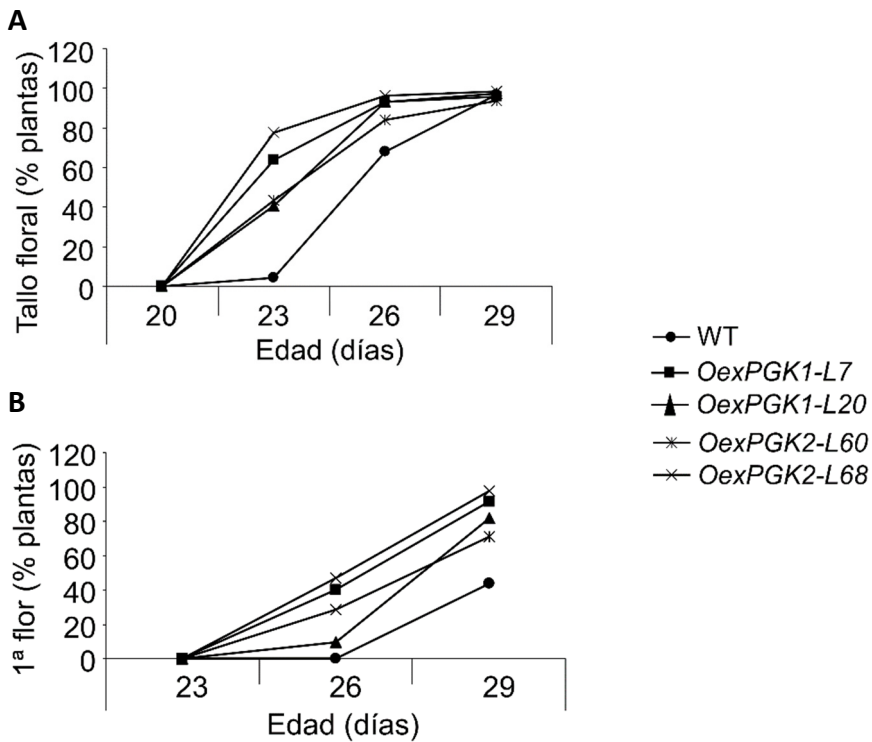


Figura 4.35. Cuantificación de parámetros fenotípicos en las plantas sobreexpresoras *OexPGK1-L7*, *OexPGK1-L20*, *OexPGK2-L60*, *OexPGK2-L68* y plantas silvestres (WT). (A) Porcentaje de plantas con tallo floral (B) Porcentaje de plantas en las que aparece la primera flor. n ≥ 60.

Como se indicó en el Apartado 4.11, la sobreexpresión de las isoformas plastidiales *PGK1* y *PGK2* podría conllevar un proceso de co-regulación de las otras isoformas a nivel de transcritos. Para confirmar esta hipótesis se realizó un Western blot de las líneas sobreexpresoras en estadio de roseta. Este experimento se llevó a cabo tomando, para cada línea transgénica, dos tipos de muestras diferenciadas por la ausencia o presencia de síntomas de clorosis. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las líneas sobreexpresoras que no presentaban síntomas de clorosis contenían más proteína que las líneas que expresaban el transgén bajo el control del promotor endógeno (Figura 4.36). No obstante, la aparición de los síntomas de clorosis coincidía con una drástica reducción del contenido en proteínas (Figura 4.36).

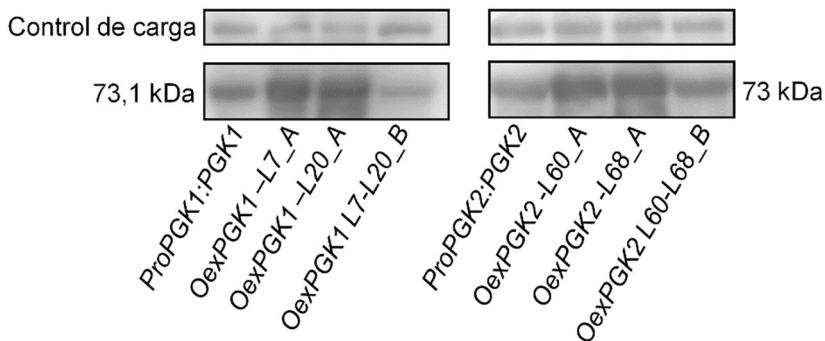


Figura 4.36. Western blot de proteínas de hojas de roseta de 30 días en líneas de promotor endógeno y sobreexpresoras para las isoformas plastidiales. Las bandas observadas se corresponden a la proteína de fusión PGK-GFP. A la izquierda se muestra contenido de PGK1 de la línea de promotor endógeno *ProPGK1:PGK1* y líneas sobreexpresoras *OexPGK1-L7_A*, *OexPGK1-L20_A* y *OexPGK1 L7-L20_B*. A la derecha se muestra el contenido proteico de la línea de promotor endógeno *ProPGK2:PGK2* y las líneas sobreexpresoras *OexPGK2-L60_A*, *OexPGK2-L68_A* y *OexPGK2 L60-L68_B*. En ambos casos se hicieron dos grupos de plantas: las muestras denotadas con la letra A se corresponden con plantas que no mostraban fenotipos senescentes en el momento de la recogida de la muestras y aquellas con la letra B con plantas que ya mostraban clorosis foliar. El control de carga está representado por bandas inespecíficas.

La siguiente fase de nuestro estudio fue evaluar el nivel de expresión de varios genes marcadores de senescencia en hojas de plantas que, fenotípicamente, no mostraban síntomas de clorosis. Para ello, se cuantificaron por RT-PCR cuantitativa los niveles de transcritos de los genes *AtSARK*, *SAG12*, *SAG113* y de los genes que codifican los factores de transcripción *ANAC092* (*ORESARA1*) y *WRKY6*. Los genes seleccionados se encuentran a diferentes niveles en las rutas de señalización que determinan procesos de senescencia. Los resultados obtenidos mostraron que en las líneas sobreexpresoras del gen *PGK1*, los niveles de inducción de los genes *SAG12*, *SAG113*, *WRKY6* y *ANAC092* fueron 10,6; 1,61; 1,44 y 1,43 veces, respectivamente, superiores a los encontrados en las plantas control (Figura 4.37). Para las líneas sobreexpresoras del gen *PGK2* también se observó inducción de los genes *SAG12* (2,81 veces), *SAG113* (1,60 veces), *WRKY6* (1,87 veces) y *SARK* (2,15 veces). Estos resultados demuestran que en todas las plantas que sobreexpresan las *PGK* plastidiales, incluso aquellas con síntomas mínimos de clorosis, se induce la senescencia precoz.

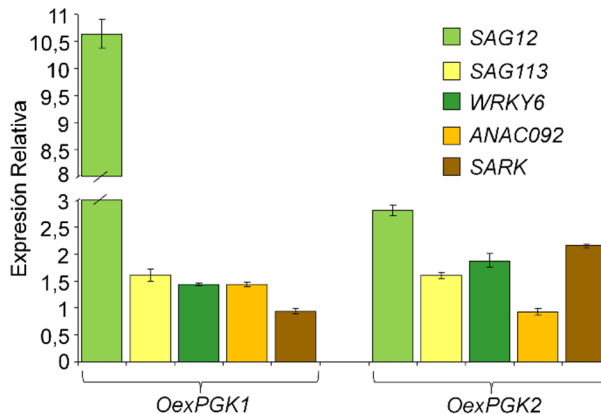


Figura 4.37. Expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de genes marcadores de senescencia *SAG12*, *SAG113*, *WRKY6*, *ANAC092* y *SARK* en las líneas sobreexpresoras *OexPGK1* y *OexPGK2*. Como material de partida se tomaron plantas en estadio de roseta. Valores normalizados con respecto a las plantas control silvestres que se le asigna valor 1. Se representa la media \pm SE (n = 3 réplicas biológicas independientes).

El estudio del perfil metabolómico de las líneas sobreexpresoras se realizó con dos objetivos claramente definidos: a) la búsqueda de posibles dianas metabólicas que estuvieran implicadas en la senescencia precoz, y b) la evidencia metabólica del proceso de senescencia. Como anteriormente, se tomaron muestras diferenciadas por la ausencia (líneas *Oex* denotadas con la letra A) o presencia (líneas *Oex* denotadas con la letra B) de síntomas de clorosis.

El PCA del perfil metabólico de las plantas *OexPGK1_A* y *OexPGK2_A*, mostró diferencias con respecto a las plantas WT, aunque menos definidas que las de las plantas *OexPGK1_B* y *OexPGK2_B* (Figura 4.38). En ambos casos, los dos grupos más separados del WT pertenecían a las líneas *OexPGK2*, mientras que los grupos más próximos eran los correspondientes al perfil de las líneas *OexPGK1*.

Para conocer el origen de esas diferencias, se determinaron los valores relativos de cada metabolito. En las líneas *OexPGK2_A* se observaron incrementos entre 10-22% en los niveles los aminoácidos leucina, serina, treonina y valina (Figura 4.39 y Tabla Suplementaria 9). Respecto a los ácidos orgánicos, en las líneas *OexPGK1_A*, sólo el nicotinato y malato disminuyeron significativamente su contenido. En las líneas *OexPGK2_A* fue evidente una disminución tanto en los niveles de fumarato, malato y succinato (entre 18-35%) como en los de nicotinato (aproximadamente un 40%).

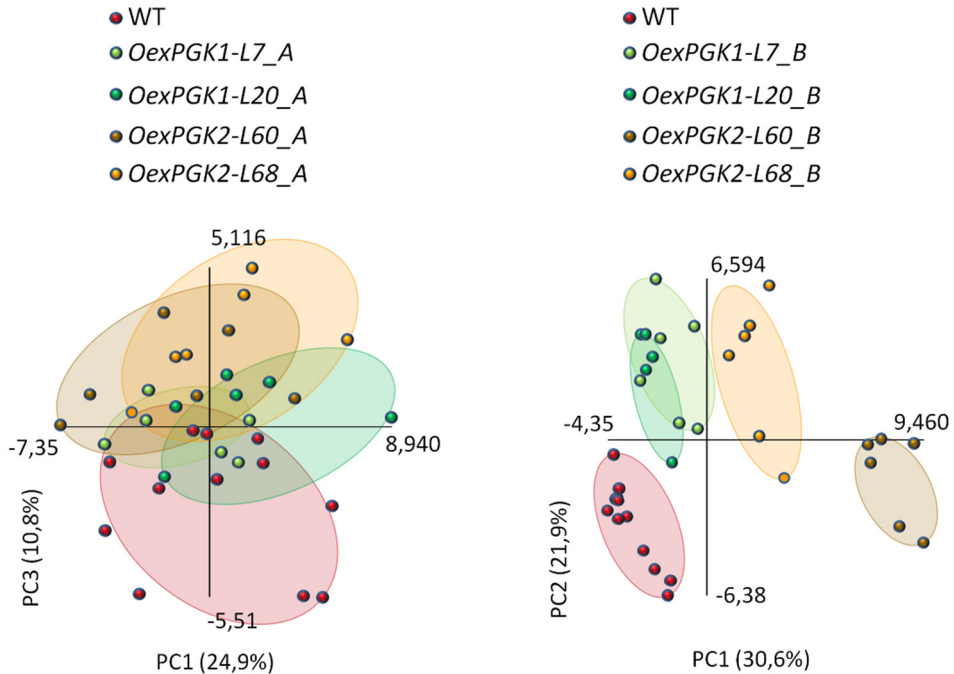


Figura 4.38. Análisis de los componentes principales (PCA). Se compara el perfil metabólico de dos líneas transgénicas independientes *OexPGK1* y *OexPGK2* y las plantas control (WT). A la izquierda y denotadas con la letra A, se corresponde con plantas que no presentaron síntomas de clorosis aparente en el momento de la recogida. A la derecha y denotadas con la letra B, se corresponde con plantas que sí mostraron clorosis. Plantas de 25 días crecidas en invernadero y en estadio de roseta.

En el perfil de azúcares se observó una mayor variabilidad entre las líneas. Las líneas *OexPGK1_A* mostraron tanto aumentos (más del 20%) en fructosa y rafinosa, como reducciones (más de un 30%) de galactinol. En la línea *OexPGK1-L20_A* también incrementaron los contenidos en ramnosa y sacarosa. En la línea *OexPGK2-L68A* sólo se observó un incremento (31%) en rafinosa y una disminución (26%) en xilosa, mientras que en la línea *OexPGK2-L60_A* se observó una disminución de ácido galacturónico, fucosa, maltosa, xilosa y galactinol, siendo este último el que se redujo en mayor medida (60%). En las plantas con signos de clorosis, el análisis de componentes principales mostró una mayor separación entre el perfil metabólico de plantas sobreexpresoras y las plantas WT (Figura 4.38). Además, este análisis

confirmó que los grupos se separaban según el nivel de sobreexpresión de las PGKs y que, incluso, era evidente una correlación con el grado de clorosis. Así, la línea *OexPGK2-L60_B*, con un mayor nivel de sobreexpresión y un fenotipo de clorosis más drástico, fue la más alejada del grupo control, seguida de la línea *OexPGK2-L68_B* y, finalmente, de las dos líneas *OexPGK1_B*, con un nivel de sobreexpresión y grado de clorosis similar (Apartado 4.5).

El cambio más generalizado de metabolitos se observó en los aminoácidos. En las líneas *OexPGK1_B* incrementó significativamente el contenido de más de la mitad de los aminoácidos cuantificados, mientras que en las líneas *OexPGK2_B* lo hicieron más de un 80% (Figura 4.39). Este aumento generalizado en los niveles de aminoácidos de todas las líneas sobreexpresoras sugiere la activación del fenómeno de proteólisis asociado al progreso de la senescencia. Nuevamente constatamos que los mayores incrementos en el contenido de aminoácidos se produjeron en las líneas con los fenotipos (síntomas de clorosis) más drásticos. Así, en la línea *OexPGK2-L60_B*, los contenidos en arginina, asparragina, fenilalanina, ornitina y treonina aumentaron más de un 100% con respecto a las plantas control. El incremento en beta-alalina, aspartato, glutamato, isoleucina, leucina, lisina, hidroxiprolina, tirosina y valina, aunque más moderado, fue superior al 40%. En la línea *OexPGK2-L68_B*, los aumentos superiores al 100% fueron observados en arginina, asparragina, ornitina y treonina, mientras que beta-alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina e hidroxiprolina aumentaron más del 40%. Los perfiles de aminoácidos en las dos líneas *OexPGK1_B* fueron muy similares; excepto para el triptófano, no se observaron incrementos del 100%; no obstante, la gran mayoría de los aminoácidos de estas dos líneas aumentaron más de un 20%.

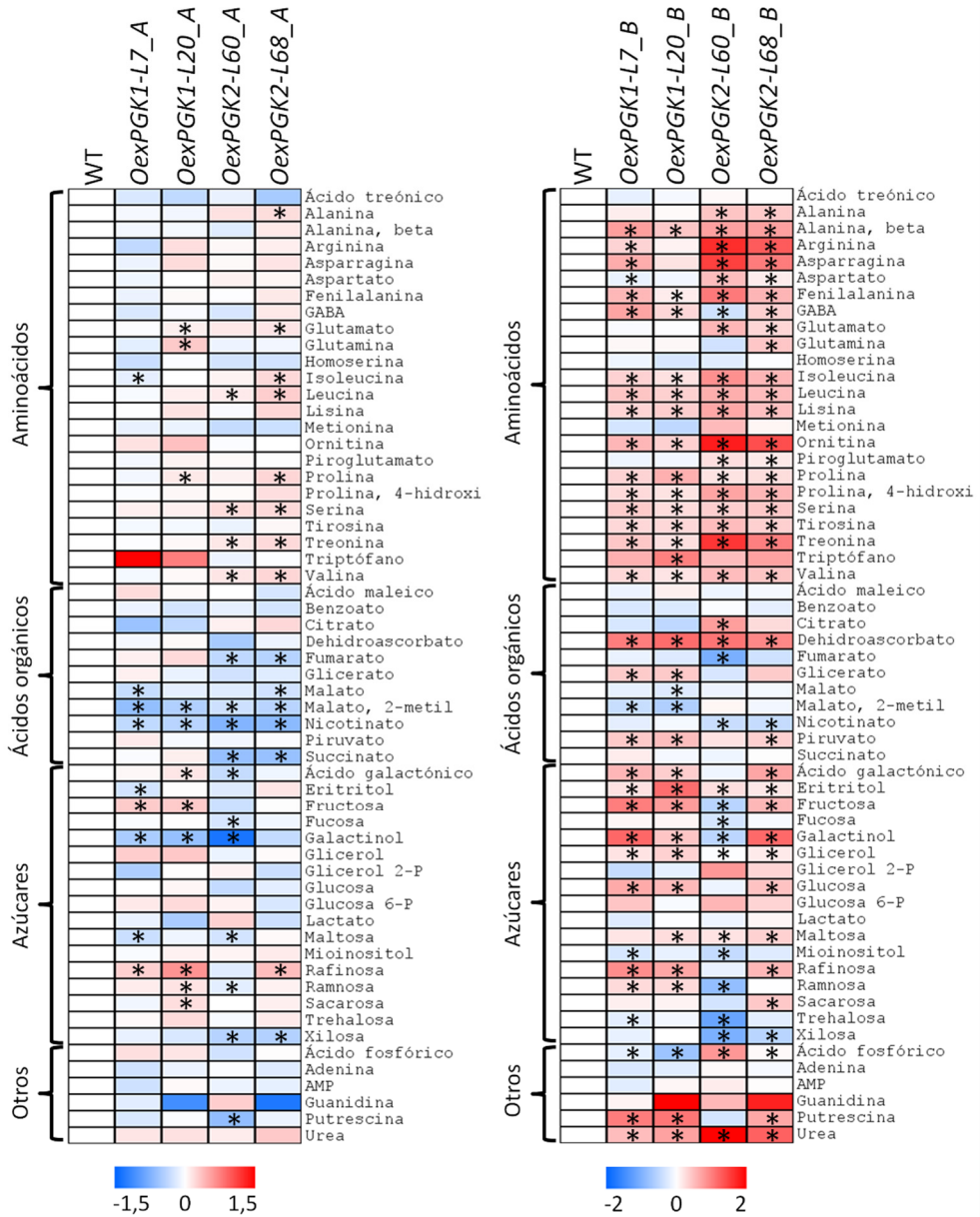


Figura 4.39. Niveles de metabolitos en plantas *OexPGK1*, *OexPGK2* y WT en estadio de roseta y crecidas en invernadero. Se muestran dos líneas transgénicas independientes para cada gen. A la izquierda y denotados con la letra A se recoge el perfil metabólico de plantas sin clorosis en el momento de la recogida y a la derecha (líneas denotadas por la letra B) el perfil metabólico de aquellas plantas que sí mostraron algún síntoma de clorosis. Se representa el log2 de los valores relativos de metabolitos primarios (n ≥ 6). Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al WT (P < 0,05). Color azul denota valores inferiores a las plantas control y rojo valores superiores. Valores relativos recogidos en el Anexo (Tabla Suplementaria 9).

En todas las líneas se detectaron incrementos significativos en el contenido de urea, lo que también es una evidencia experimental de la activación del catabolismo de proteínas. Los incrementos en el contenido en urea de las líneas *OexPGK2-L60_B*, *OexPGK2-L68_B*, *OexPGK1-L20_B* y *OexPGK1-L7_B* fueron 350%, 140%, 67% y 44%, respectivamente.

En relación a los ácidos orgánicos, se destaca que el contenido en dehidroascorbato de todas las líneas aumentó en más de un 90%, lo cual podría estar relacionado con un fenómeno de estrés oxidativo. En las líneas *OexPGK2_B* el contenido de nicotinato se redujo un 30%, mientras que las plantas *OexPGK1_B* mostraron un incremento superior al 30% en glicerato y piruvato, pero se redujo el contenido en malato.

Mientras que el contenido de aminoácidos incrementó en todas las líneas *OexPGK_B*, la dirección de los cambios en el contenido en azúcares dependió de la línea. Así, mientras que en la línea *OexPGK2-L60_B* se produjo una reducción de más del 30% en fructosa, galactinol, ramnosa, trehalosa y xilosa, en el resto de líneas incrementaron los niveles de más de la mitad de los azúcares cuantificados; los mayores incrementos se observaron en las líneas con un menor grado de clorosis, como *OexPGK1_B*. El contenido en fructosa aumentó un 100% y un 73% en las líneas *OexPGK1-L7_B* y *OexPGK1-L20_B*, respectivamente, mientras que en la línea *OexPGK2-L68_B* lo hizo en un 50%; la glucosa aumentó un 60% y un 47% en las líneas *OexPGK1_B* y un 40% en la línea *OexPGK2-L68_B*; la rafinosa aumentó un 87% y un 64% las líneas *OexPGK1_B* y un 48% en la línea *OexPGK2-L68_B*.

5. DISCUSIÓN

5.1 COMPARACIÓN DE LAS PGKs Y GAPDHs

El número de genes que codifican las distintas enzimas glicolíticas de *Arabidopsis* es muy variable (<http://www.arabidopsis.org/>). Así, la enzima TPI tiene solo dos anotaciones en las bases de datos, mientras que otras, como PGI, tiene hasta cuarenta. En investigaciones previas, nuestro grupo caracterizó varias isoformas de la GAPDH de *Arabidopsis* (Muñoz-Bertomeu y col., 2009; Muñoz-Bertomeu col., 2010; Anoman y col., 2015), enzima que cataliza la reacción anterior a la catalizada por la PGK en la glicólisis. GAPDH y PGK son las dos únicas enzimas glicolíticas que también participan en el ciclo de Calvin-Benson, aunque catalizando reacciones inversas a las de la glicólisis. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado siete isoformas de la GAPDH: dos de la glicólisis plastidial (GAPCp1 y GAPCp2), dos de la glicólisis citosólica (GAPC1 y GAPC2) y tres fotosintéticas (GAPA1, GAPA2, GAPB). De las PGKs, sin embargo, sólo encontramos tres isoformas, una citosólica y dos plastidiales. Las diferencias observadas, tanto en el número de isoformas como en su origen, ponen de manifiesto que los mecanismos de regulación pueden jugar un papel fundamental en la actividad de estas enzimas. Algunas enzimas del ciclo de Calvin-Benson, como GAPDH, fosforibuloquinasa (PRK), FBPasa y sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa (SBPasa), presentan mayor actividad durante día, debido un mecanismo de regulación post-traducciona dependiente de un sistema Fd/TRX (ferredoxina/tiorredoxina) (Buchanan, 1991; Buchanan y col., 2002; Schürmann y Buchanan, 2008). Tanto la disponibilidad de genomas como los recientes avances en proteómica, han permitido la identificación de numerosas isoformas de la familia de las TRXs, cuya función parece estar íntimamente relacionada con la regulación de la actividad del resto de enzimas del ciclo de Calvin-Benson; por ello, muy probablemente, muchos de los mecanismos de regulación post-traducciona de estas enzimas aún no han sido identificados (Lindahl y Florencio, 2003; Lemaire y col., 2004). En este sentido, recientemente, se ha demostrado que la actividad

PGK en *Phaeodactylum tricornutum* (Bosco y col., 2012), *Synechocystis* (Tsukamoto y col., 2013) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Morisse y col., 2014) también está regulada por TRXs. La nitrosilación y glutationilación también juegan un papel importante, tanto en la regulación del metabolismo como en los mecanismos de respuesta a estrés (Ito y col., 2003; Zaffagnini y col., 2012; Michelet y col., 2013). De hecho, la nitrosilación inhibe actividad de las GAPDH citosólicas y el estado nitrosilado es revertido por un mecanismo de glutationilación o por acción de TRXs (Holtgreffe y col., 2008; Zaffagnini y col., 2013). Recientemente, también se han identificado dianas de glicosilación y nitrosilación para las PGK plastidiales (Lindermayr y col., 2005; Zaffagnini y col., 2012; Morisse y col., 2014). Los mecanismos de regulación de las PGKs no se conocen con exactitud; en esta tesis, hemos demostrado que la sobreexpresión de las PGKs causa efectos drásticos en el metabolismo y desarrollo de *Arabidopsis*, evidenciando que estas enzimas deben tener mecanismos de regulación muy complejos, entre los que se incluye la regulación a nivel transcripcional. Estos mecanismos estarían relacionados con el origen bacteriano de las PGKs y podrían “cortocircuitarse” por el uso de promotores constitutivos fuertes. Como se discute más adelante, los cambios en los niveles de expresión de unas isoformas en respuesta a la sobreexpresión o subexpresión de otras, apoyarían la importancia de la regulación transcripcional de los genes de la familia PGK.

El doble mutante de las isoformas plastidiales glicolíticas de la GAPDH (*gapcp1 gapcp2*) es estéril y muestra un retraso severo del desarrollo, tanto de las partes aéreas como de la raíz. Sin embargo, en las líneas silenciadas de PGK2, isoforma que también participaría en la glicólisis plastidial, no se observan grandes diferencias fenotípicas con respecto a las plantas WT. Dado que los mutantes *gapcp1 gapcp2* son *knock-out* y las líneas *amiPGK2* son *knock-down*, este comportamiento diferencial de los dos tipos de mutantes podría estar relacionado con las variaciones observadas en los niveles de expresión génica. Inicialmente, se

obtuvieron dos mutantes *knock-out* para el gen *PGK2*, que habían sido descritos en las bases de datos como letales (Myouga y col., 2010); no obstante, en ninguno de los casos se pudo establecer una correlación clara entre los genotipos y fenotipos observados. A pesar de ello, la ausencia de otros mutantes *knock-out* de *PGK2* en las colecciones de mutantes disponibles, es un indicio de su letalidad.

También existen, por último, diferencias importantes entre los patrones de expresión de *GAPCps* y *PGKs*. Así, mientras que las isoformas glicolíticas plastidiales de la GAPDH (*GAPCps*) se expresan mayoritariamente en raíces, las isoformas fotosintéticas (*GAPA*, *GAPB*) lo hacen, casi exclusivamente, en las partes aéreas (*GAPA1* 0,4% o menos, *GAPA2* 1% o menos) (Muñoz-Bertomeu y col., 2009). En contraste, las dos isoformas plastidiales de la PGK tienen mayor expresión en las partes aéreas. La expresión de *PGK2* en las partes aéreas puede implicar no solo una función de la enzima en las células heterotróficas de este órgano, sino también una actividad en las células fotosintéticas, a diferencia de lo observado para las *GAPCps*, cuya falta de relevancia en células fotosintéticas fue previamente demostrada por nuestro grupo (Anoman y col., 2015).

5.2 FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA PGK Y SU IMPACTO EN LOS PROCESOS DEL DESARROLLO VEGETAL

El estudio de los patrones de expresión de los genes de la familia *PGK*, así como su localización intracelular da información sobre su posible función. Tanto *PGK1* como *PGK2* se localizan en los plastos; no obstante, mientras que *PGK1* se expresa en tejido fotosintético, *PGK2* también lo hace en tejido no fotosintético, aunque el mayor grado de expresión se observe en el fotosintético. *PGK3* se expresa, de forma bastante uniforme, en todos los tejidos, localizándose tanto en el citosol como en el núcleo. La localización nuclear de *PGK3*, podría indicar que esta enzima no solo participa en la ruta glicolítica, sino que también tiene funciones adicionales en el

metabolismo vegetal, como ya se ha demostrado en animales. Estos resultados, junto con los obtenidos en los análisis metabólicos y fotosintéticos de las distintas líneas, indican que PGK1 es la isoforma fotosintética mientras que PGK2 y PGK3 son las isoformas de la glicólisis plastidial y citosólica, respectivamente.

La actividad fotosintética y contenido en almidón de los mutantes del gen *PGK1* (*pgk1.1*) fueron menores que los de las plantas WT. Este resultado, confirmaría a PGK1 como la isoforma plastidial, que participa en la fotosíntesis. Por otra parte, los bajos valores de eficiencia cuántica máxima el PSII (Fv/Fm), medidos en el mutante a los 20 días, sugieren la existencia de un fenómeno de fotoinhibición o daño fotosintético. Este efecto negativo podría estar relacionado con una disminución de actividad de las enzimas PGK1 y GAPDH; como es bien sabido, ambas enzimas consumen la mayor parte del ATP y todo el NADPH requerido en el ciclo de Calvin-Benson, por lo que su baja actividad limitaría la regeneración de aceptores de electrones necesarios para el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico fotosintético. Obviamente, el menor tamaño del mutantes *pgk1.1* puede estar relacionado con su menor capacidad fotosintética y/o con los daños causados por la fotoinhibición. El efecto negativo sobre el crecimiento del mutante se observa más claramente en condiciones de invernadero, donde la intensidad luminosa es superior que en las cabinas de cultivo. En el invernadero, la mayor capacidad fotosintética del WT y/o su menor fotoinhibición acentuarían las diferencias de crecimiento entre ambas líneas.

Independientemente de las condiciones de cultivo (*in vitro* o invernadero), el mutante *pgk3.2* mostró una reducción, respecto al WT, en todos los parámetros de crecimiento medidos. Este efecto negativo puede estar relacionada con la incapacidad del mutante *pgk3.2* para metabolizar los carbohidratos utilizados en los procesos de crecimiento, ya que sus niveles de almidón fueron superiores a los del WT. En el muestreo realizado a los 20 días, la actividad fotosintética de las plantas (mutantes y WT) no difirió de forma significativa; sin embargo, a los 30 días,

el mutante mostró síntomas evidentes de fotoinhibición y/o daño fotosintético y una reducción drástica en su actividad fotosintética respecto al WT. Tanto la acumulación de almidón en el estroma plastidial, como de glucosa y fructosa en el citosol, unido a una reducción drástica de los niveles de Pi, afectaría negativamente a la fotofosforilación y conduciría a una retro-regulación negativa de la expresión de genes fotosintéticos (Paul y Pellny, 2003; Smith y Stitt, 2007; Stitt y col., 2010; McCormick y Kruger, 2015).

Puesto que la disminución y/o anulación de las actividades de las enzimas PGK1 o PGK3 reduce el crecimiento de los mutantes, cabría esperar que la reducción del crecimiento del doble mutante (*pgk1.1 pgk3.2*) fuese incluso más drástica, al verse afectada tanto su capacidad fotosintética como la de metabolizar los carbohidratos. Sin embargo, el doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* mostró un fenotipo intermedio entre los dos mutantes simples, no solo de su crecimiento sino también de su perfil metabólico. Este resultado, que descarta un efecto sinérgico de la doble mutación, apunta hacia un efecto compensatorio. Corroborando esta sugerencia, la expresión de *PGK2* y, especialmente, de *PGK3*, que codifican las isoformas glicolíticas, está reprimida en los mutantes *pgk1.1*. La represión de genes implicados en el catabolismo de azúcares también se ha observado en mutantes con un bajo contenido en almidón, y se ha relacionado con una respuesta adaptativa para evitar el agotamiento de las reservas de dicho polisacárido (Morcuende y col., 2005; Smith y Stitt, 2007).

La expresión de la isoforma fotosintética *PGK1* se redujo drásticamente en el mutante *pgk3.2*. Este comportamiento, evitaría la acumulación masiva de carbohidratos y explicaría el efecto compensatorio observado en la doble mutación. Cuando la actividad fotosintética es limitante, nuestros resultados indican que la planta tiende a reajustar las rutas catabólicas para compensar los efectos provocados por la falta o reducción de actividad anabólica. El crecimiento de la línea silenciada del gen *PGK2* fue similar al del WT. En contraste, esta línea

modificó su perfil metabólico en comparación con las plantas WT. A pesar de la baja expresión génica detectada, estas líneas silenciadas no son *knock-out*. Si tal como hemos sugerido, las mutaciones *knock-out* de *PGK2* son letales, es posible que niveles de expresión bajos del gen en la línea silenciada sean suficientes para conseguir una actividad enzimática capaz de enmascarar los fenotipos drásticos. Resultados similares se han obtenido con otras líneas silenciadas de enzimas del metabolismo primario, como por ejemplo la fosfoserina fosfatasa (PSP); en dichas líneas, reducciones importantes de los niveles de mRNA no causaron fenotipos drásticos, incluso cuando los mutantes *knock-out* de esas mismas enzimas eran letales (Cascales-Miñana y col., 2013). Por tanto, nuestros resultados demuestran que la estrategia de silenciamiento génico no funciona adecuadamente en enzimas metabólicas.

La sobreexpresión de *PGK1* o *PGK3* estimuló el crecimiento de *Arabidopsis*, aunque para el primer gen, este efecto positivo solo fue evidente durante las primeras semanas del desarrollo de las plantas. El mayor crecimiento de las plantas sobreexpresoras de *PGK1* podría relacionarse con el aumento de la actividad fotosintética en estas líneas. Sin embargo, la mayor actividad fotosintética de las líneas sobreexpresoras determina, a largo plazo, un efecto negativo sobre el desarrollo. Como se discute más adelante, es posible que la sobreexpresión de *PGK1* acelere el desarrollo e induzca la senescencia precoz. En contraste, la sobreexpresión de *PGK3* estimula el crecimiento de *Arabidopsis* sin producir un efecto negativo a largo plazo. De hecho, las plantas sobreexpresoras de *PGK3* tienen un tamaño superior a las plantas WT en todos los estadios del desarrollo estudiados, lo que resulta en una mayor producción de biomasa al final de su ciclo biológico. El mayor crecimiento de las plantas sobreexpresoras no estuvo asociado a un menor contenido de almidón, pero sí a una reducción drástica de los aminoácidos. Por tanto, la actividad PGK3, y por ende la glicólisis citosólica, podría

ser crucial para proporcionar mayor o menor disponibilidad de esqueletos carbonados utilizados en procesos de crecimiento.

5.3 IMPLICACIÓN DE LAS PGKs EN EL METABOLISMO PRIMARIO

El perfil metabólico de las líneas con ganancia y pérdida de función difirió entre las distintas líneas y respecto a sus WT. En general, los cambios más importantes se observaron en los mutantes, siendo menos drásticos en las líneas *Oex* y silenciadas. Cuando se comparó la tendencia de los cambios en los niveles de metabolitos en parte aérea y raíz, no siempre se observaron los mismos patrones de variación; además, en la mayoría de los casos, no se encontraron tendencias opuestas cuando se compararon las líneas con ganancia y pérdida de función. De hecho, y solo en el gen *PGK3*, se observó un efecto antagónico claro entre los mutantes y las líneas *Oex* para la mayoría de los metabolitos estudiados, siendo los cambios en metabolitos similares en parte aérea y raíces, lo que evidencia la misma función en tejidos fotosintéticos y heterotróficos.

Pese a lo expuesto, los cambios en los niveles de algunos metabolitos en las líneas de ganancia y pérdida de función de los genes *PGK1* y *PGK2*, no fueron siempre opuestos. Esta falta de correlación negativa podría deberse, en parte, a efectos pleiotrópicos asociados a la sobreexpresión de las enzimas *PGK1* y *PGK2*. Como se discute más adelante, la sobreexpresión de *PGK1* y *PGK2* afecta a los procesos de desarrollo de la planta e induce senescencia precoz, lo que explicaría la ausencia de efectos antagónicos entre la sobreexpresión y la pérdida de función de estas enzimas. Así, en la parte aérea de las líneas *OexPGK1* hay un incremento considerable de los azúcares mayoritarios (glucosa y fructosa), un resultado esperado asumiendo la participación de la enzima en el ciclo de Calvin-Benson. Estos cambios están directamente relacionados con la mayor actividad fotosintética observada de las líneas *Oex* en los primeros estadios de desarrollo. Sin

embargo, fue muy llamativo que los niveles de azúcares en el mutante no variaran (o aumentaran ligeramente), e incluso que algunos aminoácidos y ácidos orgánicos aumentaran significativamente. En las raíces del mutante *pgk1.1*, los aumentos más considerables, en relación con el resto de metabolitos, se produjeron en los niveles de azúcares. Estas alteraciones metabólicas sugieren una posible función de la enzima en la raíz *pgk1.1*. Corroborando lo anterior, y dado que las PGKs son enzimas reversibles, PGK1 podría tener actividad glicolítica en raíces. En este sentido, la reducción de la actividad de dicha enzima podría ser la causa de acumulación de azúcares solubles en el mutante. Además, el aumento de los niveles de azúcares en las raíces *pgk1.1* es similar al encontrado en el mutante glicolítico *pgk3.2*, lo que apoya una a función glicolítica de *PGK1* en este órgano. No obstante, hemos constatado que la proteína PGK1 tiene muy baja expresión en raíces y es posible que su actividad sea residual. Por ello, las alteraciones del metabolismo de la raíz en el mutante *pgk1.1* podrían ser la consecuencia de la falta de actividad de la enzima en la parte aérea. Lo expuesto, nos lleva a postular que los bajos niveles de almidón y los altos niveles de azúcares solubles, detectados en la parte aérea del mutante, podrían ser consecuencia de la salida, mediada por el translocador TPT, de 3-PGA del plasto, lo que disminuiría la síntesis de almidón en el estroma plastidial y favorecería la síntesis de azúcares solubles en el citosol. Estos azúcares serían transportados, vía floema, a la raíz, principalmente en forma de sacarosa, la cual sería reconvertida en otros azúcares que se acumularían también en este órgano. Otros trabajos realizados en mutantes con niveles reducidos de almidón, también muestran, como en nuestro caso, un incremento en azúcares solubles durante el día (Kunz y col., 2010; Schmitz y col., 2012). Se ha constatado que, en estos mutantes, se observan fenotipos más drásticos de crecimiento en condiciones de día corto, debido a que las reservas de almidón limitan los procesos de crecimiento cuando se incrementa la duración de la noche (Graf y Smith, 2011; Streb y Zeeman, 2012).

La característica más notable del perfil metabolómico del mutante *pgk3.2* fue un incremento generalizado de metabolitos, especialmente de azúcares solubles. Este resultado, unido al aumento en el contenido de almidón, confirmaría que la falta de función de la enzima ralentiza el metabolismo respiratorio. Por el contrario, la sobreexpresión de la enzima ocasiona una reducción generalizada de los niveles de azúcares y aminoácidos, fundamentalmente en la parte aérea, lo que podría estar asociado a una mayor actividad respiratoria y una utilización más rápida de los esqueletos carbonados.

En los mutantes *pgk3.2* también se produce un incremento en los niveles de los intermediarios del ciclo de Krebs, tanto en raíces como en la parte aérea, sucediendo lo opuesto en las líneas *OexPGK2*. Este resultado es, en principio, inesperado, ya que la falta de actividad PGK3 en el citosol impediría el suministro de intermediarios a esta ruta a partir de la glicólisis de las TP o hexosas. En los análisis de expresión de los genes de la familia *PGK* en mutantes *pgk3.2*, se observó una inducción del gen *PGK2*, lo que sugiere que la activación de la glicólisis plastidial es capaz de incrementar el aporte de sustratos para el ciclo de Krebs. Esta hipótesis, estaría apoyada por la reducción de los intermediarios del ciclo de Krebs observada en la parte aérea y raíces de las líneas de silenciamiento génico *amiPGK2*. Además, estudios recientes demuestran que, en tejidos heterotróficos, el translocador de fosfoenolpiruvato (PPT) funciona transportando dicho metabolito hacia el citosol (Staeher y col., 2014), lo que permitiría al plasto proporcionar sustratos para el ciclo de Krebs. En los tejidos fotosintéticos, las TP podrían llegar a formar 3-PGA en los cloroplastos, pero no PEP por la falta de actividad de las enzimas PGLm y ENO en estos orgánulos. En este caso, la presencia del translocador de triosas fosfato, permitiría exportar 3-PGA al citosol, el cual podría, mediante las dos últimas reacciones de la ruta glicolítica citosólica (PGLm y ENO) incorporarse también al ciclo de Krebs.

Estudios realizados con mutantes de la PSP también apoyan la hipótesis de que la ruta glicolítica plastidial proporciona intermediarios del ciclo de Krebs. La mencionada enzima cataliza la última reacción de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina; la inhibición de esta enzima también promovió un incremento de los intermediarios del ciclo de Krebs, debido a una mayor disponibilidad de 3-PGA en el estroma plastidial (Tesis doctoral de María Flores Tornero, datos no publicados). Todos estos resultados apoyarían, por tanto, la participación la glicólisis plastidial en el suministro de sustratos para el ciclo de Krebs.

Nuestros resultados también muestran cambios metabólicos importantes en las partes aéreas de los mutantes y líneas sobreexpresoras del gen *PGK3*. Aunque el grado de participación de la glicólisis en órganos fotosintéticos durante el día no se conoce convenientemente (Plaxton, 1996; Plaxton y Podestá, 2006), nuestros resultados sugieren que, en condiciones de luz, esta ruta glicolítica es necesaria en órganos fotosintéticos; en estos tipos celulares, la función principal de la glicólisis citosólica no sería proporcionar energía, sino aportar precursores de otras rutas con las que interaccionan, como por ejemplo las rutas de biosíntesis de aminoácidos.

El perfil metabólico de la línea silenciada *amiPGK2* no cambió, de forma drástica, respecto al observado en las plantas WT, sobre todo en raíces, donde ninguno de los metabolitos detectados varió más del 40%, lo que estaría de acuerdo con la ausencia de fenotipos de crecimiento alterado. Además, y al igual que en las líneas sobreexpresoras del gen *PGK1*, no todos los metabolitos analizados en los mutantes y líneas sobreexpresoras mostraron variaciones opuestas, como sí ocurrió en las líneas *Oex* y mutantes del gen *PGK3*. Así, los intermediarios del ciclo de Krebs disminuyen en las líneas *OexPGK2* y *amiPGK2*, tanto en raíces como en la parte aérea. Como se discute más adelante, estos cambios en el mismo sentido podrían reflejar alteraciones del desarrollo en las líneas sobreexpresoras que conducen, finalmente, a fenómenos de senescencia. Se destaca, no obstante, que algunos

metabolitos cambiaron en sentido contrario como, por ejemplo, la fructosa y la serina en la parte aérea. Uno de los cambios más interesantes en parte aérea es el de la serina que, junto con cisteína y metionina, bajan significativamente en las líneas *amiPGK2* y suben en las líneas *OexPGK2*, lo contrario que en el mutante *pgk1.1* y *OexPGK1*. Así, en la parte aérea del mutante *pgk1.1* incrementan los metabolitos derivados de serina, como glicina u o-acetil serina, pero se reducen en las *OexPGK1* junto con serina y cisteína. Todos estos cambios podrían estar relacionados con la actividad de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina. Estudios recientes demuestran, al respecto, que la glicólisis plastidial es esencial para proporcionar 3-PGA a la mencionada ruta. De esta manera, al estimular la ruta glicolítica plastidial, reduciendo, por ejemplo, la actividad de PGK3 y/o induciendo la actividad PGK2, aumentaría la disponibilidad de TP en el plasto, que serían metabolizadas por la vía glicolítica plastidial, proporcionando así sustratos para la biosíntesis de serina. La mayor disponibilidad de TP podría utilizarse además para el ciclo de Krebs o para la biosíntesis de almidón. Sin embargo, la estimulación de la glicólisis citosólica, como sucede en las líneas *OexPGK2*, conduce a una reducción de serina y de todos los metabolitos derivados de ella. Este cambio en los niveles de serina y sus metabolitos no se observó siempre en raíces, especialmente en las de las líneas *amiPGK2* y *OexPGK2*. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que, al menos para PGK1 y PGK2, las alteraciones asociadas a la mayor o menor actividad de la enzima depende, en gran medida, del órgano en el que actúe.

El análisis del perfil metabólico del doble mutante *pgk1.1 pgk3.2* confirmó el efecto compensatorio de la mutación de los dos genes. Así, los niveles de algunos de los metabolitos detectados en el mutante doble no fueron superiores a los encontrados en los mutantes simples, sino intermedios o más parecidos a los del WT. Estos resultados indican que el efecto de una mutación simple, que afecte a la capacidad fotosintética o a la actividad glicolítica, tiene consecuencias mayores para el desarrollo y metabolismo de la planta que la doble mutación, lo que

demuestra la importancia del equilibrio entre síntesis y degradación en el metabolismo vegetal. En este sentido, la reducción drástica de la expresión del gen *PGK1* en el mutante *pgk3.3* confirma que el metabolismo plastidial y citosólico están íntimamente conectados y que existen mecanismos de regulación que tienden a mantener el equilibrio entre biosíntesis y degradación.

5.4 LA SOBREENPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS PLASTIDIALES DE PGK INDUCE SENESCENCIA FOLIAR PRECOZ

Nuestros resultados demuestran, claramente, que la sobreexpresión de las isoformas plastidiales de PGK acelera los procesos de desarrollo y causa un adelanto de la senescencia foliar.

Las evidencias experimentales que relacionan la inducción de las actividades PGK1 y PGK2 con la senescencia foliar precoz en las plantas que sobreexpresan los genes *PGK1* y *PGK2* son: i) un adelanto en la inducción de la expresión de genes marcadores de senescencia (*SAG12*, *SAG113* y *SARK*, *WRKY6* y *ANACO92*); ii) la disminución en el contenido de almidón; y iii) una menor actividad fotosintética.

El análisis por Western blot de los niveles de las proteínas *PGK1* y *PGK2* en las líneas sobreexpresoras *OexPGK1* y *OexPGK2* de las plantas que mostraron signos de clorosis, así como el análisis, mediante RT-PCR cuantitativa, de los tres genes de la familia *PGK*, pone de manifiesto, como previamente se había discutido, la existencia de un mecanismo de regulación transcripcional, que reprime la expresión de todos los genes de la familia.

El análisis del perfil metabolómico de plantas con signos de clorosis foliar demuestra que durante el desarrollo de la senescencia se produce la acumulación de azúcares y una gran actividad proteolítica (Avila-Ospina y col., 2014). En este contexto, se observaron incrementos drásticos en los niveles de aminoácidos y urea que, junto con el agua y el ácido sulfhídrico, son productos del catabolismo de

proteínas (Hildebrandt y col., 2015). También se constató que los cambios cuantitativamente más importantes en el contenido de aminoácidos, observados en la línea *OexPGK2-L60_B*, estaban directamente relacionados con una mayor sobreexpresión del gen y con los fenotipos (síntomas de clorosis) más drásticos.

Las variaciones encontradas en el contenido de azúcares entre las líneas *OexPGK1* y *OexPGK2*, podrían estar relacionadas con fases distintas del proceso de senescencia. A este respecto, se ha demostrado que el contenido en azúcares varía ampliamente durante la senescencia, observándose aumentos en las fases iniciales y disminuciones en las fases finales del proceso (Masclaux y col., 2000; Watanabe y col., 2013).

El perfil metabólico de plantas que aún no mostraban síntomas de clorosis no evidenció un patrón característico o común capaz de explicar la inducción de los genes responsables de la senescencia y la inminente aparición de la clorosis foliar. Investigaciones futuras permitirán explicar los mecanismos moleculares responsables de la inducción de senescencia foliar precoz. No obstante, sugerimos que esta inducción podría ser resultado de uno o varios de los siguientes procesos: i) alteración en el balance del carbono exportado por el cloroplasto al citosol (Raines, 2011); ii) incremento del ratio C/N (Paul y Pellny, 2003; Wingler y col., 2004; Pourtau y col., 2006; O'Hara y col., 2013); y/o iii) estrés oxidativo causado por una mayor actividad metabólica en el cloroplasto (Lu y Finkel, 2008; Luo y col., 2011; Chen y col., 2015).

6. CONCLUSIONES

- 1) PGK1 se expresa, fundamentalmente, en tejido fotosintético, mientras que PGK2 lo hace tanto en tejido fotosintético como no fotosintético, aunque mayoritariamente en fotosintético. PGK3 se expresa en todos los tejidos con aproximadamente igual intensidad. PGK1 y PGK2 son isoformas plastidiales, mientras que PGK3 es citosólica y nuclear. Esta información, junto con el análisis metabólico y de actividad fotosintética de las distintas líneas, demuestra que PGK1 es la isoforma fotosintética mientras que PGK2 y PGK3 son las isoformas glicolíticas plasmidial y citosólica, respectivamente.
- 2) Los mutantes *pgk1.1* son más pequeños que las plantas silvestres mientras que las plantas sobreexpresoras tienen un tamaño superior. La reducción del tamaño de los mutantes *pgk1.1* puede estar relacionada con inhibición de la fotosíntesis por fotoinhibición, mientras que el mayor crecimiento en las sobreexpresoras puede deberse a una mayor actividad fotosintética. Sin embargo, la mayor actividad fotosintética durante los primeros estadios del desarrollo tiene un efecto negativo sobre el metabolismo de la planta a largo plazo; debido a ello, el aumento del tamaño de las plantas sobreexpresoras está limitado a las primeras semanas de desarrollo y no se traduce en un mayor crecimiento al final del ciclo biológico.
- 3) Los mutantes *pgk3.2* son más pequeños mientras que las sobreexpresoras de *PGK3* tienen un tamaño superior a las plantas silvestres en todos los estadios del desarrollo estudiados. La falta de su actividad incrementa los niveles de azúcares, lo que está probablemente asociado a una ralentización de la glicólisis y a una reducción del crecimiento del mutante. La sobreexpresión de la PGK3 tiene el efecto opuesto, acelerando los procesos de obtención de energía y el crecimiento de la planta. Por lo tanto, la actividad de la PGK3, y por ende la de la glicólisis citosólica, podría ser crucial para proporcionar

- mayor o menor disponibilidad de esqueletos carbonados en procesos de crecimiento.
- 4) La subexpresión o sobreexpresión de PGK1 y PGK2 tiene efectos distintos en el perfil metabólico de raíces y partes aéreas de Arabidopsis; en contraste, los cambios en los niveles de expresión de PGK3 producen cambios similares en el perfil metabólico de ambos órganos. En este sentido, la reducción de la expresión de PGK3 afecta los perfiles metabólicos de la parte aérea y raíz durante el día, lo que pone de manifiesto la necesidad de la ruta glicolítica citosólica en periodos donde la planta es fotosintéticamente activa, tanto en órganos autótrofos como heterótrofos.
 - 5) El doble mutante *pgk1.1 pgpk3.2* presenta fenotipos intermedios con respecto a los mutantes simples. No hay un efecto sinérgico de la doble mutación sino compensatorio. Se sugiere que la menor actividad fotosintética causada por la mutación de PGK1 reduce los niveles de carbohidratos que no pueden ser metabolizados correctamente, debido a la falta de actividad PGK3, lo que favorece el equilibrio entre biosíntesis y degradación de carbohidratos, recuperándose así la homeostasis metabólica.
 - 6) Nuestros resultados ponen de manifiesto tanto la complejidad como la plasticidad de las redes del metabolismo primario. En este sentido, se destaca que la glicólisis plastidial interacciona y se co-regula con la glicólisis citosólica. A su vez, los desequilibrios del metabolismo fotosintético tienden a corregirse mediante la regulación de las rutas glicolíticas. Por lo tanto, tanto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral apoyan que el metabolismo plastidial y citosólico están íntimamente conectados y que

existen mecanismos de regulación que tienden a mantener el equilibrio entre biosíntesis y degradación.

- 7) La sobreexpresión de las isoformas plastidiales de la PGK tiene efectos pleiotrópicos y conduce a la desregulación del equilibrio metabólico, lo que induce senescencia foliar precoz. Estudios posteriores aclararán los mecanismos moleculares implicados en este proceso.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ai J, Huang H, Lv X, Tang Z, Chen M, Chen T, Duan W, Sun H, Li Q, Tan R, y col.** (2011) FLNA and PGK1 are two potential markers for progression in hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem* **27**: 207-216
- Aliyev JA** (2012) Photosynthesis, photorespiration and productivity of wheat and soybean genotypes. *Physiol Plant* **145**: 369-383
- Anderson LE, Advani VR** (1970) Chloroplast and cytoplasmic enzymes: three distinct isoenzymes associated with the Reductive Pentose Phosphate Cycle. *Plant Physiol* **45**: 583-585
- Anderson LE, Bryant AJ, Carol AA** (2004) Both chloroplastic and cytosolic phosphoglycerate kinase isozymes are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma* **223**: 103-110
- Anoman DA, Muñoz-Bertomeu J, Rosa-Téllez S, Flores-Tornero M, Serrano R, Bueso E, Fernie R. A, Segura J, Ros Palau R** (2015) Plastidial glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an important determinant in the carbon and nitrogen metabolism of heterotrophic cells in Arabidopsis. *Plant Physiol* **169**: 1619-1637
- Archibald JM, Keeling PJ** (2003) Plant genomes: cyanobacterial genes revealed. *Heredity* **90**: 2-3
- Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C** (2014) Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J Exp Bot* **65**: 3799-3811
- Bauer J, Hiltbrunner A, Kessler F** (2001) Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**: 420-433
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* **15**: 330-336
- Berry JO, Yerramsetty P, Zielinski AM, Mure CM** (2013) Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynth Res* **117**: 91-120
- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by

- lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol **62**: 293-300
- Bertani G** (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. J Bacteriol **186**: 595-600
- Blake CCF, Rice DW** (1981) Phosphoglycerate Kinase. Philos Trans R Soc London B Biol Sci **293**: 93-104
- Bloom AJ** (2015) Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. Photosynth Res **123**: 117-128
- Bloom AJ, Burger M, Rubio-Asensio JS, Cousins AB** (2010) Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. Science **328**: 899-904
- Bobik K, Burch-Smith TM** (2015) Chloroplast signaling within, between and beyond cells. Front Plant Sci **6**: 781
- Boer PH, Adra CN, Lau YF, McBurney MW** (1987) The testis-specific phosphoglycerate kinase gene *pgk-2* is a recruited retroposon. Mol Cell Biol **7**: 3107-3112
- Bonen L, Doolittle WF** (1975) On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. Proc Natl Acad Sci USA **72**: 2310-2314
- Bosco MB, Aleanzi MC, Iglesias AA** (2012) Plastidic phosphoglycerate kinase from: *Phaeodactylum tricornutum* on the critical role of cysteine residues for the enzyme function. Protist **163**: 188-203
- Bringloe DH, Rao SK, Dyer TA, Raines CA, Bradbeer JW** (1996) Differential gene expression of chloroplast and cytosolic phosphoglycerate kinase in tobacco. Plant Mol Biol **30**: 637-406
- Brinkmann H, Martin W** (1996) Higher-plant chloroplast and cytosolic 3-phosphoglycerate kinases: a case of endosymbiotic gene replacement. Plant Mol Biol **30**: 65-75
- Buchanan BB** (1991) Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status,

- and future development. *Arch Biochem Biophys* **288**: 1-9
- Buchanan BB, Schürmann P, Wolosiuk RA, Jacquot JP** (2002) The ferredoxin/thioredoxin system: From discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth Res* **73**: 215-222
- Calvin M, Benson AA** (1948) The Path of Carbon in Photosynthesis. *Science* **107**: 476-480
- 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
- Caspar T, Huber SC, Somerville C** (1985) Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol* **79**: 11-17
- Chen D, Wang S, Xiong B, Cao B, Deng X** (2015) Carbon/nitrogen imbalance associated with drought-induced leaf senescence in sorghum bicolor. *PLoS One* **10**: 1-17
- Cheng SF, Huang YP, Chen LH, Hsu YH, Tsai CH** (2013) Chloroplast phosphoglycerate kinase is involved in the targeting of Bamboo mosaic virus to chloroplasts in *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Physiol* **163**: 1598-608
- Chiarelli LR, Morera SM, Bianchi P, Fermo E, Zanella A, Galizzi A, Valentini G** (2012) Molecular insights on pathogenic effects of mutations causing phosphoglycerate kinase deficiency. *PLoS One* **7**: e32065
- Chouchane L, Kabbage M, Chahed K, Hamrita B, Guillier CL, Trimeche M, Remadi S, Hoebeke J** (2008) Protein alterations in infiltrating ductal carcinomas of the breast as detected by nonequilibrium pH gradient electrophoresis and mass spectrometry. *J Biomed Biotechnol*. doi: 10.1155/2008/564127
- 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
- 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
- Danshina P V, Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD, Kitto GB, McCarrey JR, Eddy EM, O'Brien DA** (2010) Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. *Biol Reprod* **82**: 136-145
- Davies JM, Poole RJ, Sanders D** (1993) The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance. for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1141**: 29-36
- De La Riva GA., González-Cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo C** (1998) *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Electron J Biotechnol* **1**: 25-48
- Dellero Y, Jossier M, Schmitz J, Maurino VG, Hodges M** (2016) Photorespiratory glycolate–glyoxylate metabolism. *J Exp Bot* erw090
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349-1349
- Eickemeier P, Schlömer S, Farahani E, Kadner S, Brunner S, Baum I, Kriemann B** (2014) Climate Change 2014 Mitigation of climate change working group III contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flügge UI, Fischer K** (2002) The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the Cytosolic and the Plastidic Pentose Phosphate Pathways in plants. *Plant Physiol* **128** : 512-522
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based

- method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978-984
- Fischer K** (2011) The import and export business in plastids: transport processes across the inner envelope membrane. *Plant Physiol* **155**: 1511-1519
- Fischer K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbinger B, Weber A, Häusler RE, Flügge UI** (1997) A new class of plastidic phosphate translocators: A putative link between Primary and Secondary Metabolism by the Phosphoenolpyruvate/Phosphate antiporter. *Plant Cell* **9**: 453-462
- Fliege R, Flügge UI, Werdan K, Heldt HW** (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *BBA - Bioenerg* **502**: 232-247
- Fluet A** (2000) All about Arabidopsis. *Curr Biol* **10**: R468
- Flügge UI, Häusler RE, Ludewig F, Gierth M** (2011) The role of transporters in supplying energy to plant plastids. *J Exp Bot* **62**: 2381-2392
- Fridlyand LE, Backhausen JE, Scheibe R** (1999) Homeostatic regulation upon changes of enzyme activities in the Calvin cycle as an example for general mechanisms of flux control. What can we expect from transgenic plants? *Photosynth Res* **61**: 227-239
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158
- Gibon Y, Pyl E, Sulpice R, Lunn JE, Höhne M, Günther M, Stitt M** (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ* **32**: 859-874
- Givan C** (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol Rev* **74**: 277-309
- Graf A, Smith AM** (2011) Starch and the clock: The dark side of plant productivity.

- Trends Plant Sci **16**: 169-175
- Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM** (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. J Exp Bot **56**: 219-243
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol **166**: 557-580
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H** (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends Plant Sci **5**: 446-451
- Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun HP** (2015) Amino acid catabolism in plants. Mol Plant **8**: 1563-1579
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J** (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. MGG 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
- Hwang TL, Liang Y, Chien KY, Yu JS** (2006) Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Proteomics **6**: 2259-2272
- Innis MA, Gelfand DH** (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp 21-27
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**: 23-28
- IPCC** (2014) IPCC, 2014: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático.
- Ito H, Iwabuchi M, Ogawa K** (2003) The sugar-metabolic enzymes aldolase and

- triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: Detection using biotinylated glutathione. *Plant Cell Physiol* **44**: 655-660
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907
- Jones PG, Raines CA, Lloyd JC** (1995) Nucleotide sequence of a wheat chloroplastic phosphoglycerate kinase gene. *Plant Physiol* **107**: 1483-1484
- Joshi R, Karan R, Singla-Pareek SL, Pareek A** (2016) Ectopic expression of Pokkali phosphoglycerate kinase-2 (OsPGK2-P) improves yield in tobacco plants under salinity stress. *Plant Cell Rep* **35**: 27-41
- Kammerer B, Fischer K, Hilpert B, Schubert S, Gutensohn M, Weber A, Flügge UI** (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**: 105-117
- Kant S, Seneweera S, Rodin J, Materne M, Burch D, Rothstein SJ, Spangenberg G** (2012) Improving yield potential in crops under elevated CO₂: Integrating the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies. *Front Plant Sci* **3**: 162
- Knappe S, Löttgert T, Schneider A, Voll L, Flügge UI, Fischer K** (2003) Characterization of two functional *phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT)* genes in *Arabidopsis*—*AtPPT1* may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J* **36**: 411-420
- Kofler H, Häusler ER, Schulz B, Gröner F, Flügge UI, Weber A** (2000) Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Gen Genet MGG* **263**: 978-986
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary

- vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-396
- Köpke-Secundo E, Molnar I, Schnarrenberger C** (1990) Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplastic 3-phosphoglycerate kinase from spinach leaves. *Plant Physiol* **93**: 40-47
- Kötting O, Kossmann J, Zeeman SC, Lloyd JR** (2010) Regulation of starch metabolism: The age of enlightenment? *Curr Opin Plant Biol* **13**: 321-329
- Kunz HH, Häusler RE, Fettke J, Herbst K, Niewiadomski P, Gierth M, Bell K, Steup M, Flügge UI, Schneider A** (2010) The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biol* **12**: 115-128
- Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condrón R, Hogg PJ** (2000) Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* **408**: 869-873
- Lemaire SD, Guillon B, Le Maréchal P, Keryer E, Miginiac-Maslow M, Decottignies P** (2004) New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci United States Am* **101** : 7475-7480
- Lin JW, Ding MP, Hsu YH, Tsai CH** (2007) Chloroplast phosphoglycerate kinase, a gluconeogenic enzyme, is required for efficient accumulation of *Bamboo mosaic virus*. *Nucleic Acids Res* **35**: 424-432
- Lin TP, Caspar T, Somerville C, Preiss J** (1988) Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose Pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol* **86**: 1131-1135
- Lindahl M, Florencio FJ** (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc Natl Acad Sci* **100** : 16107-16112
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic Identification of S - Nitrosylated Proteins. *Plant Physiol* **137**: 921-930

- 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 D, Li W, Cheng J, Hou L** (2014) *AtPGK2*, a member of PGKs gene family in Arabidopsis, has a positive role in salt stress tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **120**: 251-262
- Liu Q, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ** (1998) The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol* **8**: 1300-1309
- Longstaff M, Raines CA, McMorrow EM, Bradbeer JW, Dyer TA** (1989) Wheat phosphoglycerate kinase: evidence for recombination between the genes for the chloroplastic and cytosolic enzymes. *Nucleic Acids Res* **17**: 6569-6580
- Lu T, Finkel T** (2008) Free radicals and senescence. *Exp Cell Res* **314**: 1918-1922
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**: 732-737
- Luo Y, Zou P, Zou J, Wang J, Zhou D, Liu L** (2011) Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK dependent manner. *Exp Gerontol* **46**: 860-867
- Mandel M, Higa A** (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162
- Masclaux C, Valadier MH, Brugière N, Morot-Gaudry JF, Hirel B** (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**: 510-518
- Maurino VG, Peterhansel C** (2010) Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 248-255
- McCarrey JR, Thomas K** (1987) Human testis-specific PGK gene lacks introns and

- possesses characteristics of a processed gene. *Nature* **326**: 501-505
- McCormick AJ, Kruger NJ** (2015) Lack of fructose 2,6-bisphosphate compromises photosynthesis and growth in *Arabidopsis* in fluctuating environments. *Plant J* **81**: 670-683
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R** (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **41**: W597-W600
- Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, y col.** (2013) Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* **4**: 470
- Morcuende R, Osuna D, Bla OE, Ho M, Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Günther M, Blasing OE, Gunther M, y col.** (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 3257-3281
- Morisse S, Michelet L, Bedhomme M, Marchand CH, Calvaresi M, Trost P, Fermani S, Zaffagnini M, Lemaire SD** (2014) Thioredoxin-dependent redox regulation of chloroplastic phosphoglycerate kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **289**: 30012-30024
- Mozo T, Fischer S, Shizuya H, Altmann T** (1998) Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol Gen Genet* **258**: 562-570
- 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**: 263-273
- Muñoz JF, Morán-Zorzano MT, Alonso-Casajús N, Baroja-Fernández E, Etxeberria E, Pozueta-Romero J** (2006) New enzymes, new pathways and an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatal Biotransformation* **24**: 63-76
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Irlés-Segura A, Mateu I, Nunes-Nesi A,**

- Fernie AR, Segura J, Ros R** (2010) 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-Fernández 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 Plant* **15**: 473-497
- Myouga F, Akiyama K, Motohashi R, Kuromori T, Ito T, Iizumi H, Ryusui R, Sakurai T, Shinozaki K** (2010) The Chloroplast Function Database: a large-scale collection of Arabidopsis Ds/Spm- or T-DNA-tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins, and their systematic phenotype analysis. *Plant J* **61**: 529-542
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: Epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J* **41**: 697-709
- Niewiadomski P, Knappe S, Geimer S, Fischer K, Schulz B, Unte US, Rosso MG, Ache P, Flügge UI, Schneider A** (2005) The Arabidopsis plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate Translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17**: 760-775
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science* **303**: 87-89
- O'Hara LE, Paul MJ, Wingler A** (2013) How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of Trehalose-6-Phosphate. *Mol Plant* **6**: 261-274

- Obata T, Fernie AR** (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci* **69**: 3225-3243
- Ouibrahim L, Mazier M, Estevan J, Pagny G, Decroocq V, Desbiez C, Moretti A, Gallois JL, Caranta C** (2014) Cloning of the *Arabidopsis rwm1* gene for resistance to *Watermelon mosaic virus* points to a new function for natural virus resistance genes. *Plant J* **79**: 705-716
- Paul MJ, Pellny TK** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot* **54**: 539-547
- Petersen B, Shuman S** (1997) DNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase: Hydrolysis and glycerololysis of the covalent protein-DNA intermediate. *Nucleic Acids Res* **25**: 2091-2097
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Plaxton WC** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 185-214
- Plaxton WC, Podestá FE** (2006) The functional organization and control of plant respiration. *CRC Crit Rev Plant Sci* **25**: 159-198
- Popanda O, Fox G, Thielmann HW** (1998) Modulation of DNA polymerases alfa, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* **1397**: 102-117
- Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A** (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**: 556-568
- Prabhakar V, Löttgert T, Gigolashvili T, Bell K, Flügge UI, Häusler RE** (2009) Molecular and functional characterization of the plastid-localized Phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **583**: 983-991
- Raines CA** (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynth Res* **75**: 1-10

- Raines CA** (2011) Increasing photosynthetic carbon assimilation in C3 plants to improve crop yield: current and future strategies. *Plant Physiol* **155**: 36-42
- Raines CA, Lloyd JC** (2001) C3 Carbon Reduction Cycle. *Encycl Life Sci* 1-5
- Raines CA, Lloyd JC, Dyer TA** (1999) New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; an important but neglected Calvin cycle enzyme. *J Exp Bot* **50**: 1-8
- Rius SP, Casati P, Iglesias AA, Gomez-Casati DF** (2006) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant lacking a cytosolic non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Mol Biol* **61**: 945-957
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425
- Sambrook J y Russell DW** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harb, NY, USA
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harb, NY, USA
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501-506
- Schmittgen TD, Livak KJ** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* **3**: 1101-1108
- Schmitz J, Heinrichs L, Scossa F, Fernie AR, Oelze ML, Dietz KJ, Rothbart M, Grimm B, Flügge U-I, Häusler RE** (2014) The essential role of sugar metabolism in the acclimation response of *Arabidopsis thaliana* to high light intensities. *J Exp Bot* **65**: 1619-1636
- Schmitz J, Schöttler MA, Krueger S, Geimer S, Schneider A, Kleine T, Leister D, Bell**

- K, Flügge UI, Häusler RE** (2012) Defects in leaf carbohydrate metabolism compromise acclimation to high light and lead to a high chlorophyll fluorescence phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **12**: 8
- Schneider A, Hausler RE, Kolukisaoglu U, Kunze R, van der Graaff E, Schwacke R, Catoni E, Desimone M, Flugge UI** (2002) An *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J* **32**: 685-699
- Scholl RL, May ST, Ware DH** (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 1477-1480
- Schürmann P, Buchanan BB** (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1235-1274
- Smith AM** (2012) Starch in the *Arabidopsis* plant. *Starch/Staerke* **64**: 421-434
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell Environ* **30**: 1126-1149
- Smith AM, Zeeman SC** (2006) Quantification of starch in plant tissues. *Nat Protoc* **1**: 1342-1345
- Smith EF, Townsend CO** (1907) A Plant-Tumor of bacterial origin. *Science* **25**: 671-673
- Snyder CS, Bruulsema TW, Jensen TL, Fixen PE** (2009) Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agric Ecosys Environ* **133**: 247-266
- Solomon S, Plattner G, Knutti R, Friedlingstein P** (2009) Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 1704-1709
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature* **280**: 833-836
- Staeher P, Löttgert T, Christmann A, Krueger S, Rosar C, Rolčik J, Novák O, Strnad M, Bell K, Weber APM, y col.** (2014) Reticulate leaves and stunted roots are

- independent phenotypes pointing at opposite roles of the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator defective in *cue1* in the plastids of both organs. *Front Plant Sci* **5**: 126
- Stitt M, Lunn J, Usadel B** (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - More than the icing on the cake. *Plant J* **61**: 1067-1091
- Streb S, Egli B, Eicke S, Zeeman SC** (2009) The debate on the pathway of starch synthesis: A closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway. *Plant Physiol* **151**: 1769-1772
- Streb S, Zeeman SC** (2012) Starch metabolism in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **10**: e0160
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729
- Tcherkez G, Bligny R, Gout E, Mahé A, Hodges M, Cornic G** (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO₂ and O₂ conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 797-802
- Timm S, Mielewicz M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H** (2012) High-to-low CO₂ acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. *PLoS One* **7**: e42809
- Timm S, Wittmiß M, Gamlien S, Ewald R, Florian A, Frank M, Wirtz M, Hell R, Fernie AR, Bauwe H** (2015) Mitochondrial dihydrolipoyl dehydrogenase activity shapes photosynthesis and photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **27**: 1968-1984
- 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

- Troncoso-Ponce MA, Rivoal J, Venegas-Calación M, Dorion S, Sánchez R, Cejudo FJ, Garcés R, Martínez-Force E** (2012) Molecular cloning and biochemical characterization of three phosphoglycerate kinase isoforms from developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Phytochem* **79**: 27-38
- Tsai HL, Lue WL, Lu KJ, Hsieh MH, Wang SM, Chen J** (2009) Starch synthesis in *Arabidopsis* is achieved by spatial cotranscription of core starch metabolism genes. *Plant Physiol* **151**: 1582-1595
- Tsukamoto Y, Fukushima Y, Hara S, Hisabori T** (2013) Redox control of the activity of phosphoglycerate kinase in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* **54**: 484-491
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR** (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* **20**: 1736-1737
- Voll L, Häusler RE, Hecker R, Weber A, Weissenböck G, Fiene G, Waffenschmidt S, Flügge UI** (2003) The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *Plant J* **36**: 301-317
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R** (2013) Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **162**: 1290-1310
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge UI** (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative Plastidic Glucose Translocator. *Plant Cell* **12** : 787-801
- Weber APM, Linka N** (2011) Connecting the plastid: transporters of the plastid envelope and their role in linking plastidial with cytosolic metabolism. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 53-77
- Weeden NF** (1981) Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J Mol Evol* **17**: 133-139

- Willard HF, Goss SJ, Holmes MT, Munroe DL** (1985) Regional localization of the phosphoglycerate kinase gene and pseudogene on the human X chromosome and assignment of a related DNA sequence to chromosome 19. *Hum Genet* **71**: 138-143
- Wind J, Smeekens S, Hanson J** (2010) Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochem* **71**: 1610-1614
- Wingler A, Marès M, Pourtau N** (2004) Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytol* **161**: 781-789
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV., Provart NJ** (2007) An «electronic fluorescent pictograph» Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: e718
- Zaffagnini M, Bedhomme M, Lemaire SD, Trost P** (2012) The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Sci* **185-186**: 86-96
- Zaffagnini M, Morisse S, Bedhomme M, Marchand CH, Festa M, Rouhier N, Lemaire SD, Trost P** (2013) Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **288** : 22777-22789
- Zar JH** (2010) *Biostatistical Analysis*, Fifth Edition. Prentice Hall, NJ, USA
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM** (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* **401**: 13-28
- Zieker D, Königsrainer I, Traub F, Nieselt K, Knapp B, Schillinger C, Stirnkorb C, Fend F, Northoff H, Kupka S, y col.** (2008) PGK1 a potential marker for peritoneal dissemination in gastric cancer. *Cell Physiol Biochem* **21**: 429-436
- Zieker D, Königsrainer I, Weinreich J, Beckert S, Glatzle J, Nieselt K, Bühler S, Löffler M, Gaedcke J, Northoff H, y col.** (2010) Phosphoglycerate kinase 1 promoting tumor progression and metastasis in gastric cancer - detected in a tumor mouse model using positron emission tomography/magnetic

resonance imaging. *Cell Physiol Biochem* **26**: 147-154

Zuckerkandl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. New York: Academic Press, pp 97-166

8. ANEXOS

Tabla Suplementaria 1. Lista de cebadores.

USO	GEN/DIANA	NOMBRE	SECUENCIA
Genotipado mutantes T-DNA	At3g12780 (PGK1)	GK_172A12-F	CCACAAGAAACTTGGCATTGG
		GK_172A12-R	CCTTCTCCCCCTCAAATCAG
		GK_908E11-F	CCACAAGAAACTTGGCATTGG
		GK_908E11-R	CCTTCTCCCCCTCAAATCAG
	At1g56190 (PGK2)	SALK_071724-F	GCGTTCGGGACTGCTCAC
		SALK_071724-R	CCTTTTTCGTTTCGAGTCTCTC
		SALK_016097-F	GAGGGGAGGGGGAAGAATTATG
	At1g79550 (PGK3)	SALK_016097-R	CATGATCAAGGATATAGTGCCGG
		SALK_066422-F	GAACACAGTTGACATCCTCTGC
		SALK_066422-R	GCAAGAGACAAATCATTGGTTG
	T-DNA SALK	SALK_062377-F	TGGTGTGAGGTTTGTCTCTC
		SALK_062377-R	GTTCCAGCAGCAAACCTTATCG
		T-DNA GK	Lbb1.3
		T-DNA GK	GABI8409
Análisis expresión de mutantes T-DNA y selección líneas sobreexpresoras y amiRNA	At3g12780 (PGK1)	At3g12780RT-F	CACTCCTTAAGTCCACCGGC
		At3g12780RT2-F	CTCATAAAATCTCAAATGGC
		At3g12780RT-R	GAGGGGAATTGGCAGAAGGG
		At3g12780TOex-F	ATGGCGAAGAAGAGCGTCGG
	At1g56190 (PGK2)	At3g12780TOex-R	GGGGTGACTCCCTTTGGCCTTCC
		At1g56190RT-F	CATCTCTTATTACACCTGAAGGGAC
		At1g56190RT-R	CCCTCCTCTATGGATTTGATG
		At1g56190TOex-F	ATTGTGCCAGCATCAGCCATTC
	At1g79550 (PGK3)	At1g56190TOex-R	CTGCTAGTTTATTCGCTACCGC
		At1g79550RT-F	CCTCACGTTGGATTTTCATCG
		At1g79550RT-R	GAGAGCCGTAGACGAAAATCTC
		At1g79550TOex-F	GAAGCCTTCAGTTGCTGGTTTCC
	At1g79550TOex-R	At1g79550TOex-R	GGCTTCTTGGGGTTTGCCAC
		At5g45890 (SAG12)	rtSAG12-F
At5g45890 (SAG12)		rtSAG12-R	CGTAGTGCACTCTCCAGTGAA
At5g59220 (SAG113)		rtSAG113-F	AACTGCATGTAGCGTCGTTTC
At1g62300 (WRKY6)	rtSAG113-R	CTGGCAAATCTCCTCTCCA	
	rtWRKY6-F	CAGTTCTCTGGTGGCTCTCC	
At5g39610 (AtNAC2/ORE1)	rtWRKY6-R	GTCAGCTGTGAGTGCCGTTA	
	rtNAC2-F	TCTTCCCAAAACAGCTAAGAACGA	
	rtNAC2-R	GGCTGGTTCCATTTCGGTTAATGTG	
	At4G30520 (AtSARK)	rt AtSARK-F	TCCATCGACCAGCTAAGCAGCCT
At4G30520 (AtSARK)	rtAtSARK R	AGCAGGGAAGGGCCAGACA	

Tabla Suplementaria 1. Continuación

USO	GEN/DIANA	NOMBRE	SECUENCIA
Clonaje para obtención de líneas transgénicas	At3g12780 (PGK1)	At3g12780GFP-F	ATGGCTTCCGCTGCCGCAAG
		At3g12780GFP-R	AACAGTGACTGGGATTGCTTCATC
		At3g12780PromHind3F	CCCAAGCTTCTATCGCTATCATGGGACGACGA
		At3g12780PromSpeR	GACTAGTAGCCATGTGGATCAATCAAAGAAG
		At3g12780PmeIProF	AGCTTTGTTAAACCTATCGCTATCATGGGACGACGA
		miR-I.AT3G12780	GATAAGTATACAGCGTTTGCCTTCTCTCTTTTGATTCC
		miR-II.AT3G12780	GAAGGGCAAACGCTGTATACTTATCAAAGAGAATCAATGA
		miR-III.AT3G12780	GAAGAGCAAACGCTGAATACTTTTACAGGTCGTGATATG
		miR-IV.AT3G12780	GAAAAGTATTCAGCGTTTGTCTTCTACATATATATTCCT
		miR-I.1AT3G12780	GATAAGTATACAGCGTCTGCCCTTCTCTTTTGATTCC
		miR-II.1AT3G12780	GAAGGGCAGACGCTGTATACTTATCAAAGAGAATCAATGA
		miR-III.1AT3G12780	GAAGAGCAGACGCTGAATACTTTTACAGGTCGTGATATG
		miR-IV.1AT3G12780	GAAAAGTATTCAGCGTCTGCTTCTACATATATATTCCT
	At1g56190 (PGK2)	At1g56190GFP-F	ATGGCTTCCACCGCCGCAACTGC
		At1g56190GFP-R	AACAGTGACTGGCGTTGCTTCATC
		At1g56190PromXbaI	TCGTCTAGACCCATTTGCATGGCAACAAC
		At1g56190PromNcoI	CATGCCATGGGTGAAGTCAACAGATAGTGAG
		At1g56190ProPmeI	AGCTTTGTTAAACCCCATTTGCATGGCAACAACC
		At1g56190RevProPacl	CCTTAATTAAGTGAAGTCAACAGATAGTGAGAGTGAAGTG
		miR-I.AT1G56190	GATAGAAACTCATTTAGGGGCGTCTCTCTTTTGATTCC
		miR-II.AT1G56190	GAACGCCCTAAATGAGTTTCTATCAAAGAGAATCAATGA
		miR-III.AT1G56190	GAACACCCCTAAATGTGTTTCTTACAGGTCGTGATATG
		miR-IV.AT1G56190	GAAAGAAACACATTTAGGGGTGTTCTACATATATATTCCT
		miR-I.1AT1G56190	TTGTTAAACAGTGAGTGGCGCTCTCTCTTTTGATTCC
		miR-II.1AT1G56190	GAGCGCACTCACTGTTTAAACAATCAAAGAGAATCAATGA
		miR-III.1AT1G56190	GAGCACCCTCACTGATTAACATTACAGGTCGTGATATG
	miR-IV.1AT1G56190	GAATGTTAATCAGTGAGTGGTCTCTACATATATATTCCT	
	At1g79550 (PGK3)	At1g79550GFP-F	ATGGCGACGAAGAGAAGCGTTGG
		At1g79550GFP-R	AGCTTCGTCGAGAGCGAGGACTCCTG
		At1g79550PromSpeI	GACTAGTCATAGTTGATTTCTCGTAAAAACAACT
		At1g79550PromHind3F	CCCAAGCTTGTGCTAGAATAAGCGTAGTTGTAG
		At1g79550ProPmeIFo	AGCTTTGTTAAACGTCGCTAGAATAAGCGTAGTTGTAG
		At1g79550PromSpeI	GACTAGTCATAGTTGATTTCTCGTAAAAACAACT
miR-I.AT1G79550		GATGTTAAGCCAATTATGCGTCTCTCTTTTGATTCC	
miR-II.AT1G79550		GAGCAGCATAATTGGCTTAAACATCAAAGAGAATCAATGA	
miR-III.AT1G79550		GAGCCCGCATAATTGCCCTTAACTTACAGGTCGTGATATG	
miR-IV.AT1G79550		GAAGTTAAGGCAATTATGCGGGCTCTACATATATATTCCT	
miR-I.1AT1G79550		GATTTAACGTAACATGCGGAGTCTCTCTTTTGATTCC	
miR-II.1AT1G79550		GACTCGCCATGTTTACGTTAAATCAAAGAGAATCAATGA	
miR-III.1AT1G79550		GACTAGCCATGTTTCTGTTAAATCAGGTCGTGATATG	
miR-IV.1AT1G79550	GAATTAACGAAAACATGGGCTAGTCTACATATATATTCCT		
pRS300	A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAAC	
pRS300	B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	

Tabla Suplementaria 2. Valores absolutos de expresión para el gen *PGK1* (At3g12780) en diferentes órganos o estadios de desarrollo, cada uno de ellos representado en la Figura 4.3. Categorías en orden decreciente según nivel medio de expresión absoluta \pm SD (error estándar). Datos generados por Affymetrix ATH1 y normalizado mediante el método GCOS. Tejidos muestreados por triplicado.

Órgano/estadio de desarrollo	Nivel de expresión
Hoja nº 7, mitad proximal	3778,03 \pm 124,29
Hoja nº 7, mitad distal	3424,46 \pm 225,05
Hoja 1+2	3342,18 \pm 55,850
Hoja de roseta, nº 8	3259,11 \pm 185,53
Hoja de roseta, nº 6	3258,46 \pm 126,35
Cotiledón	3121,06 \pm 125,80
Hoja de roseta, nº 10	3105,83 \pm 250,17
Hoja nº 7, peciolo	3018,11 \pm 106,92
Hoja de roseta, nº 12	2815,58 \pm 121,52
Roseta después de la floración	2779,43 \pm 89,83
Hoja de roseta, nº 4	2694,11 \pm 27,07
Flor, estadio 15, Pedicelos	2381,66 \pm 70,22
Hoja de roseta, estadio 2	2266,29 \pm 63,73
Flor, estadio 12, Sépalos	2235,83 \pm 71,10
Roseta vegetativa	2022,55 \pm 65,59
Hoja caulinar	1885,23 \pm 117,18
Semillas con silicuas, estadio 3	1652,51 \pm 47,99
Primer nódulo de ramificación	1473,11 \pm 19,70
Flor, estadio 10/11	1432,56 \pm 28,25
Semillas con silicuas, estadio 4	1395,90 \pm 13,94
Tallo, 2º internodo	1259,61 \pm 22,58
Flor, estadio 12	1251,75 \pm 52,13
Semillas con silicuas, estadio 5	1227,73 \pm 73,22
Flor, estadio 15, Carpelos	1136,28 \pm 15,85
Flor, estadio 12, Pétalos	1096,40 \pm 39,16
Flor, estadio 15, Sépalos	1056,08 \pm 35,19
Flor, estadio 15	1035,08 \pm 7,89
Semillas sin silicuas, estadio 6	1023,30 \pm 38,77
Flor, estadio 9	1000,93 \pm 25,13
Ápice vegetativo	999,41 \pm 36,65
Hipocotilo	941,58 \pm 24,68
Flor, estadio 15, Pétalos	889,54 \pm 27,81
Semillas sin silicuas, estadio 7	765,48 \pm 51,20
Flor, estadio 12, Carpelos	687,55 \pm 3,68
Hoja senescente	656,90 \pm 55,92
Ápice de transición	628,91 \pm 7,96
Flor, estadio 15, Estambres	618,88 \pm 21,07
Ápice de la inflorescencia	497,10 \pm 46,72
Flor, estadio 12, Estambres	355,83 \pm 23,20
Semilla embebida	336,01 \pm 24,64
Semillas sin silicuas, estadio 8	325,50 \pm 17,94
Semillas sin silicuas, estadio 10	223,36 \pm 10,50
Semillas sin silicuas, estadio 9	217,86 \pm 9,06
Semilla seca	215,45 \pm 3,86
Raíz (plántula)	209,08 \pm 10,86
Raíz	192,83 \pm 5,98
Polen maduro	68,56 \pm 3,71

Tabla Suplementaria 3. Valores absolutos de expresión para el gen *PGK2* (At1g56190) en diferentes órganos o estadios de desarrollo, cada uno de ellos representado en la Figura 4.4. Categorías en orden decreciente según nivel medio de expresión absoluta \pm SD (error estándar). Datos generados por *Affymetrix ATH1* y normalizados mediante el método GCOS. Tejidos muestreados por triplicado.

Órgano/estadio de desarrollo	Nivel de expresión
Flor, estadio 15, Pedicelos	1613,88 \pm 93,16
Hoja de roseta, nº 10	1536,05 \pm 59,65
Hoja de roseta, nº 8	1530,61 \pm 16,73
Hoja nº 7, mitad proximal	1481,05 \pm 27,85
Hoja 1+2	1474,68 \pm 58,13
Flor, estadio 12, Sépalos	1448,83 \pm 43,99
Hoja de roseta, nº 6	1405,53 \pm 50,88
Hoja de roseta, nº 12	1319,83 \pm 100,46
Cotiledón	1283,28 \pm 24,72
Hoja nº 7, mitad distal	1169,93 \pm 88,38
Semillas con silicuas, estadio 4	995,93 \pm 27,52
Roseta después de la floración	980,80 \pm 170,40
Hoja de roseta, nº 4	954,60 \pm 88,74
Semillas con silicuas, estadio 3	931,73 \pm 19,92
Hoja nº 7, peciolo	870,45 \pm 11,73
Flor, estadio 10/11	864,15 \pm 26,01
Roseta vegetativa	849,21 \pm 45,66
Semillas con silicuas, estadio 5	831,31 \pm 6,84
Flor, estadio 12	696,03 \pm 22,71
Semillas sin silicuas, estadio 6	549,48 \pm 13,13
Flor, estadio 15, Sépalos	530,00 \pm 16,19
Flor, estadio 9	493,13 \pm 19,69
Hoja de roseta, nº2	490,81 \pm 46,69
Primer nódulo de ramificación	472,83 \pm 18,42
Hoja caulinar	448,76 \pm 12,16
Flor, estadio 15, Carpelos	444,80 \pm 16,67
Flor, estadio 15	442,21 \pm 16,63
Flor, estadio 12, Pétalos	440,46 \pm 19,70
Semillas sin silicuas, estadio 7	422,38 \pm 6,00
Hipocotilo	345,53 \pm 21,79
Flor, estadio 12, Carpelos	301,11 \pm 11,93
Flor, estadio 15, Estambres	293,43 \pm 3,54
Tallo, 2º internodo	280,45 \pm 28,37
Ápice vegetativo	275,93 \pm 11,90
Ápice de transición	240,28 \pm 10,41
Raíz (plántula)	232,71 \pm 12,65
Ápice de la inflorescencia	230,69 \pm 8,81
Hoja senescente	215,91 \pm 11,56
Raíz	197,53 \pm 3,17
Flor, estadio 15, Pétalos	174,65 \pm 16,05
Flor, estadio 12, Estambres	167,88 \pm 9,83
Semilla embebida	145,66 \pm 9,24
Polen maduro	121,28 \pm 22,34
Semillas sin silicuas, estadio 8	87,60 \pm 1,98
Semillas sin silicuas, estadio 9	51,33 \pm 11,03
Semillas sin silicuas, estadio 10	42,90 \pm 8,33
Semilla seca	39,14 \pm 1,89

Tabla Suplementaria 4. Valores absolutos de expresión para el gen *PGK3* (*At1g79550*) en diferentes órganos o estadios de desarrollo, cada uno de ellos representado en la Figura 4.5. Categorías en orden decreciente según nivel medio de expresión absoluta \pm SD (error estándar). Datos generados por *Affymetrix ATH1* y normalizados mediante el método GCOS. Tejidos muestreados por triplicado.

Órgano/estadio de desarrollo	Nivel de expresión
Semillas con silicuas, estadio 5	1681,00 \pm 20,93
Raíz (plántula)	1656,36 \pm 89,96
Semillas sin silicuas, estadio 6	1615,15 \pm 56,14
Semillas con silicuas, estadio 4	1601,08 \pm 32,19
Flor, estadio 12, Pétalos	1587,40 \pm 34,45
Raíz	1520,46 \pm 33,42
Semilla embebida	1471,56 \pm 198,87
Flor, estadio 15, Sépalos	1457,93 \pm 93,50
Semillas sin silicuas, estadio 7	1333,65 \pm 41,70
Hipocotilo	1318,90 \pm 38,35
Ápice vegetativo	1313,61 \pm 23,12
Flor, estadio 12, Estambres	1299,20 \pm 38,55
Primer nódulo de ramificación	1225,80 \pm 53,50
Flor, estadio 12, Sépalos	1224,66 \pm 21,13
Flor, estadio 12, Carpelos	1144,51 \pm 31,06
Hoja nº 7, peciolo	1142,85 \pm 56,06
Flor, estadio 15, Pétalos	1123,16 \pm 51,07
Semillas con silicuas, estadio 3	1116,85 \pm 15,79
Ápice de la inflorescencia	1081,16 \pm 33,31
Ápice de transición	1058,95 \pm 19,21
Flor, estadio 15, Estambres	1054,98 \pm 7,81
Roseta vegetativa	1028,95 \pm 57,65
Flor, estadio 9	999,93 \pm 25,11
Cotiledón	993,68 \pm 47,66
Flor, estadio 15, Carpelos	981,45 \pm 2,99
Hoja nº 7, mitad proximal	974,79 \pm 9,52
Flor, estadio 12	971,76 \pm 21,68
Hoja de roseta, nº 10	964,56 \pm 8,79
Roseta después de la floración	961,36 \pm 28,23
Hoja de roseta, nº 12	954,11 \pm 28,12
Flor, estadio 15	942,18 \pm 8,96
Hoja de roseta, nº 8	937,84 \pm 11,88
Hoja de roseta, nº 6	916,85 \pm 41,62
Flor, estadio 10/11	914,16 \pm 9,45
Flor, estadio 15, Pedicelos	911,05 \pm 18,08
Hoja 1+2	878,28 \pm 12,24
Hoja de roseta, nº 4	789,65 \pm 31,36
Hoja nº 7, mitad distal	783,60 \pm 32,10
Hoja senescente	742,78 \pm 7,99
Tallo, 2º internodo	736,34 \pm 19,56
Semilla seca	697,18 \pm 30,56
Hoja de roseta, estadio 2	681,75 \pm 22,30
Semillas sin silicuas, estadio 8	652,61 \pm 34,70
Hoja caulinar	643,48 \pm 19,49
Semillas sin silicuas, estadio 9	553,66 \pm 35,11
Semillas sin silicuas, estadio 10	519,40 \pm 21,82
Polen maduro	297,50 \pm 87,10

Tabla Suplementaria 5. Niveles relativos de metabolitos en las partes aéreas de las líneas de pérdida de función *pgk1.1*, *pgk3.2* y *pgk1.1 pgk3.2* con respecto a su control (WT1) y *amiPGK2* con respecto a su control (WT2). Para el caso de *amiPGK2* se muestra la media de dos líneas transgénicas independientes. Se representa la media de los valores relativos \pm SE ($5 \leq n \leq 12$). En negrita se indican aquellos metabolitos que muestran diferencias significativas con respecto a sus plantas control ($P < 0,05$). ND, no determinado.

Metabolito	<i>pgk1.1</i>	<i>pgk3.2</i>	<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	WT1	<i>amiPGK2</i>	WT2	
AMINOÁCIDOS	Ácido treónico	1,77 \pm 0,09	1,40 \pm 0,09	1,60 \pm 0,13	1 \pm 0,04	0,90 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Alanina	1,46 \pm 0,06	1,08 \pm 0,06	1,11 \pm 0,04	1 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Alanina, beta	1,64 \pm 0,05	0,98 \pm 0,05	1,28 \pm 0,02	1 \pm 0,05	0,79 \pm 0,01	1 \pm 0,04
	Arginina	1,09 \pm 0,06	0,95 \pm 0,06	1,30 \pm 0,05	1 \pm 0,05	0,65 \pm 0,01	1 \pm 0,11
	Aspartato	1,59 \pm 0,03	1,27 \pm 0,03	1,41 \pm 0,06	1 \pm 0,02	0,90 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Cisteína	0,96 \pm 0,07	1,14 \pm 0,07	1,07 \pm 0,09	1 \pm 0,05	0,87 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Fenilalanina	1,08 \pm 0,03	0,93 \pm 0,03	1,03 \pm 0,03	1 \pm 0,03	0,83 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	GABA	1,20 \pm 0,03	1,29 \pm 0,03	1,02 \pm 0,05	1 \pm 0,06	0,80 \pm 0,04	1 \pm 0,07
	Glicina	0,87 \pm 0,03	1,38 \pm 0,03	0,82 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,15 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Glutamato	1,27 \pm 0,11	1,03 \pm 0,11	1,16 \pm 0,10	1 \pm 0,05	0,77 \pm 0,04	1 \pm 0,05
	Glutamina	1,02 \pm 0,10	1,82 \pm 0,10	1,27 \pm 0,37	1 \pm 0,05	0,76 \pm 0,05	1 \pm 0,15
	Hidroxiprolina	1,05 \pm 0,04	1,16 \pm 0,04	1,03 \pm 0,04	1 \pm 0,03	0,95 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Homoserina	1,40 \pm 0,61	1,00 \pm 0,61	0,76 \pm 0,49	1 \pm 0,31	ND	ND
	Isoleucina	1,11 \pm 0,04	0,82 \pm 0,04	1,08 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,73 \pm 0,02	1 \pm 0,04
	Lisina	0,84 \pm 0,02	0,68 \pm 0,02	1,18 \pm 0,03	1 \pm 0,06	0,60 \pm 0,03	1 \pm 0,09
	Metionina	1,09 \pm 0,03	1,04 \pm 0,03	1,09 \pm 0,03	1 \pm 0,01	0,81 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Ornitina	0,89 \pm 0,03	0,77 \pm 0,03	1,23 \pm 0,03	1 \pm 0,03	ND	ND
	Prolina	1,63 \pm 0,08	1,08 \pm 0,08	1,09 \pm 0,05	1 \pm 0,03	0,93 \pm 0,08	1 \pm 0,04
	Serina	1,17 \pm 0,07	0,95 \pm 0,07	1,10 \pm 0,07	1 \pm 0,06	0,92 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Serina-O-acetil	1,13 \pm 0,04	1,42 \pm 0,04	0,95 \pm 0,04	1 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	1 \pm 0,04
Treonina	1,44 \pm 0,05	1,13 \pm 0,05	1,22 \pm 0,04	1 \pm 0,03	0,80 \pm 0,01	1 \pm 0,02	
Triptófano	1,16 \pm 0,04	1,06 \pm 0,04	1,09 \pm 0,04	1 \pm 0,06	0,89 \pm 0,03	1 \pm 0,02	
Valina	1,19 \pm 0,02	0,99 \pm 0,02	1,08 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,81 \pm 0,02	1 \pm 0,03	
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Ácido cafeico	1,19 \pm 0,04	1,47 \pm 0,04	1,00 \pm 0,06	1 \pm 0,04	ND	ND
	Ascorbato	1,13 \pm 0,10	1,34 \pm 0,10	1,00 \pm 0,12	1 \pm 0,05	ND	ND
	Benzoato	1,03 \pm 0,07	0,93 \pm 0,07	0,71 \pm 0,03	1 \pm 0,06	ND	ND
	Citrato	1,13 \pm 0,03	1,41 \pm 0,03	1,25 \pm 0,16	1 \pm 0,02	0,70 \pm 0,02	1 \pm 0,09
	Dehidroascorbato	1,15 \pm 0,05	1,15 \pm 0,05	0,91 \pm 0,05	1 \pm 0,04	0,87 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Fumarato	1,16 \pm 0,05	1,14 \pm 0,05	0,93 \pm 0,07	1 \pm 0,05	0,94 \pm 0,02	1 \pm 0,01
	Glicerato	0,33 \pm 0,02	0,62 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,77 \pm 0,02	1 \pm 0,01
	Glicolato	1,21 \pm 0,07	0,96 \pm 0,07	0,94 \pm 0,04	1 \pm 0,03	ND	ND
	Isocitrato	ND	ND	ND	ND	0,75 \pm 0,05	1 \pm 0,15
	Malato	1,13 \pm 0,03	1,22 \pm 0,03	0,87 \pm 0,09	1 \pm 0,04	0,86 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Nicotinato	1,01 \pm 0,03	1,45 \pm 0,03	1,17 \pm 0,04	1 \pm 0,02	ND	ND
	Oxoglutarat	0,88 \pm 0,02	0,98 \pm 0,02	0,73 \pm 0,03	1 \pm 0,03	ND	ND
	Piruvato	1,04 \pm 0,03	1,26 \pm 0,03	0,82 \pm 0,03	1 \pm 0,02	0,85 \pm 0,04	1 \pm 0,05
Shiquimato	1,15 \pm 0,03	1,38 \pm 0,03	0,96 \pm 0,05	1 \pm 0,03	ND	ND	
Succinato	1,50 \pm 0,03	2,21 \pm 0,03	1,28 \pm 0,07	1 \pm 0,05	0,98 \pm 0,01	1 \pm 0,02	

Tabla Suplementaria 5. Continuación

Metabolito	<i>pgk1.1</i>	<i>pgk3.2</i>	<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	WT1	<i>amiPGK2</i>	WT2	
ÁZÚCARES Y ALCOHOLES DE AZÚCAR	Eritritol	1,09 ± 0,05	0,89 ± 0,05	0,86 ± 0,03	1 ± 0,03	ND	ND
	Fructosa	0,92 ± 0,03	2,64 ± 0,03	1,02 ± 0,16	1 ± 0,08	0,93 ± 0,02	1 ± 0,02
	Fructosa-6P	1,19 ± 0,04	0,72 ± 0,04	0,93 ± 0,06	1 ± 0,03	ND	ND
	Galactinol	0,97 ± 0,04	0,94 ± 0,04	0,90 ± 0,04	1 ± 0,04	ND	ND
	Glicerol	1,01 ± 0,05	1,06 ± 0,05	1,04 ± 0,08	1 ± 0,05	0,96 ± 0,05	1 ± 0,11
	Glicerol 3-P	1,13 ± 0,03	0,67 ± 0,03	1,05 ± 0,03	1 ± 0,03	0,78 ± 0,02	1 ± 0,03
	Glucosa	1,29 ± 0,04	2,13 ± 0,04	0,92 ± 0,10	1 ± 0,06	0,82 ± 0,04	1 ± 0,03
	Maltitol	1,10 ± 0,04	1,20 ± 0,04	0,95 ± 0,05	1 ± 0,03	ND	ND
	Maltosa	ND	ND	ND	ND	0,73 ± 0,03	1 ± 0,08
	Mioinositol	1,27 ± 0,04	1,38 ± 0,04	1,08 ± 0,06	1 ± 0,04	0,79 ± 0,01	1 ± 0,01
	Rafinosa	1,00 ± 0,04	1,10 ± 0,04	0,80 ± 0,05	1 ± 0,03	0,38 ± 0,03	1 ± 0,08
	Ribosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ribosa 5-P	1,08 ± 0,04	1,20 ± 0,04	0,93 ± 0,06	1 ± 0,02	ND	ND
	Sacarosa	1,24 ± 0,03	1,08 ± 0,03	1,00 ± 0,04	1 ± 0,03	0,86 ± 0,02	1 ± 0,05
	Trehalosa	ND	ND	ND	ND	0,81 ± 0,01	1 ± 0,02
Xilosa	1,05 ± 0,02	1,29 ± 0,02	0,93 ± 0,03	1 ± 0,02	ND	ND	
OTROS	Ácido fosfórico	1,14 ± 0,07	0,45 ± 0,07	0,94 ± 0,05	1 ± 0,05	0,79 ± 0,03	1 ± 0,04
	AMP	1,05 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,97 ± 0,11	1 ± 0,06	0,76 ± 0,03	1 ± 0,12
	Espermidina	1,03 ± 0,10	1,89 ± 0,10	1,02 ± 0,21	1 ± 0,08	ND	ND
	Guanidina	1,12 ± 0,23	0,92 ± 0,23	0,89 ± 0,15	1 ± 0,08	ND	ND
	Putrescina	0,80 ± 0,03	1,55 ± 0,03	1,03 ± 0,08	1 ± 0,03	1,32 ± 0,02	1 ± 0,13
	Uracilo	1,22 ± 0,06	0,79 ± 0,06	1,37 ± 0,05	1 ± 0,05	0,87 ± 0,07	1 ± 0,10
Urea	1,14 ± 0,09	0,74 ± 0,09	1,02 ± 0,05	1 ± 0,06	1,17 ± 0,10	1 ± 0,07	

Tabla Suplementaria 6. Niveles relativos de metabolitos en las partes aéreas de las líneas sobreexpresoras *OexPGK1* y *OexPGK3* con respecto a su control (WT1) y *OexPGK2* con respecto a su control (WT2). Se representa la media de los valores relativos \pm SE ($10 \leq n \leq 12$) de dos líneas transgénicas independientes. En negrita se indican aquellos metabolitos que muestran diferencias significativas con respecto a las plantas control ($P < 0,05$). ND, no determinado.

Metabolito	<i>OexPGK1</i>	<i>OexPGK3</i>	WT1	<i>OexPGK2</i>	WT2	
AMINOÁCIDOS	Ácido treónico	1,00 \pm 0,04	0,78 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,18 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Alanina	1,04 \pm 0,06	0,75 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,93 \pm 0,04	1 \pm 0,04
	Alanina, beta	0,89 \pm 0,04	0,74 \pm 0,02	1 \pm 0,05	1,02 \pm 0,04	1 \pm 0,04
	Arginina	0,85 \pm 0,07	0,70 \pm 0,03	1 \pm 0,05	1,17 \pm 0,11	1 \pm 0,11
	Aspargina	1,07 \pm 0,24	0,69 \pm 0,13	1 \pm 0,21	1,56 \pm 0,08	1 \pm 0,10
	Aspartato	1,06 \pm 0,04	0,81 \pm 0,02	1 \pm 0,02	1,24 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Cisteína	1,08 \pm 0,04	0,81 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1,36 \pm 0,04	1 \pm 0,02
	Fenilalanina	0,88 \pm 0,06	0,82 \pm 0,03	1 \pm 0,03	1,06 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	GABA	0,85 \pm 0,03	1,03 \pm 0,03	1 \pm 0,06	0,91 \pm 0,02	1 \pm 0,07
	Glicina	0,93 \pm 0,02	0,82 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,90 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Glutamato	1,04 \pm 0,11	0,57 \pm 0,06	1 \pm 0,05	1,07 \pm 0,05	1 \pm 0,05
	Glutamina	1,30 \pm 0,15	0,50 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1,26 \pm 0,13	1 \pm 0,15
	Hidroxiprolina	0,89 \pm 0,04	0,88 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,08 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Isoleucina	0,95 \pm 0,05	0,97 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,03 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Lisina	0,70 \pm 0,05	0,75 \pm 0,02	1 \pm 0,06	1,33 \pm 0,07	1 \pm 0,09
	Metionina	0,92 \pm 0,04	0,76 \pm 0,04	1 \pm 0,01	1,17 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Ornitina	0,74 \pm 0,04	0,79 \pm 0,02	1 \pm 0,03	ND	ND
	Piroglutámico	ND	ND	ND	1,14 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Prolina	1,18 \pm 0,04	0,75 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,96 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Serina	1,04 \pm 0,07	0,73 \pm 0,08	1 \pm 0,06	1,18 \pm 0,04	1 \pm 0,03
Serina-O-acetil	1,14 \pm 0,07	0,65 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,85 \pm 0,05	1 \pm 0,04	
Treonina	1,07 \pm 0,04	0,80 \pm 0,01	1 \pm 0,03	1,21 \pm 0,03	1 \pm 0,02	
Triptófano	0,76 \pm 0,04	0,86 \pm 0,03	1 \pm 0,06	0,86 \pm 0,02	1 \pm 0,02	
Valina	0,96 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	1 \pm 0,03	1,02 \pm 0,03	1 \pm 0,03	
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Citrato	0,91 \pm 0,06	0,87 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02	1 \pm 0,09
	Dehidroascorbato	0,98 \pm 0,08	0,84 \pm 0,08	1 \pm 0,04	0,88 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Fumarato	1,15 \pm 0,02	1,02 \pm 0,03	1 \pm 0,05	0,82 \pm 0,03	1 \pm 0,01
	Glicerato	0,66 \pm 0,02	0,46 \pm 0,01	1 \pm 0,03	0,63 \pm 0,01	1 \pm 0,01
	Glicolato	0,87 \pm 0,02	0,93 \pm 0,03	1 \pm 0,03	ND	ND
	Isocitrato	ND	ND	ND	1,29 \pm 0,15	1 \pm 0,15
	Malato	0,94 \pm 0,03	0,83 \pm 0,03	1 \pm 0,04	0,72 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Nicotinato	0,72 \pm 0,03	1,00 \pm 0,02	1 \pm 0,02	ND	ND
	Oxoglutarato	0,95 \pm 0,04	0,72 \pm 0,03	1 \pm 0,03	ND	ND
	Piruvato	0,95 \pm 0,03	0,68 \pm 0,03	1 \pm 0,02	0,77 \pm 0,03	1 \pm 0,05
	Shiquimato	1,17 \pm 0,04	0,86 \pm 0,01	1 \pm 0,03	ND	ND
	Succinato	1,61 \pm 0,06	1,07 \pm 0,02	1 \pm 0,05	1,00 \pm 0,04	1 \pm 0,02

Tabla Suplementaria 6. Continuación

Metabolito	<i>OexPGK1</i>	<i>OexPGK3</i>	WT1	<i>OexPGK2</i>	WT2	
ÁZÚCARES Y ALCOHOLES DE AZÚCAR	Fructosa	1,46 ± 0,05	1,11 ± 0,03	1 ± 0,08	1,43 ± 0,03	1 ± 0,02
	Fructosa-6P	0,78 ± 0,05	0,65 ± 0,04	1 ± 0,03	ND	ND
	Galactinol	0,66 ± 0,02	0,74 ± 0,04	1 ± 0,04	ND	ND
	Glicerol 3-P	0,80 ± 0,04	0,76 ± 0,03	1 ± 0,03	1,06 ± 0,03	1 ± 0,03
	Glucosa	1,33 ± 0,02	0,78 ± 0,02	1 ± 0,06	0,92 ± 0,03	1 ± 0,03
	Maltitol	0,90 ± 0,04	0,93 ± 0,04	1 ± 0,03	ND	ND
	Maltosa	ND	ND	ND	0,91 ± 0,04	1 ± 0,08
	Maltotriosa	ND	ND	ND	0,43 ± 0,03	1 ± 0,10
	Mioinositol	0,95 ± 0,04	0,83 ± 0,02	1 ± 0,04	0,94 ± 0,01	1 ± 0,01
	Rafinosa	0,73 ± 0,05	0,75 ± 0,04	1 ± 0,03	0,60 ± 0,07	1 ± 0,08
	Sacarosa	0,95 ± 0,02	0,71 ± 0,01	1 ± 0,03	0,88 ± 0,02	1 ± 0,05
	Trehalosa	ND	ND	ND	0,94 ± 0,07	1 ± 0,02
	Xilosa	1,06 ± 0,04	0,84 ± 0,02	1 ± 0,02	ND	ND
OTROS	Ácido fosfórico	0,79 ± 0,04	0,98 ± 0,04	1 ± 0,05	1,33 ± 0,03	1 ± 0,04
	AMP	0,72 ± 0,04	0,72 ± 0,06	1 ± 0,06	0,84 ± 0,03	1 ± 0,12
	Guanidina	0,70 ± 0,17	1,12 ± 0,29	1 ± 0,08	ND	ND
	Putrescina	0,91 ± 0,06	0,88 ± 0,01	1 ± 0,03	0,84 ± 0,12	1 ± 0,13
	Tiramida	ND	ND	ND	0,85 ± 0,03	1 ± 0,03
	Uracilo	1,63 ± 0,02	1,41 ± 0,09	1 ± 0,05	1,81 ± 0,14	1 ± 0,10
	Urea	0,76 ± 0,06	0,83 ± 0,02	1 ± 0,06	1,42 ± 0,12	1 ± 0,07

Tabla Suplementaria 7. Niveles relativos de metabolitos en las raíces de las líneas de pérdida de función *pgk1.1*, *pgk3.2* y *pgk1.1 pgk3.2* con respecto a su control (WT1) y *amiPGK2* con respecto a su control (WT2). Para el caso de *amiPGK2* se muestra la media de dos líneas transgénicas independientes. Se representa la media de los valores relativos \pm SE ($5 \leq n \leq 12$). En negrita se indican aquellos metabolitos que muestran diferencias significativas con respecto a las plantas control ($P < 0,05$). ND, no determinado.

Metabolito	<i>pgk1.1</i>	<i>pgk3.2</i>	<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	WT1	<i>amiPGK2</i>	WT2	
AMINOÁCIDOS	Ácido treónico	0,89 \pm 0,01	1,38 \pm 0,01	0,97 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,12 \pm 0,02	1 \pm 0,01
	Alanina	1,11 \pm 0,04	1,11 \pm 0,02	1,37 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,22 \pm 0,15	1 \pm 0,20
	Alanina, beta	1,23 \pm 0,02	1,09 \pm 0,02	1,14 \pm 0,03	1 \pm 0,02	0,97 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Asparagina	1,08 \pm 0,13	1,31 \pm 0,09	1,58 \pm 0,14	1 \pm 0,11	0,94 \pm 0,06	1 \pm 0,09
	Aspartato	0,85 \pm 0,01	1,35 \pm 0,02	0,89 \pm 0,01	1 \pm 0,03	1,14 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	GABA	1,02 \pm 0,01	0,91 \pm 0,01	1,33 \pm 0,02	1 \pm 0,03	1,04 \pm 0,01	1 \pm 0,03
	Glicina	1,08 \pm 0,02	1,06 \pm 0,01	1,35 \pm 0,04	1 \pm 0,02	0,91 \pm 0,01	1 \pm 0,03
	Glutamato	1,17 \pm 0,04	1,01 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	1 \pm 0,01	1,07 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Glutamina	0,99 \pm 0,05	1,05 \pm 0,03	1,15 \pm 0,04	1 \pm 0,03	0,76 \pm 0,03	1 \pm 0,13
	Isoleucina	0,90 \pm 0,02	0,74 \pm 0,01	1,17 \pm 0,03	1 \pm 0,02	1,03 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Lisina	0,91 \pm 0,03	0,59 \pm 0,01	0,90 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,03 \pm 0,03	1 \pm 0,06
	Metionina	0,96 \pm 0,01	0,96 \pm 0,01	1,05 \pm 0,04	1 \pm 0,04	1,09 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Ornitina	0,99 \pm 0,10	0,71 \pm 0,07	0,86 \pm 0,10	1 \pm 0,23	ND	ND
	Piroglutamato	0,95 \pm 0,01	1,06 \pm 0,02	1,11 \pm 0,02	1 \pm 0,02	1,04 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Prolina	1,07 \pm 0,08	0,84 \pm 0,02	1,25 \pm 0,05	1 \pm 0,03	1,04 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Serina	1,17 \pm 0,03	0,84 \pm 0,01	1,34 \pm 0,03	1 \pm 0,02	1,04 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Serina-o-acetil	1,17 \pm 0,03	0,67 \pm 0,02	0,96 \pm 0,04	1 \pm 0,04	1,05 \pm 0,02	1 \pm 0,04
Tirosina	1,00 \pm 0,03	0,77 \pm 0,03	1,15 \pm 0,05	1 \pm 0,05	ND	ND	
Treonina	1,16 \pm 0,02	0,94 \pm 0,01	1,32 \pm 0,03	1 \pm 0,02	1,00 \pm 0,01	1 \pm 0,01	
Valina	0,99 \pm 0,02	0,87 \pm 0,02	1,21 \pm 0,05	1 \pm 0,04	1,02 \pm 0,02	1 \pm 0,03	
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Ácido Cinámico	1,37 \pm 0,23	1,15 \pm 0,21	1,65 \pm 0,23	1 \pm 0,11	ND	ND
	Ascorbato	1,07 \pm 0,10	1,45 \pm 0,14	1,21 \pm 0,11	1 \pm 0,06	ND	ND
	Benzoato	1,22 \pm 0,10	0,78 \pm 0,07	1,40 \pm 0,02	1 \pm 0,11	1,22 \pm 0,06	1 \pm 0,02
	Citrato	0,86 \pm 0,03	2,08 \pm 0,05	0,84 \pm 0,03	1 \pm 0,04	0,87 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Dehidroascorbato	1,00 \pm 0,04	1,32 \pm 0,02	0,87 \pm 0,01	1 \pm 0,05	1,14 \pm 0,02	1 \pm 0,01
	Fumarato	0,88 \pm 0,03	0,72 \pm 0,02	1,00 \pm 0,14	1 \pm 0,02	0,88 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Glicerato	1,17 \pm 0,02	0,70 \pm 0,01	1,07 \pm 0,04	1 \pm 0,02	1,30 \pm 0,03	1 \pm 0,01
	Glutarato	1,04 \pm 0,03	1,06 \pm 0,01	0,88 \pm 0,01	1 \pm 0,02	ND	ND
	Isocitrato	ND	ND	ND	ND	0,86 \pm 0,05	1 \pm 0,10
	Malato	0,73 \pm 0,02	0,79 \pm 0,01	0,63 \pm 0,01	1 \pm 0,01	0,90 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Nicotinato	1,03 \pm 0,02	1,06 \pm 0,01	1,18 \pm 0,02	1 \pm 0,02	1,15 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Piruvato	1,22 \pm 0,05	1,04 \pm 0,02	1,19 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,09 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Shiquimato	1,23 \pm 0,03	1,82 \pm 0,03	1,29 \pm 0,02	1 \pm 0,02	ND	ND
Succinato	1,16 \pm 0,02	1,52 \pm 0,02	1,14 \pm 0,02	1 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02	1 \pm 0,02	

Tabla Suplementaria 7. Continuación

	Metabolito	<i>pgk1.1</i>	<i>pgk3.2</i>	<i>pgk1.1 pgk3.2</i>	WT1	<i>amiPGK2</i>	WT2
AZÚCARES Y ALCOHOLES DE AZÚCAR	Fructosa	2,03 ± 0,05	3,87 ± 0,05	2,39 ± 0,06	1 ± 0,02	1,20 ± 0,04	1 ± 0,02
	Fructosa-6-fosfato	ND	ND	ND	ND	0,94 ± 0,03	1 ± 0,03
	Gliceraldehido-3P	1,16 ± 0,06	1,40 ± 0,02	1,20 ± 0,06	1 ± 0,04	1,09 ± 0,02	1 ± 0,02
	Glucosa	1,49 ± 0,05	3,32 ± 0,13	1,80 ± 0,06	1 ± 0,02	1,20 ± 0,11	1 ± 0,08
	Maltitol	1,25 ± 0,04	1,35 ± 0,02	1,17 ± 0,02	1 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1 ± 0,02
	Maltotriosa	ND	ND	ND	ND	1,34 ± 0,08	1 ± 0,07
	Mioinositol	1,19 ± 0,03	2,19 ± 0,03	1,35 ± 0,02	1 ± 0,02	1,13 ± 0,03	1 ± 0,01
	Rafinosa	1,10 ± 0,02	1,52 ± 0,03	1,09 ± 0,01	1 ± 0,03	1,00 ± 0,02	1 ± 0,02
	Sacarosa	1,24 ± 0,06	1,25 ± 0,06	1,18 ± 0,03	1 ± 0,02	1,05 ± 0,02	1 ± 0,02
	Trehalosa	1,39 ± 0,03	2,73 ± 0,03	1,45 ± 0,05	1 ± 0,01	0,89 ± 0,02	1 ± 0,03
	Xilosa	ND	ND	ND	ND	1,08 ± 0,03	1 ± 0,02
OTROS	Ácido fosfórico	0,99 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,65 ± 0,02	1 ± 0,01	1,11 ± 0,05	1 ± 0,05
	AMP	1,16 ± 0,06	1,41 ± 0,04	1,01 ± 0,05	1 ± 0,06	1,3 ± 0,07	1 ± 0,09
	Putrescina	1,07 ± 0,11	1,81 ± 0,22	1,06 ± 0,13	1 ± 0,17	1,11 ± 0,05	1 ± 0,03
	Urea	0,76 ± 0,09	0,40 ± 0,03	0,75 ± 0,05	1 ± 0,11	0,86 ± 0,09	1 ± 0,15

Tabla Suplementaria 8. Niveles relativos de metabolitos en las partes aéreas de las líneas sobreexpresoras *OexPGK1* y *OexPGK3* con respecto a su control (WT1) y *OexPGK2* con respecto a su control (WT2). Se representa la media de los valores relativos \pm SE ($10 \leq n \leq 12$) de dos líneas transgénicas independientes. En negrita se indican aquellos metabolitos que muestran diferencias significativas con respecto a las plantas control ($P < 0,05$). ND, no determinado.

Metabolito	<i>OexPGK1</i>	<i>OexPGK3</i>	WT	<i>OexPGK2</i>	WT	
AMINOÁCIDOS	Ácido aminoadípico	ND	ND	ND	1,01 \pm 0,02	1 \pm 0,04
	Ácido treónico	0,92 \pm 0,01	0,84 \pm 0,00	1 \pm 0,03	0,94 \pm 0,01	1 \pm 0,01
	Alanina	1,00 \pm 0,02	0,90 \pm 0,01	1 \pm 0,04	0,92 \pm 0,18	1 \pm 0,20
	Alanina, beta	0,99 \pm 0,02	0,86 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,88 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Aspargina	1,10 \pm 0,15	0,88 \pm 0,07	1 \pm 0,11	1,17 \pm 0,09	1 \pm 0,09
	Aspartato	0,93 \pm 0,01	0,83 \pm 0,01	1 \pm 0,03	0,97 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Fenilalanina	ND	ND	ND	1,03 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	GABA	0,85 \pm 0,01	0,82 \pm 0,01	1 \pm 0,03	1,09 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Glicina	0,96 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,99 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Glutamato	0,96 \pm 0,05	0,82 \pm 0,02	1 \pm 0,01	0,85 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Glutamina	0,94 \pm 0,03	0,68 \pm 0,02	1 \pm 0,03	0,99 \pm 0,05	1 \pm 0,13
	Isoleucina	0,99 \pm 0,01	1,22 \pm 0,02	1 \pm 0,02	1,04 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Lisina	1,02 \pm 0,02	1,16 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,92 \pm 0,03	1 \pm 0,06
	Metionina	0,89 \pm 0,04	1,03 \pm 0,03	1 \pm 0,04	0,92 \pm 0,02	1 \pm 0,03
	Piroglutamato	0,91 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01	1 \pm 0,02	1,06 \pm 0,02	1 \pm 0,02
	Prolina	0,87 \pm 0,05	0,99 \pm 0,03	1 \pm 0,03	1,21 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Serina	0,85 \pm 0,01	0,93 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,91 \pm 0,04	1 \pm 0,02
	Serina-o-acetil	0,82 \pm 0,02	0,82 \pm 0,03	1 \pm 0,04	1,04 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Tirosina	1,02 \pm 0,08	1,13 \pm 0,06	1 \pm 0,05	ND	ND
	Treonina	0,94 \pm 0,02	0,94 \pm 0,01	1 \pm 0,02	1,02 \pm 0,01	1 \pm 0,01
Valina	1,02 \pm 0,02	1,15 \pm 0,02	1 \pm 0,04	1,07 \pm 0,03	1 \pm 0,03	
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Ácido Nicotínico	0,97 \pm 0,01	1,05 \pm 0,02	1 \pm 0,02	0,90 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Ácido salicílico	ND	ND	ND	1,00 \pm 0,04	1 \pm 0,02
	Ascorbato	1,15 \pm 0,10	0,63 \pm 0,04	1 \pm 0,06	ND	ND
	Benzoato	0,90 \pm 0,04	0,78 \pm 0,03	1 \pm 0,11	1,17 \pm 0,03	1 \pm 0,02
	Citrato	1,20 \pm 0,02	0,63 \pm 0,01	1 \pm 0,04	0,82 \pm 0,03	1 \pm 0,04
	Dehidroascorbato	0,95 \pm 0,02	0,80 \pm 0,03	1 \pm 0,05	0,70 \pm 0,03	1 \pm 0,01
	Fumarato	0,76 \pm 0,02	0,76 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,67 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Glicerato	1,21 \pm 0,02	1,72 \pm 0,03	1 \pm 0,02	1,23 \pm 0,02	1 \pm 0,01
	Glutarato	0,80 \pm 0,02	0,69 \pm 0,01	1 \pm 0,02	ND	ND
	Malato	0,75 \pm 0,01	0,64 \pm 0,01	1 \pm 0,01	0,58 \pm 0,01	1 \pm 0,02
	Piruvato	0,85 \pm 0,03	1,00 \pm 0,02	1 \pm 0,04	0,80 \pm 0,03	1 \pm 0,03
	Shiquimato	0,91 \pm 0,01	0,89 \pm 0,01	1 \pm 0,02	ND	ND
	Succinato	0,94 \pm 0,02	0,76 \pm 0,01	1 \pm 0,02	0,68 \pm 0,01	1 \pm 0,02

Tabla Suplementaria 8. Continuación

	Metabolito	<i>OexPGK1</i>	<i>OexPGK3</i>	WT	<i>OexPGK2</i>	WT
ÁZÚCARES Y ALCOHOLES DE AZÚCAR	Ácido Galacturónico	ND	ND	ND	0,93 ± 0,01	1 ± 0,01
	Fructosa	1,08 ± 0,01	1,23 ± 0,02	1 ± 0,02	0,78 ± 0,01	1 ± 0,02
	Fructosa-6-fosfato	ND	ND	ND	0,62 ± 0,01	1 ± 0,03
	Gliceraldehido-3P	1,03 ± 0,02	0,93 ± 0,02	1 ± 0,04	0,90 ± 0,03	1 ± 0,02
	Glucosa	1,30 ± 0,10	0,80 ± 0,02	1 ± 0,02	0,92 ± 0,04	1 ± 0,08
	Maltitol	0,95 ± 0,04	1,03 ± 0,02	1 ± 0,01	0,85 ± 0,02	1 ± 0,02
	Maltotriosa	ND	ND	ND	1,20 ± 0,16	1 ± 0,07
	Mioinositol	0,96 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1 ± 0,02	0,95 ± 0,01	1 ± 0,01
	Rafinosa	0,76 ± 0,02	0,87 ± 0,01	1 ± 0,03	0,98 ± 0,01	1 ± 0,02
	Ribosa	0,93 ± 0,04	0,86 ± 0,04	1 ± 0,04	1,00 ± 0,06	1 ± 0,03
	Sacarosa	0,84 ± 0,01	0,98 ± 0,01	1 ± 0,02	0,75 ± 0,01	1 ± 0,02
	Trehalosa	1,33 ± 0,05	0,94 ± 0,02	1 ± 0,01	0,76 ± 0,01	1 ± 0,03
	Xilosa	ND	ND	ND	0,91 ± 0,01	1 ± 0,02
OTROS	Ácido fosfórico	1,09 ± 0,04	0,81 ± 0,02	1 ± 0,01	0,95 ± 0,02	1 ± 0,05
	AMP	0,88 ± 0,02	1,06 ± 0,04	1 ± 0,06	0,90 ± 0,07	1 ± 0,09
	Putrescina	1,06 ± 0,04	1,35 ± 0,09	1 ± 0,17	0,74 ± 0,06	1 ± 0,03

Tabla Suplementaria 9. Niveles relativos de metabolitos en plantas sobreexpresoras *OexPGK1*, *OexPGK2* y las plantas control (WT) en estado de roseta y crecidas en invierno. Se muestran dos líneas transgénicas independientes para cada gen. A la izquierda y denotados con la letra A se recoge el perfil metabólico de plantas sin clorosis en el momento de la recogida y a la derecha (líneas denotadas por la letra B) el perfil metabólico de aquellas plantas que sí mostraron algún síntoma de clorosis. Se representa la media de los valores relativos \pm SE (n = 6). En negrita aquellas que muestran diferencias significativas con respecto a las plantas control (P < 0,05).

Metabolito	<i>OexPGK1-L7_A</i>	<i>OexPGK1-L20_A</i>	<i>OexPGK2-L60_A</i>	<i>OexPGK2-L68_A</i>	<i>OexPGK1-L7_B</i>	<i>OexPGK1-L20_B</i>	<i>OexPGK2-L60_B</i>	<i>OexPGK2-L68_B</i>	WT
Ácido treónico	0,86 \pm 0,15	0,78 \pm 0,11	0,91 \pm 0,23	0,70 \pm 0,11	0,88 \pm 0,13	0,95 \pm 0,10	1,04 \pm 0,21	1,00 \pm 0,17	1 \pm 0,14
Alanina	0,96 \pm 0,10	0,95 \pm 0,07	1,13 \pm 0,07	1,15 \pm 0,05	1,11 \pm 0,08	1,03 \pm 0,06	1,37 \pm 0,10	1,33 \pm 0,09	1 \pm 0,03
Alanina, beta	0,96 \pm 0,07	0,96 \pm 0,07	0,88 \pm 0,04	1,10 \pm 0,08	1,70 \pm 0,09	1,36 \pm 0,05	1,69 \pm 0,10	1,69 \pm 0,08	1 \pm 0,04
Arginina	0,78 \pm 0,08	1,14 \pm 0,10	1,04 \pm 0,12	1,07 \pm 0,06	1,27 \pm 0,06	1,08 \pm 0,05	3,16 \pm 0,18	2,45 \pm 0,18	1 \pm 0,07
Asparagina	0,93 \pm 0,11	1,16 \pm 0,06	1,03 \pm 0,09	1,12 \pm 0,10	1,57 \pm 0,13	1,17 \pm 0,05	2,86 \pm 0,34	2,05 \pm 0,22	1 \pm 0,05
Aspartato	0,94 \pm 0,06	1,00 \pm 0,06	1,06 \pm 0,03	1,04 \pm 0,05	0,89 \pm 0,05	0,93 \pm 0,03	1,45 \pm 0,05	1,12 \pm 0,05	1 \pm 0,02
Fenilalanina	0,93 \pm 0,04	1,03 \pm 0,06	1,00 \pm 0,05	1,10 \pm 0,08	1,47 \pm 0,06	1,11 \pm 0,04	2,08 \pm 0,06	1,50 \pm 0,05	1 \pm 0,03
GABA	0,86 \pm 0,04	0,97 \pm 0,04	0,86 \pm 0,02	1,10 \pm 0,12	1,65 \pm 0,09	1,24 \pm 0,08	0,77 \pm 0,05	1,29 \pm 0,07	1 \pm 0,05
Glutamato	0,98 \pm 0,05	1,07 \pm 0,04	1,10 \pm 0,05	1,12 \pm 0,04	0,97 \pm 0,06	0,99 \pm 0,05	1,49 \pm 0,06	1,25 \pm 0,06	1 \pm 0,03
Glutamina	0,89 \pm 0,07	1,25 \pm 0,06	0,94 \pm 0,06	0,94 \pm 0,05	1,05 \pm 0,08	1,05 \pm 0,06	0,78 \pm 0,04	1,37 \pm 0,11	1 \pm 0,05
Homoserina	0,81 \pm 0,11	0,98 \pm 0,11	0,84 \pm 0,07	0,83 \pm 0,10	0,92 \pm 0,12	0,81 \pm 0,09	0,85 \pm 0,12	0,99 \pm 0,08	1 \pm 0,09
Isoleucina	0,90 \pm 0,02	1,00 \pm 0,05	1,05 \pm 0,05	1,17 \pm 0,06	1,28 \pm 0,03	1,18 \pm 0,04	1,83 \pm 0,05	1,50 \pm 0,04	1 \pm 0,02
Leucina	0,97 \pm 0,02	1,07 \pm 0,04	1,09 \pm 0,05	1,22 \pm 0,06	1,38 \pm 0,03	1,29 \pm 0,04	1,56 \pm 0,06	1,45 \pm 0,04	1 \pm 0,02
Lisina	1,01 \pm 0,07	1,12 \pm 0,07	0,98 \pm 0,06	1,18 \pm 0,10	1,27 \pm 0,07	1,31 \pm 0,02	1,62 \pm 0,09	1,42 \pm 0,04	1 \pm 0,04
Metionina	0,92 \pm 0,19	0,93 \pm 0,14	0,79 \pm 0,11	0,81 \pm 0,13	0,79 \pm 0,10	0,71 \pm 0,10	1,46 \pm 0,22	1,06 \pm 0,16	1 \pm 0,11
Ornitina	1,13 \pm 0,31	1,29 \pm 0,18	0,98 \pm 0,10	1,00 \pm 0,06	1,49 \pm 0,14	1,29 \pm 0,06	3,46 \pm 0,20	2,66 \pm 0,22	1 \pm 0,05
Pirrolutámico	0,96 \pm 0,06	1,05 \pm 0,03	1,02 \pm 0,02	1,01 \pm 0,03	0,92 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	1,20 \pm 0,05	1,13 \pm 0,08	1 \pm 0,04
Prolina	0,95 \pm 0,03	1,10 \pm 0,04	1,06 \pm 0,04	1,18 \pm 0,06	1,27 \pm 0,03	1,54 \pm 0,05	1,17 \pm 0,04	1,21 \pm 0,05	1 \pm 0,03
Prolina, 4-hidroxi	0,99 \pm 0,05	1,03 \pm 0,06	1,02 \pm 0,05	1,15 \pm 0,10	1,23 \pm 0,04	1,17 \pm 0,05	1,66 \pm 0,05	1,49 \pm 0,03	1 \pm 0,02
Serina	1,07 \pm 0,05	1,07 \pm 0,04	1,15 \pm 0,03	1,17 \pm 0,06	1,34 \pm 0,03	1,22 \pm 0,02	1,31 \pm 0,03	1,36 \pm 0,02	1 \pm 0,02
Tirosina	0,96 \pm 0,07	0,96 \pm 0,10	0,92 \pm 0,10	1,04 \pm 0,06	1,24 \pm 0,10	1,24 \pm 0,10	1,45 \pm 0,11	1,29 \pm 0,04	1 \pm 0,09
Treonina	1,00 \pm 0,05	1,03 \pm 0,04	1,10 \pm 0,03	1,16 \pm 0,07	1,36 \pm 0,04	1,20 \pm 0,02	3,02 \pm 0,05	2,03 \pm 0,03	1 \pm 0,02
Triptófano	3,24 \pm 2,30	1,71 \pm 0,71	0,93 \pm 0,37	0,99 \pm 0,41	1,55 \pm 0,46	2,00 \pm 0,26	1,44 \pm 0,46	1,68 \pm 0,50	1 \pm 0,21
Valina	0,96 \pm 0,03	1,03 \pm 0,04	1,11 \pm 0,05	1,18 \pm 0,05	1,24 \pm 0,02	1,16 \pm 0,02	1,44 \pm 0,05	1,38 \pm 0,05	1 \pm 0,02

AMINOÁCIDOS

Tabla Suplementaria 9. Continuación

Metabolito	OxPGK1-L7_A	OxPGK1-L20_A	OxPGK2-L60_A	OxPGK2-L68_A	OxPGK1-L7_B	OxPGK1-L20_B	OxPGK2-L60_B	OxPGK2-L68_B	WT
Ácido maleico	1,15 ± 0,29	1,02 ± 0,24	1,00 ± 0,13	0,85 ± 0,11	0,91 ± 0,13	1,09 ± 0,13	0,92 ± 0,16	0,95 ± 0,17	1 ± 0,12
Benzoato	0,93 ± 0,09	0,84 ± 0,09	0,91 ± 0,07	0,84 ± 0,05	0,82 ± 0,05	0,83 ± 0,04	0,98 ± 0,07	0,87 ± 0,06	1 ± 0,08
Citrato	0,67 ± 0,12	0,77 ± 0,13	1,06 ± 0,15	1,17 ± 0,26	0,81 ± 0,14	0,71 ± 0,08	1,71 ± 0,26	1,22 ± 0,15	1 ± 0,09
Dehidroascorbato	0,96 ± 0,12	1,02 ± 0,21	0,70 ± 0,12	0,93 ± 0,18	2,04 ± 0,21	2,24 ± 0,22	2,14 ± 0,11	1,92 ± 0,18	1 ± 0,10
Fumarato	1,07 ± 0,08	1,16 ± 0,08	0,77 ± 0,07	0,74 ± 0,04	0,89 ± 0,04	0,83 ± 0,04	0,49 ± 0,03	0,77 ± 0,05	1 ± 0,05
Glicerato	1,06 ± 0,10	0,92 ± 0,09	0,83 ± 0,10	0,88 ± 0,11	1,33 ± 0,12	1,34 ± 0,13	0,81 ± 0,11	1,33 ± 0,17	1 ± 0,08
Malato	0,80 ± 0,06	0,90 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,88 ± 0,05	0,83 ± 0,03	0,91 ± 0,06	0,94 ± 0,07	1 ± 0,04
Malato, 2-metil	0,65 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,82 ± 0,04	0,75 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,65 ± 0,04	1,06 ± 0,02	0,93 ± 0,05	1 ± 0,03
Nicotinato	0,78 ± 0,05	0,75 ± 0,04	0,60 ± 0,06	0,63 ± 0,03	0,86 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,05	1 ± 0,04
Piruvato	1,09 ± 0,11	0,97 ± 0,04	0,95 ± 0,06	0,98 ± 0,03	1,35 ± 0,06	1,44 ± 0,12	1,17 ± 0,05	1,29 ± 0,05	1 ± 0,03
Succinato	0,98 ± 0,05	1,07 ± 0,07	0,65 ± 0,05	0,66 ± 0,04	1,12 ± 0,05	0,95 ± 0,05	0,92 ± 0,06	1,02 ± 0,08	1 ± 0,05
Ácido galactónico	1,04 ± 0,09	1,11 ± 0,09	0,79 ± 0,08	0,94 ± 0,04	1,49 ± 0,16	1,31 ± 0,10	0,93 ± 0,03	1,63 ± 0,10	1 ± 0,05
Eritritol	0,83 ± 0,03	1,01 ± 0,04	0,88 ± 0,05	1,11 ± 0,07	1,18 ± 0,06	2,21 ± 0,30	1,20 ± 0,07	1,15 ± 0,04	1 ± 0,04
Fructosa	1,24 ± 0,08	1,24 ± 0,09	0,81 ± 0,07	1,01 ± 0,11	2,05 ± 0,11	1,73 ± 0,08	0,68 ± 0,06	1,49 ± 0,12	1 ± 0,06
Fucosa	0,98 ± 0,03	1,01 ± 0,05	0,85 ± 0,05	0,94 ± 0,05	1,05 ± 0,04	1,06 ± 0,03	0,79 ± 0,04	0,96 ± 0,05	1 ± 0,03
Galactinol	0,71 ± 0,05	0,65 ± 0,06	0,39 ± 0,03	0,79 ± 0,05	2,31 ± 0,14	1,38 ± 0,06	0,70 ± 0,05	2,28 ± 0,20	1 ± 0,07
Glicerol	1,23 ± 0,22	1,26 ± 0,12	0,92 ± 0,06	1,02 ± 0,05	1,17 ± 0,03	1,29 ± 0,08	0,98 ± 0,04	1,12 ± 0,12	1 ± 0,03
Glicerol 2-P	0,72 ± 0,14	1,01 ± 0,15	1,06 ± 0,18	0,81 ± 0,14	0,73 ± 0,12	0,87 ± 0,14	1,77 ± 0,45	1,26 ± 0,29	1 ± 0,12
Glucosa	1,00 ± 0,08	1,04 ± 0,09	0,79 ± 0,07	0,90 ± 0,08	1,60 ± 0,09	1,47 ± 0,08	0,91 ± 0,10	1,40 ± 0,12	1 ± 0,06
Glucosa 6-P	1,09 ± 0,26	1,16 ± 0,43	1,06 ± 0,34	0,86 ± 0,30	1,38 ± 0,23	0,97 ± 0,12	1,49 ± 0,27	1,27 ± 0,31	1 ± 0,18
Lactato	0,92 ± 0,07	0,71 ± 0,07	1,21 ± 0,13	0,81 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,99 ± 0,18	0,92 ± 0,09	1,06 ± 0,21	1 ± 0,09
Maltosa	0,81 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,84 ± 0,08	1,03 ± 0,09	1,16 ± 0,10	1,21 ± 0,09	1,17 ± 0,06	1,29 ± 0,07	1 ± 0,04
Mioinositol	0,98 ± 0,03	1,06 ± 0,05	1,05 ± 0,06	1,09 ± 0,04	0,81 ± 0,03	0,89 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,84 ± 0,04	1 ± 0,04
Rafinosa	1,22 ± 0,10	1,57 ± 0,12	0,88 ± 0,09	1,31 ± 0,11	1,87 ± 0,23	1,64 ± 0,16	0,89 ± 0,06	1,48 ± 0,13	1 ± 0,06
Ramnosa	1,08 ± 0,04	1,12 ± 0,04	0,90 ± 0,04	1,06 ± 0,05	1,23 ± 0,06	1,23 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,99 ± 0,03	1 ± 0,02
Sacarosa	0,95 ± 0,03	1,15 ± 0,04	1,00 ± 0,05	1,07 ± 0,03	1,09 ± 0,04	1,07 ± 0,04	0,79 ± 0,01	1,35 ± 0,04	1 ± 0,05
Trehalosa	1,03 ± 0,05	1,16 ± 0,08	0,97 ± 0,06	1,09 ± 0,06	0,87 ± 0,07	0,94 ± 0,05	0,44 ± 0,01	0,86 ± 0,04	1 ± 0,03
Xilosa	0,92 ± 0,04	0,86 ± 0,06	0,74 ± 0,06	0,74 ± 0,06	0,88 ± 0,07	1,01 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,68 ± 0,06	1 ± 0,05
Ácido fosfórico	1,14 ± 0,44	1,11 ± 0,35	0,83 ± 0,23	1,01 ± 0,44	0,88 ± 0,31	0,59 ± 0,20	1,77 ± 0,65	1,03 ± 0,42	1 ± 0,20
Adenina	0,83 ± 0,05	0,93 ± 0,14	0,99 ± 0,06	0,88 ± 0,06	0,82 ± 0,07	0,85 ± 0,04	1,03 ± 0,08	0,95 ± 0,11	1 ± 0,06
AMP	0,82 ± 0,11	1,03 ± 0,15	0,93 ± 0,16	0,90 ± 0,15	0,85 ± 0,10	1,05 ± 0,21	1,11 ± 0,23	1,02 ± 0,36	1 ± 0,12
Guanidina	0,89 ± 0,40	0,46 ± 0,05	1,23 ± 0,63	0,40 ± 0,03	1,07 ± 0,24	8,36 ± 7,30	1,47 ± 0,45	3,38 ± 2,07	1 ± 0,35
Putrescina	0,86 ± 0,05	0,99 ± 0,06	0,64 ± 0,04	0,93 ± 0,07	2,06 ± 0,12	2,13 ± 0,08	0,79 ± 0,04	1,63 ± 0,09	1 ± 0,05
Urea	1,12 ± 0,20	1,13 ± 0,10	1,08 ± 0,09	1,25 ± 0,15	1,44 ± 0,13	1,67 ± 0,20	4,56 ± 0,81	2,39 ± 0,21	1 ± 0,13

ÁCIDOS ORGÁNICOS

AZÚCARES Y ALCOHOLES DE AZÚCAR

OTROS

