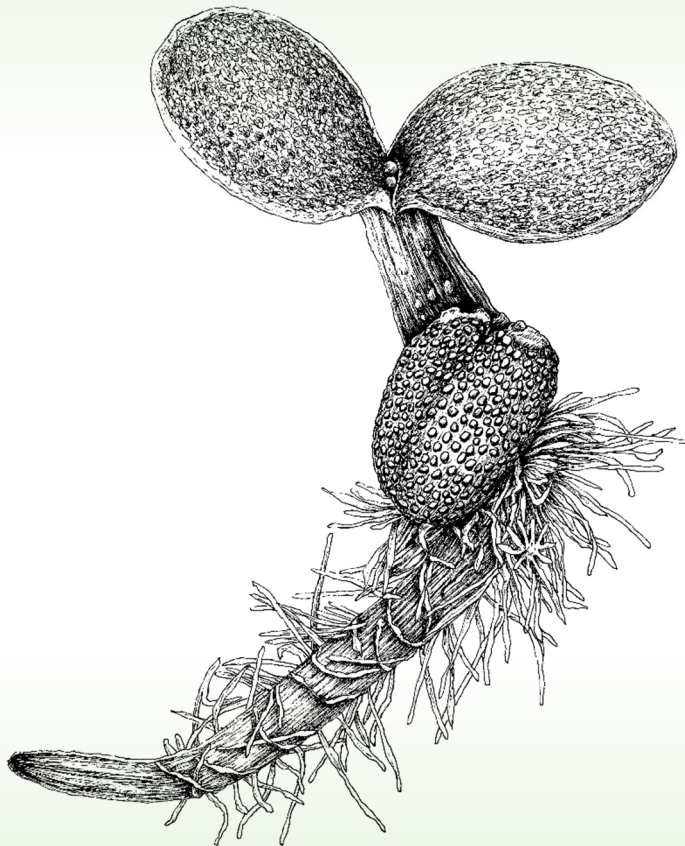




VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**ESTUDIO DE LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE SERINA EN  
PLANTAS Y SU INTERACCIÓN CON EL CAMBIO CLIMÁTICO**

**RUBÉN CASATEJADA ANCHEL**



Tesis dirigida por Jesús Muñoz Bertomeu y Roc Ros Palau. Valencia, enero 2022

Grupo de investigación “Metabolismo primario e Ingeniería metabólica vegetal”

Departament de Biología Vegetal, Facultat de Farmàcia

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



**BIOTECMED**

Estructura de Recerca Interdisciplinar  
en Biotecnologia i Biomedicina

**Programa de Doctorado de Biomedicina y Biotecnología  
(Código 3102; RD 99/2011)**



# VNIVERSITAT D VALÈNCIA



Departamento de Biología Vegetal

## **ESTUDIO DE LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE SERINA EN PLANTAS Y SU INTERACCIÓN CON EL CAMBIO CLIMÁTICO**

Tesis doctoral presentada por **RUBÉN CASATEJADA ANCHEL** para optar al  
grado de Doctor por la Universidad de Valencia

**Programa de Doctorado de Biomedicina y Biotecnología  
(Código 3102; RD 99/2011)**

Esta tesis ha sido realizada en el grupo de investigación  
“Metabolismo primario e Ingeniería metabólica vegetal”

Tesis dirigida por Jesús Muñoz Bertomeu y Roc Ros Palau

**Valencia, enero 2022**





D. Jesús Muñoz Bertomeu, Doctor en Biología y Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Valencia

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

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral titulada “**Estudio de las rutas de biosíntesis de serina en plantas y su interacción con el cambio climático**”, presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina y Biotecnología, ha sido realizada bajo nuestra dirección por el licenciado en Ciencias Biológicas RUBÉN CASATEJADA ANCHEL

Fdo. Jesús Muñoz Bertomeu

Fdo. Roc Ros Palau



## **Financiación:**

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

- Contrato predoctoral BES-2016-077943 para la formación de doctores 2016 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- Proyecto de investigación FEDER/BFU2015-64204R del Ministerio de Economía y Competitividad (2016-2020).
- Proyecto de investigación PID2019-107174GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación (2020-2024).





**A mis padres y a mis abuelos**



Hoy escribo estas palabras un día de diciembre de 2021 a las puertas de la navidad, después de casi 5 años trabajando para poder llegar hasta aquí. Todo llega y cuando te das cuenta aparece ese momento en el que miras hacia atrás y ves todo lo que has hecho y conseguido con muchas dudas, miedos, trabajo duro y sudores, y para rematar con una pandemia mundial de por medio, confinamientos nacionales y (por el momento) seis olas de contagios de coronavirus cada una más grande que la anterior. Y la verdad, con todo lo que ha pasado no sé como he podido llegar hasta este punto. Sin embargo, aquí estoy, escribiendo estos agradecimientos después de acabar este largo proceso llamado doctorado. Y como es un camino largo y duro, en ese camino aparecen personas que sin ellas no estaría ahora mismo en esta situación. Es por ello que mediante estas palabras quiero agradecer a cada una de esas personas que se han cruzado en este largo camino y me han ayudado. Sin embargo, dado que tengo fama de ser irónico y bromista no quería dejar de serlo y menos aquí, es por ello que quería introducir en el texto algunas bromas y dejar que el lector adivine cuales son.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias tanto a mi director, Roc Ros, como a mi codirector, Jesús Muñoz. Agradecer a Roc Ros el haberme dado la oportunidad de realizar el doctorado en su grupo de investigación y haberme dado la confianza precisamente a mí. Aún me acuerdo cuando me presenté a una convocatoria pasada de fecha y, sin embargo, en la siguiente decidió apostar por mí. Agradecerle también que me haya guiado en el pensamiento crítico y científico, y a enseñarme que 24 repeticiones siempre son mejores que 12 (por si acaso). Pero sobretodo me gustaria agradecer esos buenos días de los lunes por la mañana llenos de calidez y de empatía. También me gustaría agradecer a Jesús Muñoz toda la ayuda que me ha prestado siempre que la he necesitado, por

enseñarme a trabajar de manera muy metódica en el laboratorio y a guiarme en todos los pasos y procesos de investigación que hemos realizado. Siempre me acordaré de su llamada desde la puerta con su “¿Rubén estas ahí?” a la hora de comer, pero lo que nunca olvidaré será el haberme enseñado a hacer 200 PCRs a las nueve y media de la noche para tener los resultados a la mañana siguiente.

También hace falta mencionar a mis compañeros de laboratorio empezando por Sara, Armand, Andrea, y acabando por las últimas adquisiciones, Begoña, Alejandro, Maroua y Celia. Agradecer a Sara y Armand que me hayan acogido en el laboratorio desde el primer día como a uno más y también su ayuda siempre que me ha hecho falta. Como olvidar el temperamento andaluz de Sara y la calma de Armand al trabajar en el laboratorio, el ying y el yang. Agradecer también a Begoña su amabilidad y su comprensión al contarle los problemas que surgen durante la última etapa de doctorado y ser mi contrapeso irónico al aportar la parte irónica femenina del grupo. También me gustaría agradecer a Maroua, Alejandro y Celia su interés por saber como iba en el trabajo y siempre su amabilidad hacia a mi y todos los compañeros, es una suerte tener personas así alrededor en el trabajo. Y como sé que, a estas alturas de la lectura, habrá una persona que se estará preguntando ¿y yo qué? Pues paciencia, todo llega.

Una parte importante del departamento y que no me quiero olvidar son Estrella, Carolina, Mari Carmen y María José. Agradecer a todas ellas siempre su gran amabilidad y su disposición para cualquier cosa que necesitaba.

Tampoco me quiero olvidar del grupo del punto azul, de la chica de edafología y de los chicos de biquímica: Marian, Amparo, Eva, Judith, Alex, Miguel Angel y César. Es una suerte tener a gente como vosotros a mi alrededor. Gracias por hacer que las comidas sean divertidas y por los planes de bolos o karts o las

fiestas que nos hemos montado. Uno se siente realmente afortunado al tener gente maravillosa a su alrededor.

Darles las gracias a todos los TFGs y TFM's que han pasado durante mi etapa de doctorado. Recordar a Miriam y su tranquilidad mañica, Emma, Eden o Miguel y sus "mamaditas de Liria".

También quiero agradecer a Rosa y Olga del servicio de limpieza, por sus sonrisas al llegar por las tardes y por alegrarnos todos los días con su alegría y cariño.

Agradecer también a todas las personas del servicio de invernadero, Sergio, Silvia, Cristina y Bea por su inestimable ayuda a lo largo de estos años.

También quiero dar las gracias a Clara Terrasa por el fantástico dibujo realizado que aparece en la portada de la presente tesis.

En este proceso tan largo, también es importante rodearte de grandes amigos y de la familia. Quisiera agradecer a todos mis compañeros de UVAT, Mariano, Fernando y Manu por haber estado en los grandes momentos (pirineos, ruta del cid, paseos por la playa, torrás y muchas más experiencias) pero también y sobretodo en los malos, que no han sido pocos. Agradecer también a Jorge, Juan Miguel y Katie, Giorgio y Natalia, Jose y Andrea, deivid de fuego y chiner Cristian por hacerme desconectar los fines de semana con risas y mucha broma. No me puedo olvidar de mi "bro" Alex, el Bárcenas de Covatelles, sus mensajes de ánimo por las mañanas, las sesiones de deporte y saco y su disposición siempre a ayudarme. Y por último acordarme de Julián, Zara, Alberto y Alex por esas tardes de juegos de mesa y que, aunque por circunstancias de la vida nos veamos poco, seguimos teniendo una gran amistad dándonos grandes abrazos después de meses sin vernos.

De quien no me puedo olvidar es de la familia. En primer lugar, quiero agradecer a una persona que ya forma parte de mi familia y que sé que estaba esperando a que la mencionara, ella es Andrea, la pequeña calamidad, mi más que compañera de laboratorio. Empezamos en el laboratorio casi a la vez, yo en abril de 2017 y ella en septiembre del mismo año. Yo empecé el doctorado y ella empezó el TFG, y me ha acompañado en todo este largo camino entre TFGs, TFMs y becas de doctorado hasta conseguir empezar su propio doctorado en el grupo de Roc. Darle las gracias por todo lo que me ha ayudado y por haber estado siempre a mi lado convirtiéndose en un pilar muy importante.

Por último, me gustaría agradecer a mis padres, Mariano y Adela todo lo que han hecho por mí. Estoy donde estoy gracias a ellos, por enseñarme el valor de trabajar con honradez y nunca a costa de los demás. Por haber confiado en mi siempre y estar a mi lado. Por haberme demostrado que incluso las familias más humildes como nosotros son capaces de mucho más que aquellas que lo tienen todo. Agradecerles que me hayan enseñado el valor de trabajar siempre desde la humildad y la generosidad y aunque en aquel momento era pequeño, no se me olvidarán nunca los largos días en los que tanto mi madre como mi padre trabajaban hasta tarde aguantando viento y marea para que yo, hoy, pudiera estar donde estoy en este momento. Es un legado impagable y la única manera que tengo de agradecerles a ambos es continuar hacia adelante y seguir luchando. Por último, no olvidarme de mis abuelos, Adela, Miguel, Ascensión y José. No hay que olvidar nunca de donde viene cada uno y yo no me olvido de ellos, gracias a su lucha y a no rendirse nunca, aún habiendo vivido una guerra civil, una posguerra y sufrir las consecuencias de la represión franquista, son ellos los que han ganado con su ejemplo. Hoy, mi abuela Adela, la que siempre tenía un

plato de comida caliente en la mesa, puede decir que tiene un nieto que puede ser doctor, el primero de la familia y todo gracias a ellos.

Y, por último, añado estas palabras actualizadas (después de haber terminado con toda la escritura y con todas las correcciones) estando confinado en mi habitación tras haberme contagiado de covid a cinco días de realizar el depósito de la tesis. Según el actual protocolo de confinamiento me quedan siete días de encierro, por lo que tendré que entregar esta tesis desde la comodidad de mi habitación. Al principio de estos agradecimientos hablaba de la sexta ola de contagios y por casualidades de la vida aquí estoy, contagiado y encerrado, se podría decir que he pasado los cinco primeros niveles del juego pandémico. Aprovecho estos días de encierro con la única compañía de este ordenador y la ventana al mundo exterior a través del televisor para reflexionar sobre esta situación. Son momentos duros porque tengo miedo de lo que me pueda pasar y no solo a mí, sino a mi familia. Por suerte, todos estamos bien y todo gracias a la ciencia, a las vacunas, que en tan solo un año la ciencia consiguió desarrollar vacunas contra el covid salvando miles de vidas. En este caso la ciencia no solo me ha dado conocimiento durante estos casi cinco años, sino que también debo agradecerle que, en lugar de poder llegar a tener una enfermedad grave, los síntomas que tengo son similares a un resfriado. Si alguien pudiera tener dudas de la utilidad de la ciencia, ante mi situación, yo les diría que no las tengan.

Salud y ciencia para todos.





# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
Índice .....	i
Índice de Abreviaturas .....	v
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tablas .....	xvi
Resumen .....	xix
Resum .....	xxi
Abstract .....	xxiii
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Metabolismo en plantas .....	3
1.1.1 Metabolismo primario .....	4
1.1.1.1 Metabolismo del carbono .....	4
1.1.1.2 Metabolismo del nitrógeno y del azufre .....	15
1.1.2 Metabolismo secundario .....	20
1.2 Metabolismo de la serina .....	23
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Zea mays</i> .....	34
1.4 Interés biotecnológico en el metabolismo de plantas .....	38
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>43</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>47</b>
3.1 Material biológico de estudio .....	49
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	49
3.1.2 <i>Zea mays</i> .....	49
3.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	50
3.1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	50
3.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....	50
3.2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
3.2.1.1 Esterilización de semillas .....	50
3.2.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	51
3.2.1.3 Cultivo en invernadero .....	52
3.2.2 <i>Zea mays</i> .....	53
3.2.2.1 Cultivo en invernadero .....	53
3.2.2.2 Obtención y limpieza de semillas .....	55
3.2.3 <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	55
3.2.3.1 Medio LB .....	55
3.2.3.2 Medio SOB .....	56
3.2.3.3 Medio SOC .....	56

3.2.3.4 Mantenimiento bacteriano .....	56
3.3 Aislamiento de ácidos nucleicos .....	57
3.3.1 Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> .....	57
3.3.2 Extracción de ADN genómico de maíz .....	57
3.3.3 Extracción de ADN plasmídico .....	58
3.3.4 Extracción de BACs .....	59
3.3.5 Extracción de ARN total de plantas .....	60
3.4 Análisis de los ácidos nucleicos .....	61
3.4.1 Cuantificación de ácidos nucleicos .....	61
3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa .....	61
3.4.2.1 PCR diagnóstica .....	62
3.4.3 Diseño de cebadores .....	63
3.4.4 Purificación de los productos de PCR .....	64
3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa .....	67
3.4.6 Extracción y purificación de bandas de ADN en gel de agarosa .....	68
3.4.7 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción .....	69
3.4.8 Ligación de fragmentos de ADN .....	69
3.4.9 Análisis y secuenciación de ADN .....	69
3.5 Análisis de la expresión génica .....	70
3.5.1 Obtención del cDNA .....	70
3.5.2 PCR cuantitativa a tiempo real .....	70
3.6 Obtención de células competentes y procedimientos de transformación bacteriana .....	71
3.6.1 Obtención de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	71
3.6.2 Obtención de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	72
3.6.3 Protocolo de transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	72
3.6.4 Protocolo de transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	73
3.7 Diseño de las construcciones plasmídicas para la obtención de plantas transgénicas .....	74
3.7.1 BAC y vectores de clonación y transformación .....	74
3.7.2 Obtención de la construcción génica <i>ProHS:PGDH1-GFP</i> .....	78
3.7.3 Obtención de la construcción génica <i>Pro35S:PSAT1-GFP</i> .....	78
3.7.4 Obtención de la construcción génica <i>Pro35S:PSP1-GFP</i> .....	79
3.7.5 Obtención de la construcción génica de maíz .....	80
3.8 Transformación genética de <i>Arabidopsis</i> y obtención de nuevas líneas .....	80
3.8.1 Protocolo de transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	80
3.8.2 Obtención de líneas transgénicas homocigotas .....	81

3.8.3 Procedimiento para la realización de cruces entre líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	82
3.8.4 Obtención de plantas transgénicas condicionales para el gen <i>PGDH1</i> .....	83
3.8.5 Obtención de plantas dobles y triples mutantes para los genes de la familia <i>PGDH</i> .....	84
3.8.6 Obtención de plantas triples sobreexpresoras de los genes de la Ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina .....	85
3.8.7 Obtención de plantas sobreexpresoras del gen <i>PGDH1</i> en maíz .....	86
3.9 Cuantificación de parámetros morfológicos de las plantas .....	87
3.10 Determinación del contenido en almidón .....	87
3.11 Determinación del contenido de proteínas totales .....	89
3.12 Análisis por western blot .....	89
3.13 Análisis del perfil metabolómico .....	89
3.13.1 Extracción de los metabolitos .....	90
3.13.2 Derivatización .....	90
3.14 Análisis de la actividad fotosintética .....	92
3.15 Tratamiento estadístico de los resultados .....	92
<b>4. Resultados</b> .....	95
4.1 Análisis de los mutantes de los genes <i>PGDH1</i> , <i>PGDH2</i> y <i>PGDH3</i> .....	97
4.2 Caracterización fenotípica y metabolómica de los dobles y triples mutantes de la familia <i>PGDH</i> .....	110
4.3 Análisis de expresión de los genes de la familia <i>PGDH</i> .....	120
4.4 Estudio de los parámetros fotosintéticos, conductancia estomática y transpiración en los mutantes <i>PGDH3</i> .....	124
4.5 Análisis de expresión de las líneas triples sobreexpresoras de los genes <i>PGDH1</i> , <i>PSAT1</i> y <i>PSP1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	132
4.6 Análisis de expresión de las líneas sobreexpresoras de maíz .....	135
4.7 Caracterización de las líneas TriOex de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	138
4.8 Análisis metabolómico de las líneas sobreexpresoras de la RFBS en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	140
4.9 Análisis proteico y de almidón de las líneas sobreexpresoras de la RFBS en <i>Arabidopsis thaliana</i> y maíz .....	159
<b>5. Discusión</b> .....	163
5.1 <i>PGDH2</i> y <i>PGDH3</i> contribuyen al crecimiento de la planta .....	165

5.2 <i>PGDH1</i> y <i>PGDH2</i> están más relacionados funcionalmente entre sí que con <i>PGDH3</i> .....	166
5.3 Función fisiológica de <i>PGDH3</i> .....	170
5.4 La sobreexpresión de la RFBS no afecta positivamente al crecimiento de la planta en condiciones de CO <sub>2</sub> ambiental .....	173
5.5 La sobreexpresión de la RFBS puede tener un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta en condiciones de CO <sub>2</sub> elevado .....	174
5.6 La sobreexpresión de la RFBS afecta al metabolismo de aminoácidos .....	176
5.7 Las líneas TriOex incrementan el contenido de almidón y proteínas	180
5.8 Plantas de maíz sobreexpresoras de la RFBS contienen más almidón .....	183
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>185</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>191</b>

Índice de abreviaturas

2-OG	2-Oxoglutarato
2-PG	Fosfoglicolato
35S	Promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor
3-PGA	3-fosfoglicolato
ABRC	<i>The Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AGS	Enzima amiloglucosidasa
AH-AT	Enzima alanina-hidroxipiruvato aminotransferasa
APR	Enzima adenosín fosfosulfato reductasa
APS	Adenosín 5'fosfosulfato
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BAC	Cromosoma artificial bacteriano
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C <sub>3</sub>	Metabolismo fotosintético de tipo C <sub>3</sub>
C <sub>4</sub>	Metabolismo fotosintético de tipo C <sub>4</sub>
CAM	Metabolismo fotosintético de tipo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas)
cDNA	ADN complementario
<i>c-pgdh1-2</i>	Mutante condicional del gen <i>PGDH1</i>
<i>c-pgdh1-2 pgdh2-3</i>	Mutante doble condicional para el gen <i>PGDH1</i> y mutante para el gen <i>PGDH2</i>
<i>c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1</i>	Triple mutante para los tres genes <i>PGDH</i>

<i>c-pgdh1-2 pgdh3-1</i>	Mutante doble condicional para el gen <i>PGDH1</i> y mutante para el gen <i>PGDH3</i>
<i>c-ppp1</i>	Mutante condicional del gen <i>PSP1</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
Dnasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxinucleótido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FNR	Ferredoxina-NADP <sup>+</sup> -reductasa
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPCp	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa plastidial
GC-MS	Cromatografía de gases y espectrometría de masas
GDC	Glicina descarboxilasa
GDH	Glicerato deshidrogenasa
<i>GFP</i>	Gen que codifica la proteína verde fluorescente
Glu-6P-DH	Glucosa 6P deshidrogenasa
GOGAT	Enzima glutamato sintasa
GS	Enzima glutamina sintetasa
GTP	Guanosín trifosfato
H <sup>+</sup>	Protón
<i>HS</i>	Promotor de choque térmico del gen <i>HSP18.2</i>
LB	Medio lisogénico descrito por Bertani
LBTG	Medio LB suplementado con tetraciclina (5 µg/mL) y gentamicina (25 µg/mL)
LBTGK	LBTG suplementado con 50 µg/mL de kanamicina
LHC	Siglas en inglés de <i>Ligh Harvesting Complex</i> que significa Complejo antena del fotosistema
Maíz	<i>Zea mays</i>
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico



---

mQ	Agua milliQ
MS, MS1/2, MS1/5	Macro y micronutrientes de Murashige y Skoog, que pueden estar diluidos a la mitad o diluidos un quinto
NADH/NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido/oxidado
NADPH/NADP <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido/oxidado
NASC	<i>The Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonio
NiR	Enzima nitrito reductasa
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NR	Enzima Nitrato reductasa
OAA	Oxalacetato
OAS	O-acetilserina
OAS-TL	Enzima O-acetilserina tioliasa
Oex PGDH1	Línea sobreexpresora del gen <i>PGDH1</i>
Oex PGDH3	Línea sobreexpresora del gen <i>PGDH3</i>
P680	Dímero de clorofilas a presentes en el PSII
P700	Dímero de clorofilas a presentes en el PSI
PAPS	3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato
PCA	Análisis de componentes principales
PCK	Enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGAP	Enzima 3-fosfoglicerato fosfatasa
PGDH	Enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa
<i>PGDH1</i>	Gen que codifica la enzima isoforma 3-fosfoglicerato deshidrogenasa 1

<i>pgdh1-2</i>	Alelo mutante del gen <i>PGDH1</i>
<i>PGDH1pgdh1-2</i>	Planta heterocigota que tiene un alelo del gen <i>PGDH1</i> mutado
<i>PGDH2</i>	Gen que codifica la enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa 2
<i>pgdh2-2</i>	Alelo mutante del gen <i>PGDH2</i>
<i>pgdh2-2 pgdh3-2</i>	Mutante doble para los genes <i>PGDH2</i> y <i>PGDH3</i>
<i>pgdh2-3</i>	Alelo mutante del gen <i>PGDH2</i>
<i>pgdh2-3 pgdh3-1</i>	Mutante doble para los genes <i>PGDH2</i> y <i>PGDH3</i>
<i>PGDH3</i>	Gen que codifica la enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa 3
<i>pgdh3-1</i>	Alelo mutante del gen <i>PGDH3</i>
<i>pgdh3-2</i>	Alelo mutante del gen <i>PGDH3</i>
PGR5	Del inglés <i>proton gradient regulation 5</i> . Es una proteína implicada en la transferencia de electrones desde la ferredoxina hasta la plastoquinona
PGRL1	Del inglés <i>proton gradient regulation 5-like photosynthetic phenotype 1</i> . Relacionada con PGR5
Pi	Fosfato inorgánico
PIPES	Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
pMCG1005 <i>ProUbi:PGDH1-GFP</i>	Vector de transformación pMCG1005 que expresa el cDNA del gen <i>PGDH1</i> bajo el control del promotor del gen de la ubiquitina de maíz
pMDC100 <i>Pro35S:PSP1-GFP</i>	Vector de transformación pMDC100 que expresa el cDNA del gen <i>PSP</i> bajo el control del promotor constitutivo 35S
pMDC83 <i>Pro35S:PGDH1-GFP</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>PGDH1</i> bajo el control del promotor constitutivo 35S
pMDC83 <i>Pro35S:PSP1-GFP</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>PSP1</i> bajo el control del promotor constitutivo 35S
pMDC83 <i>ProHS:PSP1-GFP</i>	Vector de transformación pMDC83 que expresa el cDNA del gen <i>PSP1</i> bajo el control del promotor <i>HS</i>
pMDC86 <i>Pro35S:PSAT1-GFP</i>	Vector de transformación pMDC86 que expresa el cDNA del gen <i>PSAT1</i> bajo el control del promotor constitutivo 35S

PQH2	Plastoquinona reducida
<i>Pro35S:PGDH1-GFP</i>	Construcción génica del gen <i>PGDH1</i> bajo el control del promotor constitutivo <i>35S</i> y unido a la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>Pro35S:PSAT1-GFP</i>	Construcción génica del gen <i>PSAT1</i> bajo el control del promotor constitutivo <i>35S</i> del virus del mosaico de la coliflor y unido a la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>Pro35S:PSP1-GFP</i>	Construcción génica del gen <i>PSP1</i> bajo el control del promotor constitutivo <i>35S</i> del virus del mosaico de la coliflor y unido a la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>ProHS:PGDH1-GFP</i>	Construcción génica del gen <i>PGDH1</i> bajo el control del promotor por choque térmico <i>HS</i> y unido a la secuencia del gen <i>GFP</i>
<i>ProPGDH1:PGDH1</i>	Gen <i>PGDH1</i> bajo el control del promotor del gen <i>PGDH1</i>
<i>ProUbi:PGDH1-GFP</i>	Construcción génica del gen <i>PGDH1</i> bajo el control del promotor del gen de la ubiquitina del maíz y unido a la secuencia del gen <i>GFP</i>
PSAT	Enzima 3-fosfoserina aminotransferasa
<i>PSAT1</i>	Gen que codifica la enzima 3-fosfoserina aminotransferasa 1
<i>PSAT2</i>	Gen que codifica la enzima 3-fosfoserina aminotransferasa 2
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PSP	Enzima 3-fosfoserina fosfatasa
<i>PSP1</i>	Gen que codifica la enzima 3-fosfoserina fosfatasa
<i>psp1.1</i>	Alelo mutante del gen <i>PSP1</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RFBS	Ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina
RNasa	Ribonucleasa
S <sup>2-</sup>	Sulfuro
Sales MS	Sales de Murashige y Skoog
SAT	Enzima serina acetiltransferasa

SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SHMT	Enzima serina hidroximetiltransferasa
SIR	Enzima sulfito reductasa
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolic represor</i>
SOT	Sulfotransferasas
T1	Primera generación de plantas transgénicas
T2	Segunda generación de plantas transgénicas
T3	Tercera generación de plantas transgénicas
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TB	Tampón de transformación utilizado en la obtención de células competentes de <i>E. coli</i>
TBE	Tampón compuesto por 45 mM de ácido bórico, 45 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 1 mM de EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
T-DNA	ADN de transferencia
TriOex	Plantas triples sobreexpresoras de los genes <i>PGDH1</i> , <i>PSAT1</i> y <i>PSP1</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
ts-pgdh1.1 y ts-pgdh1.2	Líneas silenciadas del gen <i>PGDH1</i>
ts-psat1.1 y ts-psat1.2	Líneas silenciadas del gen <i>PSAT1</i>
UV	Ultravioleta
WT	Control silvestre
ZmOex PGDH1	Plantas de maíz sobreexpresoras del gen <i>PGDH1</i> de <i>Arabidopsis</i>

## Índice de Figuras

**Figura 1.1.** Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis.

**Figura 1.2.** Representación esquemática en Z de la cadena de transporte de electrones representando los potenciales redox de todos los componentes implicados en la cadena de transporte de electrones.

**Figura 1.3.** Representación esquemática de la interconexión entre la fase lumínica y la fase oscura de la fotosíntesis, en la cual, durante la fase oscura se utiliza el poder reductor en forma de NADPH y la energía en forma de ATP, formados en la fase lumínica, para la síntesis de moléculas orgánicas a partir de CO<sub>2</sub> en la fase oscura.

**Figura 1.4.** Representación esquemática del ciclo de Calvin-Benson-Bassham.

**Figura 1.5.** Representación esquemática de la fotorrespiración en plantas.

**Figura 1.6.** Esquema de los diferentes tipos de metabolismo fotosintético en plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM.

**Figura 1.7.** Ruta de asimilación del amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y del nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en plantas mediante la ruta glutamina sintetasa/glutamina oxoglutarato aminotransferasa.

**Figura 1.8.** Ruta de asimilación del azufre en plantas.

**Figura 1.9.** Representación esquemática de la estructura química de los flavonoides.

**Figura 1.10.** Ejemplos de terpenos y sus estructuras químicas.

**Figura 1.11.** Representación gráfica de la planta *Papaver somniferum* a la izquierda de la imagen y representación de la estructura química de la morfina (en la esquina inferior derecha de la imagen) que se obtiene de esta especie vegetal.

**Figura 1.12.** Representación de las tres rutas de síntesis de serina en plantas y su conexión con otras rutas metabólicas.

**Figura 1.13.** La serina recupera el crecimiento de la raíz en dobles mutantes de la enzima GAPCp (*g1.1g1.1 g2.1g2.1*).

**Figura 1.14.** Modelo propuesto sobre las rutas metabólicas afectadas por la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPC) plastidial (GAPCp).

**Figura 1.15.** La ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina es esencial para el crecimiento en presencia de luz.

**Figura 1.16.** Representación de la contribución de la ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina y la ruta del Glicolato al metabolismo del azufre.

**Figura 1.17.** Morfología (A) y ciclo vital (B) de *Arabidopsis thaliana*.

**Figura 1.18.** Representación gráfica de la planta teosinte (A) y de una planta de maíz cultivada (B) junto con el fruto.

**Figura 1.19.** Diferentes estrategias de modificación de las rutas metabólicas por ingeniería metabólica: 1) Modificación de la actividad enzimática. 2) Sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis de precursores. 3) Silenciamiento génico por ARN de interferencia o antisentido. 4) Promoción de la síntesis de compartimentos para metabolitos específicos.

**Figura 3.1.** Esquema de la posición de los cebadores (imagen de la izquierda) y representación de las bandas esperadas tras la PCR en líneas silvestres (WT), heterocigotas (He) y homocigotas mutantes (Ho) realizando una PCR con los tres cebadores (imagen de la derecha).

**Figura 3.2.** Esquema del plásmido pBeloBAC-Kan.

**Figura 3.3.** Esquema del plásmido pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO<sup>®</sup>.

**Figura 3.4.** Esquema del T-DNA del plásmido pMDC86. Este plásmido deriva del pMDC83 al cual se le sustituyó el gen de resistencia a higromicina por el gen de resistencia a BASTA.

**Figura 3.5.** Esquema del T-DNA del plásmido pMDC100.

**Figura 3.6.** Protocolo modificado de preparación de los extractos para los análisis metabolómicos.

**Figura 4.1.** Cuantificación de la expresión relativa de los genes de la familia *PGDH*.

**Figura 4.2.** Caracterización fenotípica y molecular de los mutantes condicionales de los genes *PGDH1* y *PSP1* (*c-pgdh1-2* y *c-psp1-1*) de plantas crecidas en placa (durante 13 días).

**Figura 4.3.** Fotografías de plantas silvestres (WT) y de plantas mutantes condicionales para el gen *PGDH1* (*c-pgdh1-2*) crecidas en invernadero bajo condiciones de no inducción o inducción a 37°C durante 1 hora cada día.

**Figura 4.4.** Comparación de los mutantes condicionales *PGDH1* (*c-pgdh1-2*) y *PSP1* (*c-psp1-1*) crecidos en placa (durante 17 días) o en condiciones de invernadero (durante 46 días).

**Figura 4.5.** Caracterización fenotípica de los mutantes simples y dobles de *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-2*, *pgdh2-3*, *pgdh3-1*, *pgdh3-2*, *pgdh2-3 pgdh3-1* y *pgdh2-2 pgdh3-2*) crecidos en placa (durante 15 días) o en condiciones de invernadero (durante 46 días).

**Figura 4.6.** Perfil metabolómico de los mutantes simples y dobles de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, y *pgdh2-3 pgdh3-1*).

**Figura 4.7.** Metabolitos que explican las diferencias entre los mutantes simples y dobles de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, y *pgdh2-3 pgdh3-1*) en parte aérea (A) y raíces (B) de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

**Figura 4.8.** Caracterización fenotípica de plantas crecidas *in vitro* (durante 15 días) de los dobles y triples mutantes (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y *c-pgdh1-2- pgdh2-3 pgdh3-1*), del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) y de plantas control (WT).

**Figura 4.9.** Caracterización fenotípica de plantas crecidas en condiciones de invernadero (durante 24 días) de los dobles y triples mutantes (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y *c-pgdh1-2- pgdh2-3 pgdh3-1*), del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) y de plantas control (WT).

**Figura 4.10.** Perfil metabolómico de los mutantes dobles y triples de la familia *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*).

**Figura 4.11.** Metabolitos que explican las diferencias entre los mutantes dobles y el triple de los genes *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) en parte aérea (A) y raíces (B) de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

**Figura 4.12.** Análisis filogenético y de expresión de los genes *PGDH* de *Arabidopsis*.

**Figura 4.13.** Análisis de correlación de la expresión entre los genes *PGDH1* y *PGDH2* (A), entre *PGDH1* y *PGDH3* (B) y entre *PGDH2* y *PGDH3* (C) durante condiciones de estrés biótico (puntos de color amarillo) o estrés abiótico (puntos de color rojo).

**Figura 4.14.** Análisis de la expresión de los genes de la familia *PGDH* en líneas mutantes crecidas en placas durante 15 días y comparadas con la línea silvestre (WT).

**Figura 4.15.** Esquema de obtención de las líneas triple sobreexpresoras a partir de la línea Oex *PGDH1-L1* (A; llamadas TriOex1) o de la línea Oex *PGDH1-L2* (B; llamadas TriOex2) transformadas con las construcciones *Pro35S:PSAT1-GFP* y *Pro35S:PSP1-GFP*.

**Figura 4.16.** Análisis qRT-PCR de la expresión los tres genes principales de la RFBS, *PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1* en parte aérea (A) y en raíces (B) en las diferentes líneas triples sobreexpresoras (TriOex) de plantas de 14 días crecidas *in vitro* comparadas con plantas control.

**Figura 4.17.** Análisis por qRT-PCR en hojas (A) y en raíces (B) de la expresión del gen *PGDH1* de *Arabidopsis* en plantas transgénicas de maíz (ZmOex *PGDH1*) cultivadas durante 20 días en condiciones de invernadero.

**Figura 4.18.** Caracterización fenotípica de las líneas triple sobreexpresoras (TriOex) y sobreexpresoras del gen *PGDH1* (Oex *PGDH1*) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm) (A y B) y de alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm) (C y D) de plántulas de 14 días crecidas *in vitro*.

**Figura 4.19.** Metabolitos de la parte aérea que explican las diferencias entre condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm) (A) y condiciones de alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm) (B) de las líneas Oex *PGDH1* y TriOex respecto al control de acuerdo al análisis realizado en el PCA.



**Figura 4.20.** Contenido relativo de serina en parte aérea en las líneas Oex PGDH1 y TriOex (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49).

**Figura 4.21.** Metabolitos que explican las diferencias en raíces en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm) (A) y en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm) (B) de las líneas Oex PGDH1 y TriOex respecto al control de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

**Figura 4.22.** Contenido relativo de serina en raíces en las líneas Oex PGDH1 y TriOex (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49).

**Figura 4.23.** Análisis del contenido de almidón (A y B) y proteínas (C y D) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm; barras blancas) y alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm; barras grises) en la parte aérea (A y C) y en las raíces (B y D) para plantas TriOex y Oex PGDH1 de 14 días crecidas *in vitro*.

**Figura 4.24.** Análisis del contenido de almidón (A, B y C) y proteínas (D, E y F) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental en hojas (A y D), tallos (B y E) y raíces (C y F) en plantas ZmOex PGDH1 de 20 días crecidas en invernadero.

## Índice de Tablas

**Tabla 3.1.** Concentración de los antibióticos o herbicidas empleados en el cultivo *in vitro* de *Arabidopsis*.

**Tabla 3.2.** Concentración final de los antibióticos de selección en cultivo *in vitro* de bacterias.

**Tabla 3.3.** Lista de cebadores para *Arabidopsis* usados en este trabajo.

**Tabla 3.4.** Lista de cebadores para maíz usados en este trabajo.

**Tabla 4.1.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de los mutantes simples y doble de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, *pgdh2-3 pgdh3-1*) comparados con la línea silvestre (WT).

**Tabla 4.2.** Niveles de metabolitos en raíces de los mutantes simples y doble de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, y *pgdh2-3 pgdh3-1*) comparados con la línea silvestre (WT).

**Tabla 4.3.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de los mutantes dobles y triples *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) comparados con la línea silvestre (WT).

**Tabla 4.4.** Niveles de metabolitos en raíces de los mutantes dobles y triples *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) comparados con la línea silvestre (WT).

**Tabla 4.5.** Genes coexpresados junto a *PGDH3* de acuerdo con los resultados obtenidos en Genevestigator (<https://genevestigator.com/>).

**Tabla 4.6.** Genes coexpresados con *PGDH1* de acuerdo con los resultados obtenidos en Genevestigator (<https://genevestigator.com/>).

**Tabla 4.7.** Genes coexpresados junto a *PGDH2* de acuerdo con los resultados obtenidos en Genevestigator (<https://genevestigator.com/>).

**Tabla 4.8.** Parámetros fotosintéticos en plantas crecidas durante 30 días de las líneas de mutantes simples del gen *PGDH3* (*pgdh3-1* y *pgdh3-2*) y de plantas control (WT).

**Tabla 4.9.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm).

**Tabla 4.10.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm).

**Tabla 4.11.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de la línea control (WT), las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm) comparados con el WT crecido en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm).

**Tabla 4.12.** Niveles de metabolitos en raíces de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm).

**Tabla 4.13.** Niveles de metabolitos en raíces de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm).

**Tabla 4.14.** Niveles de metabolitos en raíces de la línea control (WT), de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm) comparados con el WT en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm).



La L-serina es un aminoácido que forma parte de las proteínas además de participar en los centros catalíticos de estas. También es la precursora de otras moléculas esenciales como nucleótidos y lípidos, y participa en el metabolismo del folato siendo dadora de moléculas de un carbono. A diferencia de los animales, donde solamente existe una ruta de síntesis de serina, las plantas presentan varias rutas metabólicas. Una de ellas, la llamada ruta del Glicolato, está relacionada con la fotorrespiración, y es considerada la más importante a nivel cuantitativo. Hay otras dos rutas no asociadas a la fotorrespiración. Una de ellas es conocida como ruta del Glicerato y no ha sido caracterizada funcionalmente porque algunos genes de la ruta no han sido identificados. La otra ruta no fotorrespiratoria es conocida como Ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina (RFBS), y ha sido recientemente descrita como esencial para el desarrollo de la raíz, del polen y del embrión. Se ha demostrado que la RFBS interacciona con la asimilación del amonio y del azufre. El primer paso de la RFBS es la reacción catalizada por la enzima fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH) que cataliza la oxidación del 3-fosfoglicerato en 3-fosfohidroxipiruvato formando poder reductor en forma de NADH. En *Arabidopsis thaliana* existen tres genes que codifican para esta enzima (*PGDH1*, *PGDH2* y *PGDH3*). En estudios anteriores *PGDH1* ha sido descrito como el gen esencial de la familia génica *PGDH*. Por el contrario, se desconocen las funciones de los genes *PGDH2* y *PGDH3*. En esta tesis doctoral, hemos caracterizado los genes *PGDH2* y *PGDH3*. Los análisis metabolómicos, fenotípicos y de expresión de los mutantes simples, dobles y el triple de los genes *PGDH*, muestran que tanto *PGDH2* como *PGDH3* son genes funcionales que afectan al desarrollo y metabolismo de la planta. Los resultados obtenidos muestran que *PGDH2* tiene un efecto mayor en el crecimiento de la planta que *PGDH3*, presentando una función parcialmente redundante con el gen principal de la familia, *PGDH1*. *PGDH3*, por el contrario, podría tener una función completamente diferente a los otros dos genes de la familia *PGDH*, estando su función en la actualidad asociada a procesos relacionados con la fotosíntesis.

Por otro lado, hemos estudiado la participación de la RFBS en el metabolismo del nitrógeno y del carbono mediante una estrategia de ganancia de función a nivel de las tres enzimas de la RFBS (PGDH; fosfoserina amino transferasa, PSAT; y fosfoserina fosfatasa, PSP) y a nivel de solo una (*PGDH1*), tanto en condiciones ambientales como en condiciones en las cuales existe una baja tasa fotorrespiratoria (elevado CO<sub>2</sub> que simula el cambio climático), donde por tanto, hay una menor actividad de la ruta del Glicolato. Es importante estudiar la función

de la RFBS en las condiciones ambientales actuales y en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, ya que uno de los aspectos del cambio climático es un aumento de este gas, que podría estar alterando el metabolismo vegetal y especialmente el suministro de serina a través de la ruta del Glicolato. Para ello obtuvimos líneas triples sobreexpresoras (TriOex) para los tres genes principales de la ruta (*PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1*) y se analizaron los cambios fenotípicos y metabolómicos de estas líneas junto con plantas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (Oex *PGDH1*) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental y elevado CO<sub>2</sub>. Los datos obtenidos muestran que la sobreexpresión de la ruta a nivel de los tres genes no afecta al crecimiento de la planta en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, sí que es beneficiosa para el crecimiento de las raíces en condiciones de elevado CO<sub>2</sub>. Los resultados metabolómicos obtenidos muestran que las líneas sobreexpresoras de la RFBS tienen afectado principalmente el metabolismo de aminoácidos, incrementándose los niveles de estos. Además, estas líneas son capaces de mantener la homeostasis del metabolismo de los aminoácidos mejor que las plantas control en condiciones de elevado CO<sub>2</sub>. Cuando nos centramos en el caso concreto del aminoácido serina podemos comprobar que en las líneas sobreexpresoras (TriOex y Oex *PGDH1*) se consiguen niveles mayores que en el control. Sin embargo, estos niveles son similares entre esas líneas, independientemente de que se sobreexpresen solo un gen o los tres. También se ha conseguido un mayor contenido de almidón y proteínas en estas líneas sobreexpresoras cultivadas en CO<sub>2</sub> ambiental y en elevado CO<sub>2</sub> comparado con los controles crecidos en las mismas condiciones. En general, el cultivo de las plantas en elevado CO<sub>2</sub> reduce el contenido en proteínas y aumenta el de almidón. Las líneas sobreexpresoras de la RFBS cultivadas en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> mantienen su contenido proteico en niveles similares a los del control cultivado en condiciones ambientales.

Por último, en esta tesis también se ha querido estudiar el papel de la RFBS en una planta con metabolismo C<sub>4</sub>, con baja tasa fotorrespiratoria, donde el aporte de serina a través de esta ruta no es tan importante. Para ello se usó una estrategia de ganancia de función, obteniendo plantas de maíz sobreexpresoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis*. En este caso, se observó un incremento del contenido de almidón en las líneas transgénicas de maíz en comparación con el control. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales, ya que los resultados obtenidos se han conseguido en condiciones ambientales y con un gen heterólogo al genoma del maíz, y faltaría comprobar cómo responden estas plantas transgénicas en otras condiciones, como por ejemplo en ambientes enriquecidos en CO<sub>2</sub>.

La L-serina es un aminoàcid que forma part de les proteïnes a més de participar en els centres catalítics d'aquestes. També es la precursora d'altres molècules essencials com nucleòtids i lípids, i participa en el metabolisme del folat sent dadora de molècules d'un carboni. A diferencia dels animals, que només presenten una ruta de síntesis de serina, les plantes presenten varies rutes metabòliques. Una d'aquestes, nomenada ruta del Glicolat, està relacionada amb la fotorespiració, i es considerada com la més important a nivell quantitatiu. Hi ha dues rutes no associades a la fotorespiració. Una d'elles es coneguda com la ruta del Glicerat y no ha sigut caracteritzada funcionalment perquè alguns gens de la ruta no han sigut identificats. L'altra ruta no fotorespiratòria es coneguda com Ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina (RFBS), i ha sigut recentment descrita com essencial per al desenvolupament de l'arrel, del pol·len y de l'embrió. S'ha demostrat que la RFBS interacciona amb l'assimilació del amoni i del sofre. El primer pas de la RFBS es la reacció catalitzada per el enzim fosfoglicerat deshidrogenasa (PGDH) que catalitza la oxidació del 3-fosfoglicerat en 3-fosfohidroxipiruvat formant poder reductor en forma de NADH. En *Arabidopsis thaliana* existeixen tres gens que codifiquen per a aquest enzim (*PGDH1*, *PGDH2* i *PGDH3*). En estudis previs *PGDH1* ha sigut descrit com el gen essencial de la família gènica *PGDH*. Per contra, es desconeixen les funcions dels gens *PGDH2* i *PGDH3*. Els anàlisi metabòlics, fenotípics i d'expressió dels mutants simples, dobles i el triple mutant dels gens *PGDH*, mostren que tant *PGDH2* com *PGDH3* son gens funcionals que afecten al desenvolupament i metabolisme de la planta. Els resultats obtinguts mostren que *PGDH2* te un efecte major en el creixement de la planta que *PGDH3*, presentant una funció parcialment redundat amb el gen principal de la família, *PGDH1*. *PGDH3*, per contra, podria tindre una funció completament diferent als altres dos gens de la família *PGDH*, estant la seua funció associada a processos relacionats amb la fotosíntesis.

Per altra banda, hem estudiat la participació de la RFBS en el metabolisme del nitrogen i del carboni mitjançant una estratègia de guany de funció a nivell dels tres enzims de la RFBS (PGDH; fosfoserina aminotransferasa, PSAT; y fosfoserina fosfatasa, PSP) i a nivell de només una (*PGDH1*), tant en condicions en les quals existeix una baixa tasa fotorespiratòria (elevat CO<sub>2</sub> que simula el canvi climàtic), on per tant, hi ha una menor activitat de la ruta del Glicolat. Es important estudiar la funció de la RFBS en les condicions ambientals actuals i en condicions de elevat CO<sub>2</sub>, ja que un dels aspectes del canvi climàtic es un augment d'aquest gas, que podria estar alterant el metabolisme vegetal i especialment el subministrament de

serina a través de la ruta del Glicolat. Per això vam obtenir línies triples sobreexpressores (TriOex) per als tres gens principals de la ruta (*PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1*) i s'analitzaren els canvis fenotípics i metabolòmics d'aquestes línies juntament amb plantes sobreexpressores del gen *PGDH1* (Oex *PGDH1*) en condicions de CO<sub>2</sub> ambiental i elevat CO<sub>2</sub>. Les dades obtingudes mostren que la sobreexpressió de la ruta a nivell dels tres gens no afecta al creixement de la planta en condicions ambientals de CO<sub>2</sub>. No obstant això, sí que es beneficia per al creixement de les arrels en condicions de elevat CO<sub>2</sub>. Els resultats metabolòmics obtinguts mostren que les línies sobreexpressores de la RFBS tenen afectat principalment el metabolisme d'aminoàcids, incrementant-se el nivell d'aquests. A més, aquestes línies poden mantenir l'homeòstasi del metabolisme dels aminoàcids millor que les plantes control en condicions de elevat CO<sub>2</sub>. Quan ens centrem en el cas concret de l'aminoàcid serina podem comprovar que en les línies sobreexpressores (TriOex i Oex *PGDH1*) s'aconsegueixen nivells més grans que en el control. Tanmateix, aquests nivells són similars entre aquestes línies, independentment de que es sobreexpresse només un gen o els tres. També s'ha aconseguit un contingut més gran de midó i proteïnes en aquestes línies sobreexpressores cultivades en CO<sub>2</sub> ambiental i en elevat CO<sub>2</sub> comparat amb els controls crescuts en les mateixes condicions. En general, el cultiu de les plantes en elevat CO<sub>2</sub> redueix el contingut en proteïnes i augmenta el de midó. Les línies sobreexpressores de la RFBS cultivades en condicions d'elevat CO<sub>2</sub> mantenen el contingut proteic en nivells similars als del control cultivat en condicions ambientals.

Per últim, en aquesta tesi també s'ha volgut estudiar el paper de la RFBS en una planta amb metabolisme C<sub>4</sub>, amb una baixa taxa fotorespiratòria, on l'aportació de serina mitjançant aquesta ruta no és tan important. Per això es va fer servir una estratègia de guany de funció, obtenint plantes de dacsca sobreexpressores del gen *PGDH1* d'*Arabidopsis*. En aquest cas, es va observar un increment del contingut de midó a les línies transgèniques de dacsca en comparació amb el control. No obstant això, caldrà estudis addicionals, ja que els resultats obtinguts s'han aconseguit en condicions ambientals i amb un gen heteròleg al genoma de la dacsca, i faltaria comprovar com responen aquestes plantes transgèniques en altres condicions, com per exemple en ambients enriquits en CO<sub>2</sub>.



L-serine is an amino acid that is part of proteins as well as participates in their catalytic centers. It is also the precursor of other essential molecules such as nucleotides and lipids, and it participates in the metabolism of folate by giving one-carbon molecules. Unlike animals, where there is only one serine biosynthesis pathway, plants have several metabolic pathways. One of them, the so-called Glycolate Pathway, is related to photorespiration and is considered the most important at the quantitative level. There are two other pathways not associated with photorespiration. One of them is known as the Glycerate Pathway and has not been functionally characterized because some genes of the pathway have not been identified. The other non-photorespiratory pathway is known as The Phosphorylated Pathway of Serine Biosynthesis (PPSB), and has recently been described as essential for root, pollen and embryo development. PPSB has been shown to interact with ammonium and sulfur assimilation. The first step of PPSB is the reaction catalyzed by the enzyme phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH) which catalyzes the oxidation of 3-phosphoglycerate to 3-phosphohydroxypyruvate forming NADH. In *Arabidopsis thaliana* there are three genes coding for this enzyme (*PGDH1*, *PGDH2* and *PGDH3*). In previous studies, *PGDH1* has been described as the essential gene of the *PGDH* family. In contrast, the functions of the *PGDH2* and *PGDH3* genes are unknown. In this thesis, we have characterized the *PGDH2* and *PGDH3* genes. Metabolomic, phenotypic and expression analyses of single, double and triple mutants of *PGDH* genes show that both *PGDH2* and *PGDH3* are functional genes affecting plant development and metabolism. The results obtained show that *PGDH2* has a greater effect on plant growth than *PGDH3*, presenting a partially redundant function with the main gene of the family, *PGDH1*. Moreover, *PGDH3* may have a completely different function to the other two genes of the *PGDH* family, and its function has currently being associated with processes related to photosynthesis.

On the other hand, we have studied the involvement of PPSB in nitrogen and carbon metabolism by a gain-of-function strategy at the level of the three PPSB enzymes (PGDH; phosphoserine aminotransferase, PSAT; and phosphoserine phosphatase, PSP) and at the level of only one (*PGDH1*). The studies were performed at ambient conditions and at conditions in which there is a low photorespiratory rate (elevated CO<sub>2</sub>), where there is a lower activity of the Glycolate Pathway. It is important to study the role of PPSB under present environmental conditions and under high CO<sub>2</sub> conditions, since one of the aspects of climate change is an increase of this gas, which could be altering plant

metabolism and especially serine supply through the Glycolate Pathway. The obtained data show that overexpression of the pathway at the level of the three genes does not affect plant growth under CO<sub>2</sub> environmental conditions. However, it is beneficial for root growth under high CO<sub>2</sub> conditions. The metabolomic results obtained show that PPSB overexpressing lines are mainly affected in the amino acid metabolism, increasing their levels. In this respect, these lines are able to maintain amino acid metabolism homeostasis better than control plants under high CO<sub>2</sub> conditions. In the specific case of serine, we observed that overexpressing lines (TriOex and Oex PGDH1) show higher levels than controls. However, these levels are similar between these lines, regardless of whether only one gene or all three are overexpressed. Higher starch and protein content was also shown by the overexpressing lines grown at ambient and elevated CO<sub>2</sub> compared to controls grown under the same conditions. In general, growing plants at high CO<sub>2</sub> reduces the protein content and increases the starch content. PPSB overexpressing lines grown under elevated CO<sub>2</sub> conditions maintain their protein content at levels similar to those of the control grown under ambient conditions.

Finally, in this thesis we also studied the role of PPSB in a plant with C<sub>4</sub> metabolism, with low photorespiratory rate, where the serine supply through the Glycolate pathway may not be so important. For this objective, a gain-of-function strategy was used, obtaining maize plants overexpressing the *Arabidopsis PGDH1* gene. In this case, an increase in starch content was observed in the transgenic maize lines compared to the control. However, further studies will be necessary, since the results obtained were obtained under environmental conditions and with a heterologous gene of the maize genome, and it remains to be tested how these transgenic plants respond under other conditions, such as CO<sub>2</sub>-enriched environments.

# 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1 Metabolismo en plantas

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de una célula y que incluyen una gran cantidad de reacciones moleculares (Karp, 2017; Judge y Dodd, 2020). Estas reacciones bioquímicas se dan en todo el conjunto de los seres vivos. En el caso de la célula vegetal estas reacciones pueden ocurrir en la pared celular, en el citoplasma o en los orgánulos celulares.

El metabolismo vegetal se divide en primario o central que abarca reacciones y vías absolutamente vitales para la supervivencia, y metabolismo secundario o especializado que, aunque su ausencia no sea tan perjudicial, se ha demostrado que cumple una multitud de funciones importantes para el crecimiento y el desarrollo, incluida la interacción de la planta con el medio ambiente (Pott et al., 2019).

En el metabolismo primario estarían incluidas entre otras reacciones la síntesis de aminoácidos, de proteínas y enzimas, de coenzimas y de materiales estructurales, la duplicación del material genético, el crecimiento o la absorción de nutrientes (Pott et al., 2019). El metabolismo primario vegetal incluye también el metabolismo del carbono, que englobaría la glicólisis y el ciclo de Krebs, el ciclo de Calvin y la fotorrespiración. Por último, el metabolismo primario vegetal incluye todos los procesos para la incorporación del nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), o nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a partir de la ruta de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT), y el metabolismo del azufre para su incorporación a moléculas orgánicas a partir del sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).

El metabolismo secundario o especializado incluye reacciones que sintetizan compuestos orgánicos que no están implicados directamente en el crecimiento y el desarrollo, aunque sí que influyen sobre estos. Por ejemplo, muchos metabolitos secundarios sintetizados en plantas están implicados en la defensa frente a patógenos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Fang et al., 2019).

El metabolismo primario y secundario están estrechamente relacionados, siendo algunos de los metabolitos sintetizados en el metabolismo primario los precursores para la síntesis de los metabolitos secundarios. Esta interrelación entre el metabolismo primario y secundario hace que la modificación del primero sea una diana de gran interés biotecnológico. Así, modificando una ruta del metabolismo

primario, además de obtener un efecto directo sobre la misma ruta, se puedan lograr cambios en productos finales del metabolismo secundario. Por ejemplo, se pueden conseguir modificaciones de interés agronómico, como potenciar la resistencia hacia un tipo de estrés o aumentar el contenido de algún metabolito que pueda tener interés biotecnológico. A continuación, se describen con detalle algunas de las rutas más importantes del metabolismo primario y secundario vegetal.

### 1.1.1 Metabolismo primario

#### 1.1.1.1. *Metabolismo del carbono.*

Dentro del metabolismo del carbono cabe destacar, la glicólisis, el ciclo de Krebs y, en el caso más concreto de las plantas, la fotosíntesis y la fotorrespiración. Nos centraremos en estos últimos.

#### **Fotosíntesis**

La fotosíntesis es el proceso que realizan los organismos fotosintéticos para producir materia orgánica a partir de materia inorgánica, mediante la utilización de la energía de la luz. Durante este proceso, la energía lumínica se transforma en energía química, en forma de NADPH y de ATP para posteriormente ser utilizados, entre otros, para la síntesis de hidratos de carbono a partir de la fijación de CO<sub>2</sub> (Baslam et al., 2021).

En el caso de las plantas este proceso se produce en los cloroplastos, unos orgánulos especializados que presentan unas estructuras membranosas en su interior, llamadas tilacoides, que contienen los complejos proteicos y moléculas capaces de captar y transferir la energía lumínica. Además, en el estroma de los cloroplastos se encuentran la mayoría de las enzimas que utilizan esa energía para convertir la materia inorgánica en orgánica.

La fotosíntesis, tradicionalmente se ha dividido en dos fases: la fase lumínica y la fase oscura. En la fase luminosa, donde se da la reacción fotoquímica, se produce el transporte de electrones que se dirigen, desde el agua hasta el NADP<sup>+</sup>, para finalmente generar poder reductor en forma de NADPH (Figura 1.1). El paso de los electrones por los diferentes complejos conlleva la acumulación de protones en el interior del lumen tilacoidal, generando un gradiente que permite a la ATP

sintasa de la membrana del tilacoide sintetizar, mediante fotofosforilación, ATP a partir del ADP y fosfato inorgánico (Pi). La segunda fase de la fotosíntesis es conocida como la fase oscura y se realiza en el estroma de los cloroplastos. Esta fase se conoce como ciclo de Calvin-Benson-Bassham (en honor a sus descubridores), ciclo de Calvin o ciclo de fijación del carbono.

Los complejos tilacoidales que participan en la fase luminosa de la fotosíntesis son el fotosistema II (PSII), el complejo citocromo b6f, el fotosistema I (PSI) y la ATP sintasa (que no interviene en el flujo electrónico pero que genera ATP por el gradiente electroquímico de  $H^+$  creado) (Figura 1.1). Los complejos de la cadena fotosintética se conectan mediante transportadores móviles (pool de plastoquinonas, plastocianina y ferredoxina), y finalmente, la enzima ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-reductasa (FNR) transfiere los electrones al NADP<sup>+</sup> (Figura 1.1). Los fotosistemas son los complejos proteína/pigmento que tienen la capacidad de captar la energía de los fotones y transformarla en energía redox. Se componen de un centro de reacción, donde se produce la separación de carga de una clorofila excitada, y de un complejo antena encargado de absorber la energía luminosa (LHC, del inglés *Light Harvesting Complex*). En la antena se encuentra la mayoría de los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) que absorben las diferentes energías de los fotones y que transfieren a los centros de reacción. La transferencia de energía entre los pigmentos de la antena se realiza desde pigmentos que absorben más energía (reciben fotones con menores longitudes de onda) hacia pigmentos que absorben menos energía (longitudes de onda mayores). En los centros de reacción se encuentran dos proteínas transmembrana unidas a un dímero de clorofila a (P680 en el caso del PSII y P700 en el PSI según la longitud de onda de luz a la cual absorben), un aceptor de los electrones (que recibe los electrones del dímero) y un donador de electrones que devuelve los electrones perdidos del dímero.

En el transporte lineal de electrones, los pigmentos del complejo antena absorben la energía de los fotones y la transfieren a otros pigmentos hasta llegar al centro de reacción del PSII (donde se encuentra el dímero de clorofilas P680). Al excitarse, el P680 pierde un electrón que es transferido a la feofitina, que posteriormente lo transfiere secuencialmente a las quinonas QA y QB. La reducción de la quinona QB necesita 2 electrones y 2 protones (que proceden del estroma del cloroplasto) lo que conduce a la formación de PQH<sub>2</sub> (plastoquinona reducida que se ha formado tras dos actos fotoquímicos). La PQH<sub>2</sub> pierde su afinidad por el

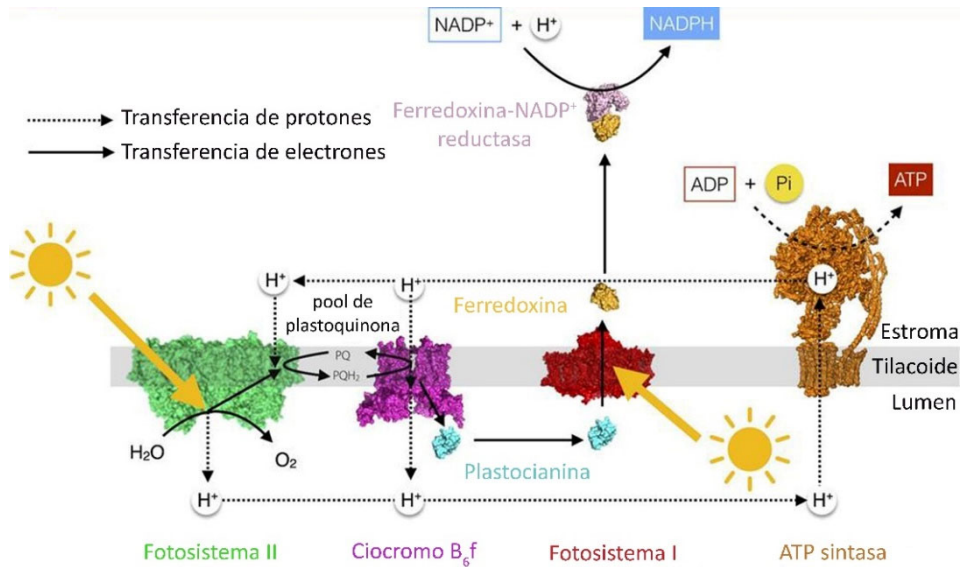
centro de reacción del PSII y se incorpora al pool de quinonas libres presente en la membrana del tilacoide. Desde este pool se dirige hacia el complejo citocromo b6f, donde cede los dos electrones, mientras que los 2 protones se liberan en el lumen tilacoidal. Esta oxidación de la plastoquinona tiene lugar mediante el ciclo Q que se compone de dos fases; en la primera, un electrón es transferido, vía citocromo f, a la plastocianina, que lo cederá al PSI, mientras que el otro es transferido, vía el citocromo b6, a una plastoquinona oxidada; en una segunda fase, otra PQH2 llega al citocromo b6f donde se repite el proceso anterior, y por tanto la plastoquinona oxidada recibe un segundo electrón, que junto con 2 protones del estroma, regeneran otra PQH2 que se incorpora al pool. En el centro de reacción del PSI, el dímero de clorofilas P700, que también había perdido un electrón por la absorción de un fotón, acepta el electrón de la plastocianina, lo que le capacita para iniciar un nuevo ciclo de excitación. A través de una serie de transportadores ligados al centro de reacción del PSI, el P700 dona finalmente el electrón a la ferredoxina y esta a la FNR. Cuando la FNR ha aceptado dos electrones es capaz de reducir el  $\text{NADP}^+$  a NADPH.

Como hemos visto, el transporte lineal de electrones se inicia con la oxidación del P680; pero ¿cómo recupera ese electrón perdido? El  $\text{P680}^+$  recupera su electrón del agua de una forma indirecta. A la parte periférica del PSII, que da al lumen tilacoidal, se le asocia el complejo oxidante del agua, el cual tiene 4 manganesos (Mn) unidos a proteínas, y cada Mn cede un electrón al P680 cada vez que este pierde uno. Cuando el complejo tiene los 4 Mn oxidados (debido a que han ocurrido 4 oxidaciones consecutivas del P680) se produce la hidrólisis de dos moléculas de agua que liberan un  $\text{O}_2$ , 4 protones y 4 electrones que reducen nuevamente a los 4 Mn.

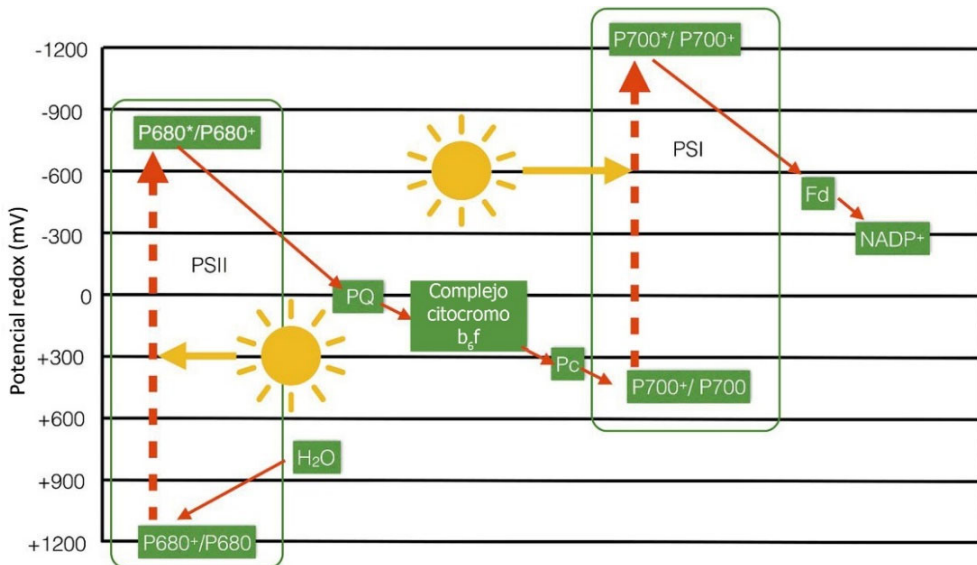
Este transporte lineal de electrones se conoce clásicamente como esquema en Z, ya que, al representar cada uno de los elementos oxidorreductores de la cadena respecto a su potencial redox aparece una Z invertida, correspondiendo las dos líneas verticales con los saltos energéticos de los electrones que tienen lugar en los dímeros de clorofilas a en los dos fotosistemas (Figura 1.2). El balance del esquema en Z es el siguiente: a partir de dos moléculas de agua se liberan un  $\text{O}_2$ , 4  $\text{H}^+$  (en el lumen tilacoidal) y 4 electrones que suplen los 4 perdidos por la oxidación de P680; por otro lado, se forman 2 plastoquinonas reducidas, que al oxidarse mediante el ciclo Q introducen 8  $\text{H}^+$  al tilacoide, y 2 moléculas de NADPH.



# 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 1.1** Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis. Este transporte se inicia con la fotólisis del agua y acaba con la formación de NADPH, produciendo durante su recorrido un gradiente de protones entre el estroma y el lumen para generar posteriormente ATP a través de la ATP sintasa. Figura modificada de Johnson (2016).



**Figura 1.2.** Representación esquemática en Z de la cadena de transporte de electrones representando los potenciales redox de todos los componentes implicados en la cadena de transporte de electrones. Abreviaturas: PSII (fotosistema II), PQ (pool de plastoquinonas), Pc (plastocianina), PSI (fotosistema I), Fd (ferredoxina). Figura modificada de Johnson (2016).

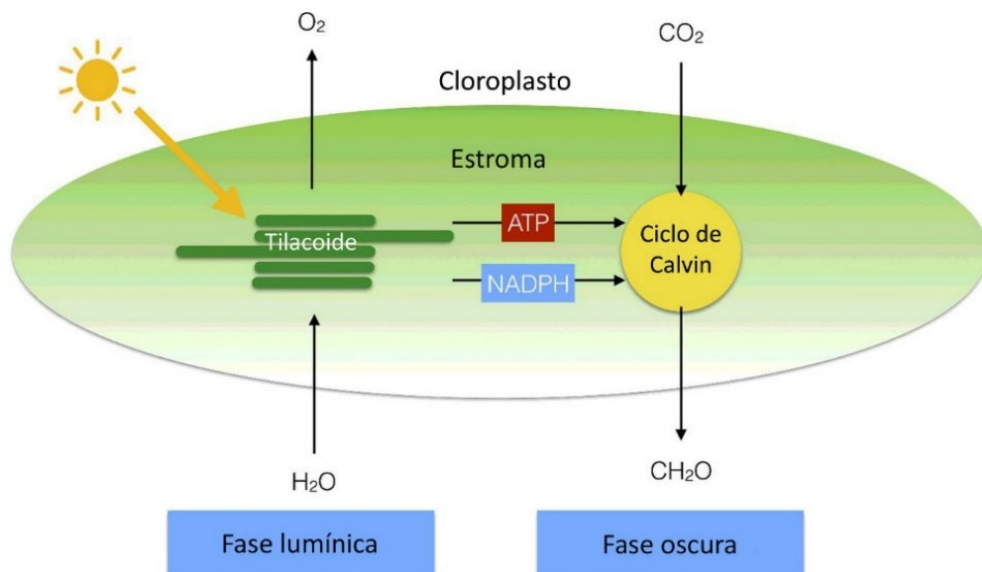
El flujo principal de electrones en la cadena fotosintética es el lineal (desde el agua hasta el  $\text{NADP}^+$ ). Se estima que para generar un ATP se necesita que **aproximadamente 4,66** protones pasen por la ATP sintasa desde el lumen del tilacoide hasta el estroma y por tanto el gradiente de protones generado por el flujo lineal (12  $\text{H}^+$  por cada  $\text{O}_2$  liberado), no sería suficiente para aportar los 3 ATPs necesarios para fijar una molécula de  $\text{CO}_2$ , como se explicará más adelante. Se sabe que, en paralelo a este flujo lineal, los electrones pueden seguir una ruta cíclica, que aumenta el gradiente de protones entre el lumen y el estroma y proporciona ATP extra. Esta ruta cíclica se desarrolla en torno al PSI (los electrones del P700 vuelven al P700 a través de la ferredoxina, pool de quinonas, citocromo b6f y plastocianina). También existe el denominado transporte electrónico pseudocíclico (ciclo agua-agua), que también produce ATP extra. En este ciclo, y como en el transporte lineal, los electrones cedidos por el agua llegan a la ferredoxina y esta los cede al oxígeno que formará agua nuevamente gracias a la acción de la superóxido dismutasa y la ascorbato peroxidasa (esta ruta puede proporcionar ATP cuando se dan casos en los que todo el NADP está en su forma reducida).

La fase oscura de la fotosíntesis se realiza en el estroma de los cloroplastos. Aunque en esta fase la luz no participa directamente en los procesos que tienen lugar, sí que depende de las moléculas generadas durante la fase lumínica, es decir, del poder reductor en forma de NADPH y de ATP (Figura 1.3) y, además, algunas de las enzimas implicadas en ella son activadas por la luz. Esta fase se inicia con la participación de la enzima Rubisco. Esta enzima es la más abundante en la Tierra y tiene dos actividades. Por un lado, tiene actividad carboxilasa fijando una molécula de  $\text{CO}_2$  que conduce al ciclo de Calvin, y por otro, tiene actividad oxigenasa uniendo una molécula de  $\text{O}_2$  y rompiendo una molécula de ribulosa 1-5 bisfosfato en dos moléculas, una de 3 carbonos [3-fosfoglicerato (3-PGA)] y otra de 2 carbonos [2-fosfoglicolato (2-PG)], iniciando una ruta conocida como fotorrespiración y que se describirá más adelante. El que la Rubisco funcione con actividad carboxilasa u oxigenasa depende de las concentraciones relativas del  $\text{CO}_2$  y del  $\text{O}_2$  en la atmósfera. Dado que la enzima tiene más afinidad por el  $\text{CO}_2$  que por el  $\text{O}_2$ , en condiciones atmosféricas normales, la actividad carboxilativa es tres veces mayor a la oxidativa.

Globalmente el ciclo de Calvin puede definirse como la carboxilación por la Rubisco de 3 moléculas de ribulosa 1,5 bisfosfato mediante la fijación de 3 moléculas de  $\text{CO}_2$ , generando 6 moléculas de 3-PGA. Esta primera parte del ciclo es

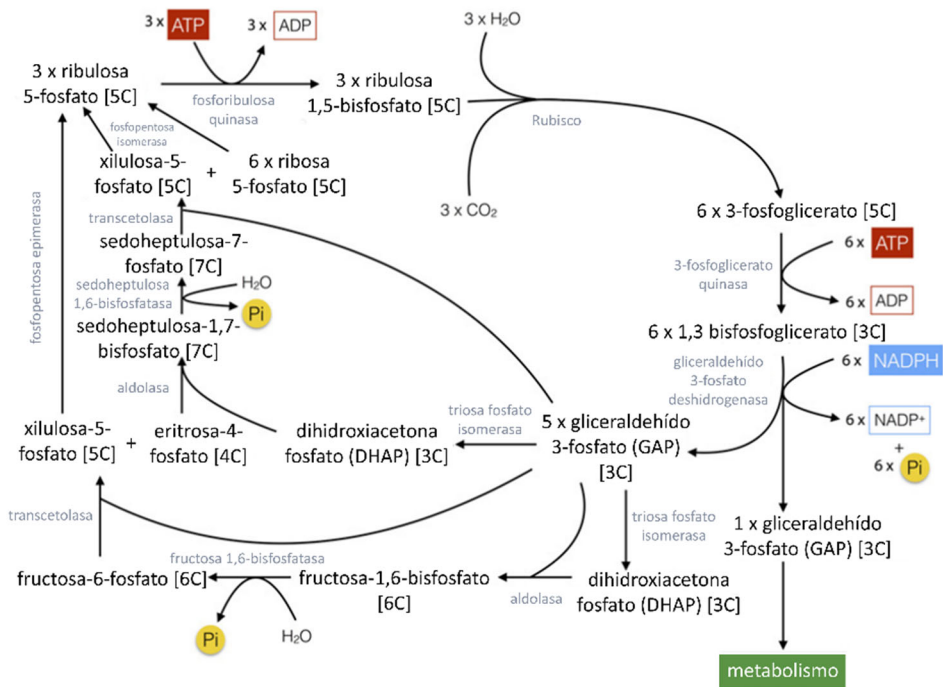
## 1. INTRODUCCIÓN

la fase de carboxilación. A continuación, en la fase reductora, el grupo carboxilo del 3-PGA se convierte en el grupo aldehído del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) en dos pasos sucesivos: en el primero las 6 moléculas de 3-PGA se convierten en 6 de 1,3-bisfosfoglicerato con el consumo de 6 ATPs, y en el segundo estas 6 nuevas moléculas se transforman en 6 moléculas de GAP con consumo de 6 NADPHs. Este GAP puede encontrarse también en forma de dihidroxiacetona fosfato por la acción de una isomerasa. Por último, en la fase regenerativa, 5 de las 6 GAPs formadas se utilizan para regenerar las 3 ribulosa 1,5-bisfosfato que comenzaron el ciclo, mientras que la sexta se utilizará para la síntesis de sacarosa y almidón, siendo por lo tanto el rendimiento neto del ciclo (Figura 1.4). Durante la fase regenerativa se van formando moléculas glucídicas de 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono hasta la regeneración de las 3 moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato, consumiéndose 3 ATPs. Por tanto, la estequiometría del ciclo de Calvin es: por cada tres moléculas de  $\text{CO}_2$  se produce una molécula de triosa fosfato y se consumen 9 ATPs y 6 NADPHs.



**Figura 1.3.** Representación esquemática de la interconexión entre la fase lumínica y la fase oscura de la fotosíntesis, en la cual, durante la fase oscura se utiliza el poder reductor en forma de NADPH y la energía en forma de ATP, formados en la fase lumínica, para la síntesis de moléculas orgánicas a partir de  $\text{CO}_2$  en la fase oscura. Figura modificada de Johnson (2016).

Las triosas netas generadas durante el ciclo de Calvin son la base para la síntesis de otros productos, ya sea en el mismo cloroplasto o en otros compartimentos celulares, sirviendo para la síntesis de azúcares, aminoácidos o ácidos grasos. Los dos productos principales de la fijación fotosintética del CO<sub>2</sub> son el almidón (sintetizado en el cloroplasto) y la sacarosa (sintetizada en el citoplasma).



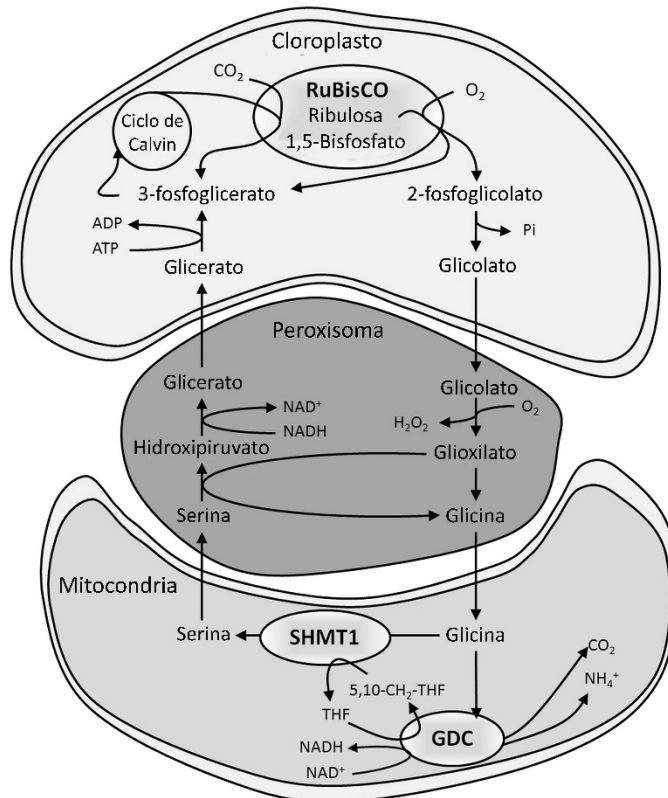
**Figura 1.4.** Representación esquemática del ciclo de Calvin-Benson-Bassham. Se inicia con la fijación del carbono del CO<sub>2</sub> a una molécula de ribulosa 1,5-bisfosfato para originar 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (esta primera parte se conoce como etapa de fijación y es catalizada por la Rubisco). A continuación, se reduce el carbono fijado hasta formar gliceraldehído 3-fosfato usando NADPH como poder reductor (etapa de reducción) y finalmente se regeneran las moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato para comenzar de nuevo el ciclo (fase de regeneración). Figura modificada de Johnson (2016).

### Fotorrespiración

Como se indicó previamente, la actividad oxigenasa de la Rubisco genera 3-PGA, que se integra en el ciclo de Calvin, y 2-PG, que resulta tóxico para la planta porque inhibe algunas enzimas del ciclo de Calvin e implica una pérdida de los carbonos fijados, por lo que esta última molécula se debe metabolizar y reconvertir en una molécula de 3-PGA mediante un proceso conocido como fotorrespiración o ruta C2 (Sage et al., 2012). Este proceso se lleva a cabo a través de tres orgánulos: cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias y el balance neto de la ruta conlleva la pérdida de un carbono a través de una molécula de  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4^+$ , que se recicla en el ciclo fotorrespiratorio del nitrógeno (Voll et al., 2006; Liu et al., 2019). La liberación del  $\text{CO}_2$  y del  $\text{NH}_4^+$  se lleva a cabo en una reacción enzimática que se da en la mitocondria, en la cual la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT) junto con el complejo enzimático glicina descarboxilasa (GDC), convierten 2 moléculas de glicina en una de serina produciéndose, además, la liberación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4^+$  (Figura 1.5). En primer lugar, una de las glicinas es desaminada y descarboxilada (en una reacción que necesita tetrahidrofolato) por la GDC produciendo  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  y 5,10-metileno tetrahidrofolato. Este último compuesto dona su carbono a la segunda glicina generando la molécula de serina en una reacción catalizada por la SHMT. Esta reacción, como veremos en capítulos posteriores, constituye una de las rutas de síntesis del aminoácido serina en la planta pudiendo salir del ciclo fotorrespiratorio si las necesidades de la planta lo requieren. Pero la serina también puede volver al peroxisoma, donde es transformada en hidroxipiruvato (por la serina-glutamato aminotransferasa) y este en glicerato (por la hidroxipiruvato reductasa) que será transportado al cloroplasto donde, tras fosforilarse (mediante la glicerato quinasa), formará 3-PGA que se incorporará al ciclo de Calvin. Considerando dos moléculas de 2-PG (4 carbonos), el balance final de la ruta es la formación de una molécula de 3-PGA (se recuperan 3 carbonos) y un  $\text{CO}_2$  (se pierde un carbono).

Existen distintos tipos de metabolismos fotosintéticos relacionados con la mayor o menor actividad oxigenasa de la Rubisco. Las plantas que al fijar el  $\text{CO}_2$  generan, como primer producto estable, un compuesto de 3 carbonos (3-PGA), se denominan plantas  $\text{C}_3$  y, en ellas, la actividad oxigenasa de la Rubisco es inevitable, lo que conlleva a pérdidas de productividad. Aunque la fotorrespiración no se puede eliminar en condiciones ambientales normales, lo que sí puede conseguirse es minimizarla aumentando la concentración de  $\text{CO}_2$  o reduciendo la presencia de

O<sub>2</sub> en el ambiente donde funciona la Rubisco. Algunas plantas de zonas áridas [plantas C<sub>4</sub> y CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas)] han desarrollado mecanismos de acumulación de CO<sub>2</sub> para reducir la incidencia de la fotorrespiración.



**Figura 1.5.** Representación esquemática de la fotorrespiración en plantas. La enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT1) convierte junto con la glicina descarboxilasa (GDC) dos moléculas de glicina en una molécula de serina, liberando CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Figura modificada de Liu et al., (2019).

Los tipos de metabolismo C<sub>4</sub> y CAM surgieron evolutivamente para reducir la actividad oxigenasa de la Rubisco y con ello reducir la tasa de fotorrespiración que conlleva la pérdida de un carbono y de energía. Una de las diferencias entre estos tres tipos de plantas es el tipo de metabolismo asociado en la fijación de CO<sub>2</sub>. En las plantas con metabolismo C<sub>3</sub> se carboxila una molécula de ribulosa 1,5 bisfosfato, mediante la Rubisco, para generar dos moléculas de 3 átomos de carbono, el 3-PGA. Por el contrario, en el metabolismo C<sub>4</sub> o CAM, el primer

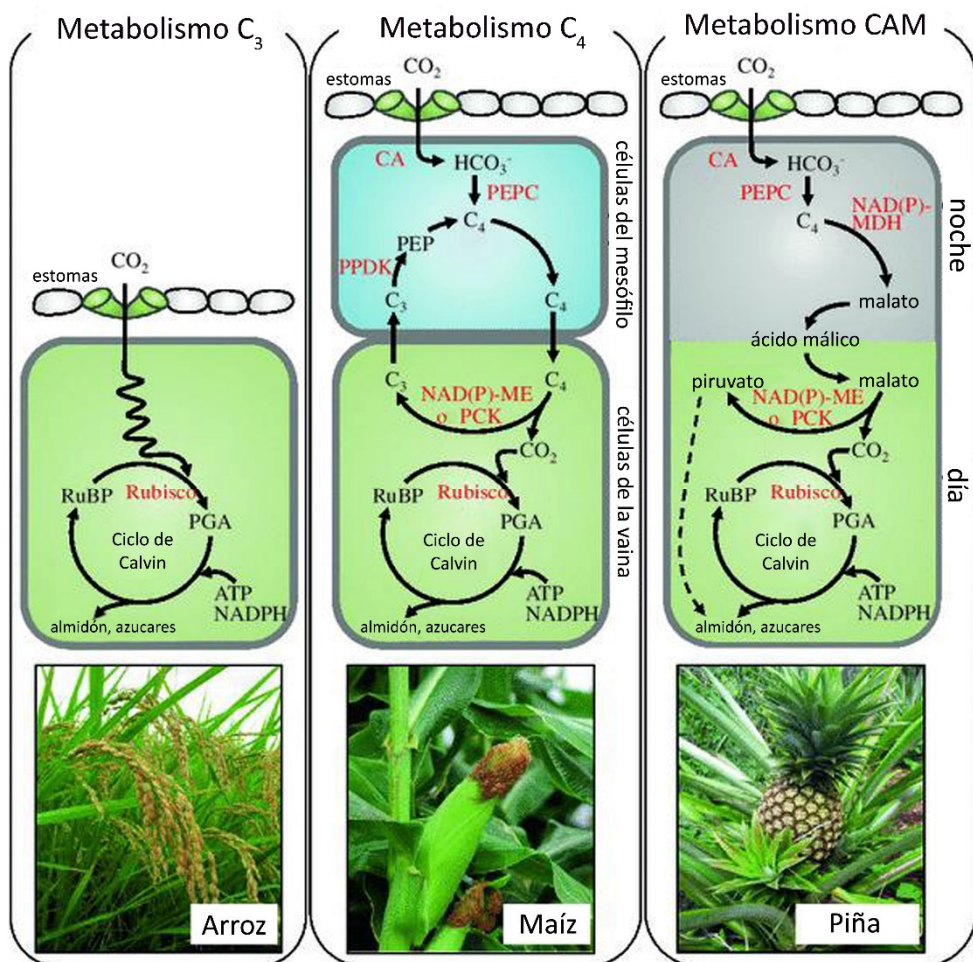
compuesto que se genera tras la fijación de  $\text{CO}_2$ , es un compuesto de 4 moléculas de carbono, el oxalacetato (OAA) a partir del fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa. Posteriormente, el OAA, se reduce para formar malato o aspartato. Finalmente, estos ácidos dicarboxílicos son descarboxilados para liberar el  $\text{CO}_2$  y ser usados por la Rubisco para la carboxilación de la ribulosa 1,5 bisfosfato en el ciclo de Calvin (enriqueciendo en  $\text{CO}_2$  el ambiente próximo a la enzima). Tanto en las plantas  $\text{C}_4$  como en las CAM existen tres subtipos en función de la enzima que participa en la descarboxilación (Yamori et al., 2014): subtipo NADP-ME (que utiliza la enzima málica dependiente de NADP), subtipo NAD-ME (que utiliza a la enzima málica dependiente de NAD), y el subtipo PCK (que utiliza a la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa).

Las plantas  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  y CAM presentan diferencias tanto en la disposición y distribución de los tipos celulares encargados de la fijación del  $\text{CO}_2$  como en la regulación temporal de los diferentes procesos (Figura 1.6). En plantas  $\text{C}_3$ , el  $\text{CO}_2$  difunde a través de los estomas y los espacios intercelulares y llega directamente a los cloroplastos. En las plantas  $\text{C}_4$ , se diferencian dos tipos celulares implicados en la fotosíntesis, las células de la vaina y las células del mesófilo. Las células de la vaina se distribuyen formando un anillo alrededor de los haces vasculares, mientras que las células del mesófilo se encuentran bajo la epidermis rodeando a las células de la vaina. De esta manera, es en las células del mesófilo donde se produce la carboxilación del PEP para generar malato y este malato es transportado posteriormente a las células de la vaina, donde es descarboxilado, aumentando la concentración relativa de  $\text{CO}_2$  en el entorno de la Rubisco para su fijación y minimizando las posibles pérdidas por fotorrespiración. Esta disposición, en la cual se genera una alta concentración de  $\text{CO}_2$  alrededor de la Rubisco, permite que las plantas que presentan metabolismo  $\text{C}_4$  cierren parcialmente los estomas durante el día y puedan vivir en zonas áridas con altas temperaturas y alta radiación.

Por otro lado, en las plantas CAM, lo que se produce es una separación temporal de la captación de  $\text{CO}_2$  y su posterior fijación. Por la noche, los estomas permanecen abiertos y esto permite la entrada de  $\text{CO}_2$  para su almacenamiento en forma de malato en la vacuola. Posteriormente, durante el día, el  $\text{CO}_2$  es liberado a partir del malato, aumentando de esta manera la concentración relativa del  $\text{CO}_2$  para su fijación en el ciclo de Calvin y minimizando por tanto la actividad oxigenasa de la Rubisco. Esto permite que las plantas CAM tengan los estomas cerrados durante el día reduciendo las pérdidas de agua por transpiración, lo que les permite

vivir en ambientes áridos y secos y con diferencias de temperatura grandes entre el día y la noche (Yamori et al., 2014).

Las plantas con metabolismo  $C_3$  representan el 85% de las conocidas, muchas de ellas con interés agronómico como espinacas (*Spinacia oleracea* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), o el arroz (*Oryza sativa* L.). Las plantas  $C_4$  representan el 5% y también tienen representantes de alto valor agronómico como el maíz (*Zea mays* L.) o la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). En cuanto a las plantas CAM, como las piñas [*A. comosus* (L.) Merr.] o especies del género *Agave*, representan el 10% (Yamori et al., 2014).





**Figura 1.6.** Esquema de los diferentes tipos de metabolismo fotosintético en plantas  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM. Las plantas  $C_3$  fijan el  $CO_2$ , que difunde a través de los estomas hasta los cloroplastos, en un compuesto de 3 carbonos, el 3-fosfoglicerato (PGA). Por el contrario, en las plantas  $C_4$  y CAM unen el  $CO_2$  a un compuesto de 3 carbonos [fosfoenolpiruvato (PEP)] para formar uno de 4 carbonos [el oxalacetato (OAA)]. Posteriormente, este OAA es reducido para formar malato. Por último, el malato es descarboxilado, liberando  $CO_2$  que es usado por la Rubisco para carboxilar la ribulosa1,5-bisfosfato (RuBP). La diferencia entre plantas  $C_4$  y plantas CAM está en que mientras en las plantas  $C_4$  separan la absorción de  $CO_2$  y su unión al fosfoenolpiruvato (PEP) para posteriormente fijarlo por la Rubisco en dos tipos celulares diferentes (células del mesófilo y células de la vaina), en las plantas CAM, ambos procesos ocurren en periodos diferentes del día. En este caso, la absorción del  $CO_2$  se da por la noche y su fijación durante el día. El significado de las abreviaturas es la siguiente: CA (anhidrasa carbónica), NAD-ME (enzima málica dependiente de NAD), NADP-ME (enzima málica dependiente de NADP), NAD(P)-MDH [NAD(P)-malato deshidrogenasa], PCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa), PPDK (piruvato fosfato diquinasa). Figura modificada de Yamori et al., (2014).

### 1.1.1.2 *Metabolismo del nitrógeno y del azufre.*

Las plantas también son capaces de captar nitrógeno y azufre inorgánico e incorporarlos a moléculas orgánicas para su uso en el crecimiento y desarrollo. Estos procesos pueden considerarse también parte de la fase oscura de la fotosíntesis en la que la energía de la luz se utiliza para incorporar el nitrógeno y azufre inorgánico a materia orgánica.

Las plantas pueden incorporar el nitrógeno inorgánico en forma de  $NO_3^-$  o en forma de  $NH_4^+$  del suelo (Figura 1.7). En algunos casos, se dan relaciones simbióticas entre plantas y bacterias diazotrofas que pueden reducir el  $N_2$  de la atmósfera a  $NH_4^+$ , de tal manera que la planta aporta sustancias orgánicas a las bacterias, y estas aportan nitrógeno en forma de  $NH_4^+$  a la planta.

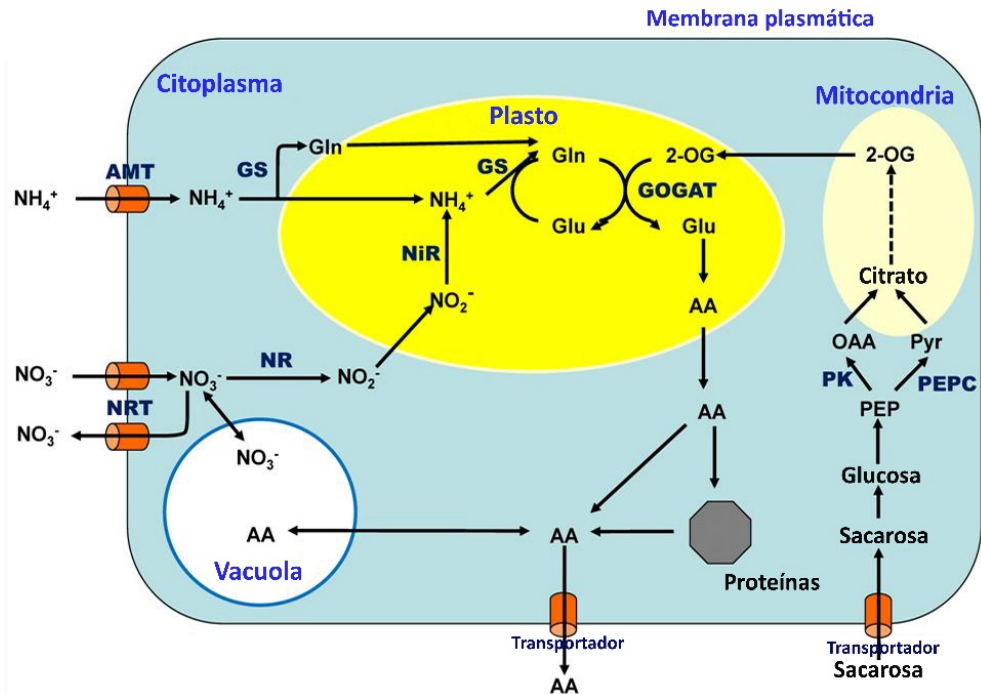
El  $NO_3^-$  o  $NH_4^+$  son absorbidos a través de las membranas de las células de las raíces mediante transportadores hacia el citoplasma (Figura 1.7). El  $NO_3^-$  es reducido a nitrito ( $NO_2^-$ ) por la enzima nitrato reductasa (NR) usando NADH o NADPH como poder reductor. Este  $NO_2^-$  es introducido en los plastos y reducido a  $NH_4^+$  por la enzima nitrito reductasa (NiR) usando ferredoxina como poder reductor. Este  $NH_4^+$  procedente de la reducción del  $NO_3^-$  por la enzima NiR, en una reacción que se da dentro del plasto, es usado por la GS plastidial, generando una molécula de glutamina a partir de la unión del  $NH_4^+$  al glutamato.

Por otro lado, el  $\text{NH}_4^+$  libre incorporado desde el suelo, se une al glutamato para formar glutamina, en una reacción catalizada por la enzima GS citosólica, mediante el consumo de ATP, y es transportada al plasto (Suárez et al., 2002; Baslam et al., 2021), (Figura 1.7). Posteriormente, el grupo amino de la glutamina (independientemente de su procedencia) es transferido a una molécula de 2-oxoglutarato (2-OG) para formar dos moléculas de glutamato. Esta reacción está catalizada por la enzima llamada GOGAT. De las dos moléculas de glutamato que se forman en la reacción catalizada por la GOGAT, una se reutiliza para volver a formar glutamina, en la reacción catalizada por la enzima GS plastidial y la otra molécula de glutamato es usada para la síntesis de compuestos nitrogenados como aminoácidos, bases nitrogenadas, poliaminas, etc. El nombre de la ruta de asimilación del  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  en plantas se conoce como la ruta GS/GOGAT debido a la acción de dichas enzimas (Suárez et al., 2002; Baslam et al., 2021) (Figura 1.7).

La asimilación de  $\text{NH}_4^+$  es todavía más compleja, puesto que también se genera  $\text{NH}_4^+$  durante la fotorrespiración y en las reacciones del catabolismo de proteínas y aminoácidos. Así en *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. (de ahora en adelante *Arabidopsis*) existen hasta 6 isoformas de la GS y 3 de la GOGAT implicadas en procesos específicos del metabolismo del  $\text{NH}_4^+$ .

Las plantas también son capaces de asimilar compuestos inorgánicos del azufre e incorporarlos a moléculas orgánicas implicadas en el crecimiento y desarrollo de la planta (Figura 1.8). Las plantas absorben azufre, en forma de  $\text{SO}_4^{2-}$ , a través de las células de la raíz, mediante unos transportadores llamados SULTRs (Li et al., 2020). El  $\text{SO}_4^{2-}$  una vez incorporado puede seguir varios caminos: puede almacenarse en la vacuola, puede metabolizarse en las raíces o bien puede ser transportado por el xilema hasta los tejidos fotosintéticos para ser también metabolizado e incorporado en forma de cisteína (Li et al., 2020). Una vez incorporado en forma de cisteína, esta puede ser utilizada para la síntesis metionina, de péptidos especializados como el glutatión (importante para el balance redox de la planta o resistencia a estrés), o para la síntesis de compuestos encargados en la protección frente a metales pesados, como las fitoquelatinas (Jez, 2019; Figura 1.8). El azufre también es muy importante en procesos de sulfatación de compuestos. Además, se ha visto que esta ruta de incorporación de azufre conecta con otras rutas metabólicas más especializadas, en las que se generan los precursores necesarios para la síntesis de, por ejemplo, los glucosinolatos,

moléculas encargadas de la defensa de la planta frente a patógenos (Ravilious y Jez, 2012).



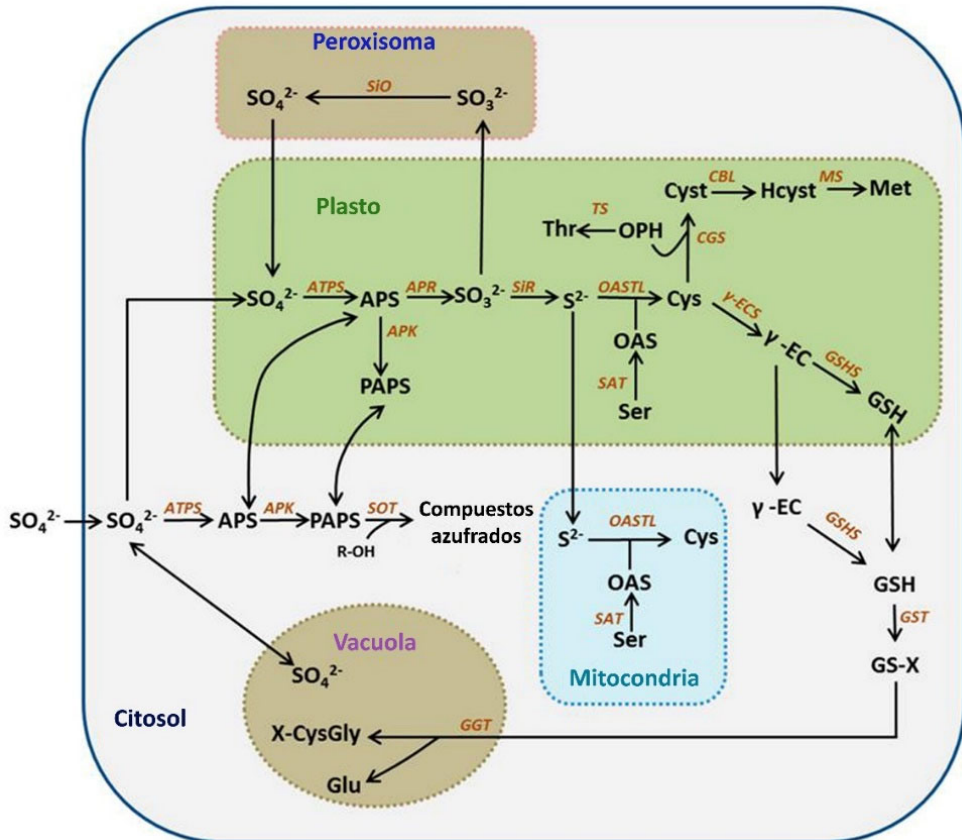
**Figura 1.7.** Ruta de asimilación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en plantas mediante la ruta glutamina sintetasa/glutamina oxoglutarato aminotransferasa. Abreviaturas: 2-OG (2-oxoglutarato), AA (aminoácidos), AMT (transportador de amonio), Gln (glutamina), Glu (glutamato), GOGAT (glutamato sintetasa), GS (glutamina sintetasa), NiR (nitrito reductasa), NR (nitrito reductasa), NRT (transportador de nitrato), OAA (oxalacetato), PEP (fosfoenolpiruvato), PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa), PK (piruvato quinasa), Pyr (piruvato). Figura modificada de Baslam et al., (2021).

Existen dos vías de incorporación del azufre, pero el primer paso para la incorporación del azufre es su activación con gasto de ATP, mediante la enzima ATP sulfurilasa, para formar adenosín 5'fosfosulfato (APS) (Figura 1.8). En la primera vía de incorporación, el azufre se puede incorporar a compuestos orgánicos mediante sulfotransferasas (SOT), y para ello, a partir de APS y ATP se forma 3-fosfoadenosín-

5-fosfosulfato (PAPS) por la acción de la APS quinasa. La PAPS puede ser usada por las SOT como precursor de compuestos azufrados como los glucosinolatos, jasmonatos y flavonoides. La otra vía de asimilación del azufre se da por completo en el plasto, y una vez el azufre ha sido activado en su forma APS, la enzima adenosín fosfosulfato reductasa (APR) reduce el  $\text{SO}_4^{2-}$  del APS generando sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), que es reducido nuevamente a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) por la acción de la sulfito reductasa (SIR). Una vez formado el  $\text{S}^{2-}$  una parte puede salir del plasto y quedarse en el citoplasma o ir a la mitocondria (en todos estos orgánulos se puede sintetizar cisteína). El  $\text{S}^{2-}$  es incorporado a la O-acetilserina (OAS) para formar cisteína mediante la actividad de la enzima O-acetilserina tioliasa (OAS-TL; Figura 1.8) (Li et al., 2020). Además de estas dos vías de incorporación del azufre (desde el  $\text{S}^{2-}$  y PAPS) también existe una ramificación de la ruta de asimilación reductiva del  $\text{SO}_4^{2-}$  en la que se forman los sulfolípidos a partir del  $\text{SO}_3^{2-}$  formado por la APR.

La OAS que se utiliza para la incorporación del  $\text{S}^{2-}$  proviene de la actividad de la serina acetiltransferasa (SAT) que cataliza la reacción a partir del aminoácido serina y de acetil-CoA (Figura 1.8). La L-serina (serina) en plantas proviene de tres rutas metabólicas: la ruta de la fotorrespiración, la ruta del Glicerato y la ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina (RFBS). El metabolismo de la serina se explicará en más detalle en el siguiente punto y veremos la importancia que tiene en el metabolismo del azufre y del nitrógeno.

Para la activación del  $\text{SO}_4^{2-}$  y su incorporación en cisteína se necesitan ATP y poder reductor (ferredoxina reducida) que provienen principalmente de la fotosíntesis, por lo que existe una clara relación entre la fase luminosa y la asimilación del azufre. Además, la serina por ser un compuesto carbonado y nitrogenado también nos indica que existe una relación con la fijación del carbono y del nitrógeno.



**Figura 1.8.** Ruta de asimilación del azufre en plantas. Abreviaturas: APK (APS quinasa), APR (APS reductasa), APS (adenosín 5'-fosfosulfato), ATPS (ATP sulfurilasa), CBL (cistationina  $\beta$ -liasa), CGS (cistationina  $\gamma$ -sintasa), Cys (cisteína), Cyst (cistationina), GGT ( $\gamma$ -glutamilttransferasa), GSH (glutación), GSXS (glutación sintetasa), GST (glutación-S-transferasa), Glu (glutamato), GS-X (glutación conjugado), Hcyst (homocisteína), Met (metionina), MS (metionina sintasa), OAS (O-acetilserina), OAS-TL (O-acetilserina tiasa), OPH (O-fosfohomoserina), PAPS (3'-fosfoadenosín 5'-fosfosulfato), R-OH (precursor hidroxilado), SAT (serina acetilttransferasa), Ser (serina), SiO (sulfito oxidasa), SiR (sulfito reductasa), SOT (sulfottransferasa), Thr (treonina), TS (treonina sintasa), X-CysGly (cisteinglicina conjugada),  $\gamma$ -EC ( $\gamma$ -glutamiltcisteína),  $\gamma$ -ECS ( $\gamma$ -glutamiltcisteína sintetasa). Figura modificada de Li et al., (2020).

### 1.1.2 Metabolismo secundario

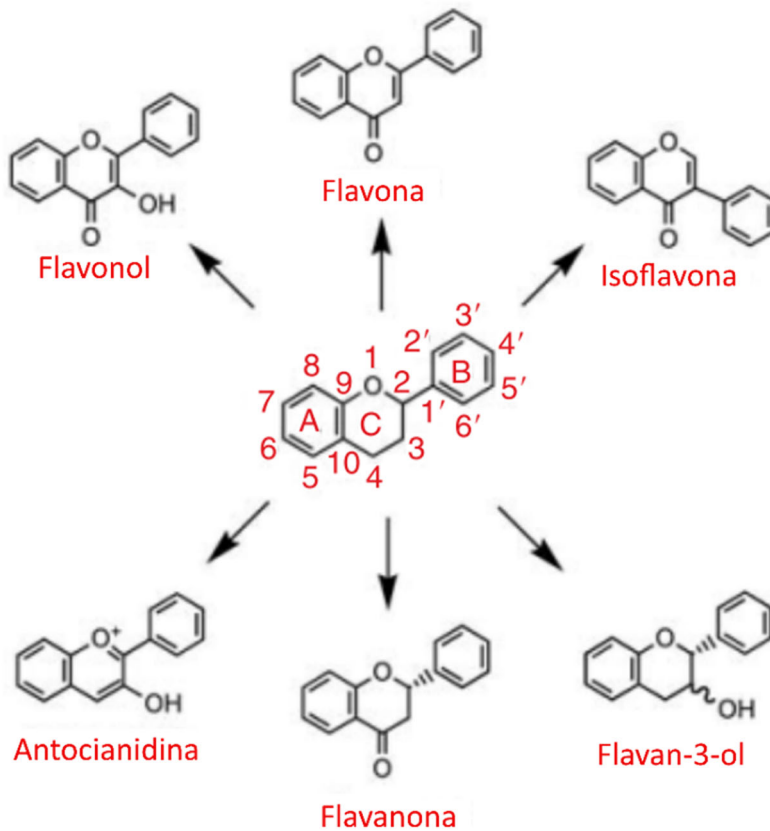
Mientras que el metabolismo primario comprende todos aquellos procesos metabólicos directamente implicados en el desarrollo y crecimiento de la planta, muchos de ellos comunes con otros grupos de seres vivos, el metabolismo secundario se refiere a todos aquellos procesos que sintetizan metabolitos no esenciales para la vida de la planta. A pesar de esto último, sí que pueden desempeñar una función muy importante, como su interacción con el ambiente que le rodea o defensa frente a patógenos o herbívoros (Fang et al., 2019; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). A los metabolitos sintetizados en el metabolismo secundario se les denomina metabolitos secundarios. Muchos de estos compuestos secundarios son usados en la industria farmacéutica o cosmética e incluso con propósitos nutritivos. Además, los metabolitos secundarios se sintetizan a partir de las moléculas producidas en el metabolismo primario, por lo que ambos metabolismos están muy estrechamente interconectados.

Basados en el origen biosintético, los metabolitos secundarios se pueden clasificar en tres grandes grupos: compuestos fenólicos, terpenos y por último alcaloides (Crozier et al., 2007).

#### **Fenoles**

Los compuestos fenólicos son moléculas que se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático. Se han descrito miles de estructuras fenólicas, hasta 8000, y están muy generalizados a lo largo del reino vegetal (Crozier et al., 2007). Estos compuestos se pueden dividir en flavonoides y no flavonoides.

Los flavonoides son moléculas polifenólicas que se componen de 15 átomos de carbono con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos (Crozier et al., 2007; Figura 1.9). Están en altas concentraciones en la epidermis de las hojas o en la piel de los frutos y tienen una gran diversidad de funciones en las plantas. Por ejemplo, están implicados en la protección frente a los rayos ultravioleta (UV), en la pigmentación de las flores, en la estimulación de los nódulos fijadores de nitrógeno o en la resistencia a enfermedades.

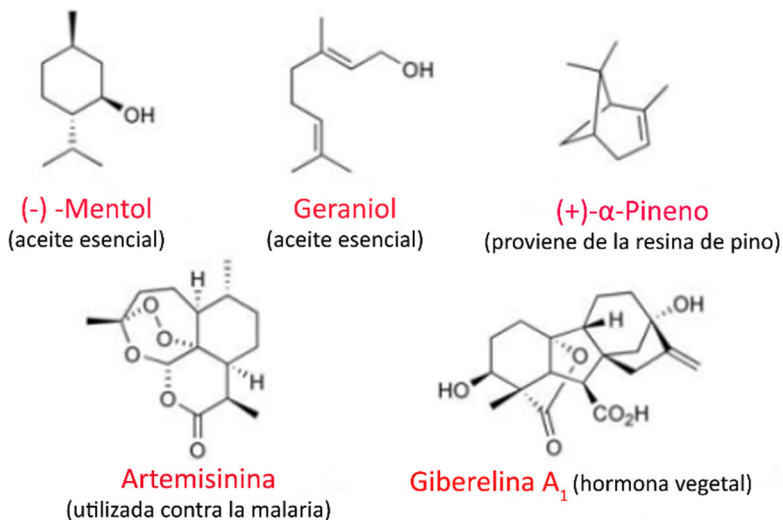


**Figura 1.9.** Representación esquemática de la estructura química de los flavonoides. En el centro de la figura se representa el esquema principal de los flavonoides y en los laterales los diferentes ejemplos de moléculas derivadas de la estructura general. Figura extraída y modificada de Crozier et al., (2007).

Los no flavonoides son moléculas fenólicas de 6 carbonos, C6-C1 o C6-C3 derivados del ácido benzoico o ácido cinámico. Dentro de los no flavonoides, unos que adquieren especial importancia, sobre todo en la industria alimentaria, son los taninos, moléculas presentes en los vinos dándoles el sabor y texturas característicos de cada bodega o marca. Otra función de los taninos ha sido para su uso en el encurtido de pieles, ya que estas moléculas son capaces de hidrolizar las proteínas de las pieles haciéndolas resistentes a la putrefacción. Además, esta clase de moléculas hace que muchas plantas sean astringentes, evitando así, su consumo por los animales herbívoros (Crozier et al., 2007).

## Terpenos

Los terpenos constituyen una clase de metabolitos secundarios muy diversos, habiéndose aislado hasta 30000 diferentes (Humphrey y Beale, 2007). Derivan del ensamblaje secuencial de unidades básicas de cinco carbonos llamadas isoprenos. Abarcan estructuras, que van desde cadenas hidrocarbonadas lineales hasta moléculas policíclicas muy complejas, y tamaños comprendidos entre el de los hemiterpenos, con cinco átomos de carbono (C<sub>5</sub>), hasta el del caucho, con miles de unidades de isopreno. En este grupo nos encontramos tanto metabolitos primarios (como algunas hormonas vegetales: las giberelinas, citoquininas, etc.) como secundarios (como por ejemplo los aceites esenciales implicados en los aromas de las plantas) (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Ejemplos de terpenos y sus estructuras químicas. Figura extraída y modificada de Humphrey y Beale (2007).

## Alcaloides

Los alcaloides se caracterizan por poseer uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un heterociclo. Los alcaloides se sintetizan a partir de aminoácidos o de sus derivados inmediatos. Están implicados en la defensa de las plantas frente a patógenos y herbívoros. Además, los alcaloides se usan en la



industria farmacéutica o incluso como narcóticos o estimulantes (como por ejemplo la morfina o la codeína; Figura 1.11). Otros ejemplos son la nicotina o la cafeína, usados en la industria tabacalera o alimentaria respectivamente, y otros son usados como sustancias psicotrópicas como son la cocaína o la heroína (Zulak et al., 2007).



**Figura 1.11.** Representación gráfica de la planta *Papaver somniferum* a la izquierda de la imagen y representación de la estructura química de la morfina (en la esquina inferior derecha de la imagen) que se obtiene de esta especie vegetal. Figura modificada de Zulak et al., (2007).

## 1.2 Metabolismo de la serina

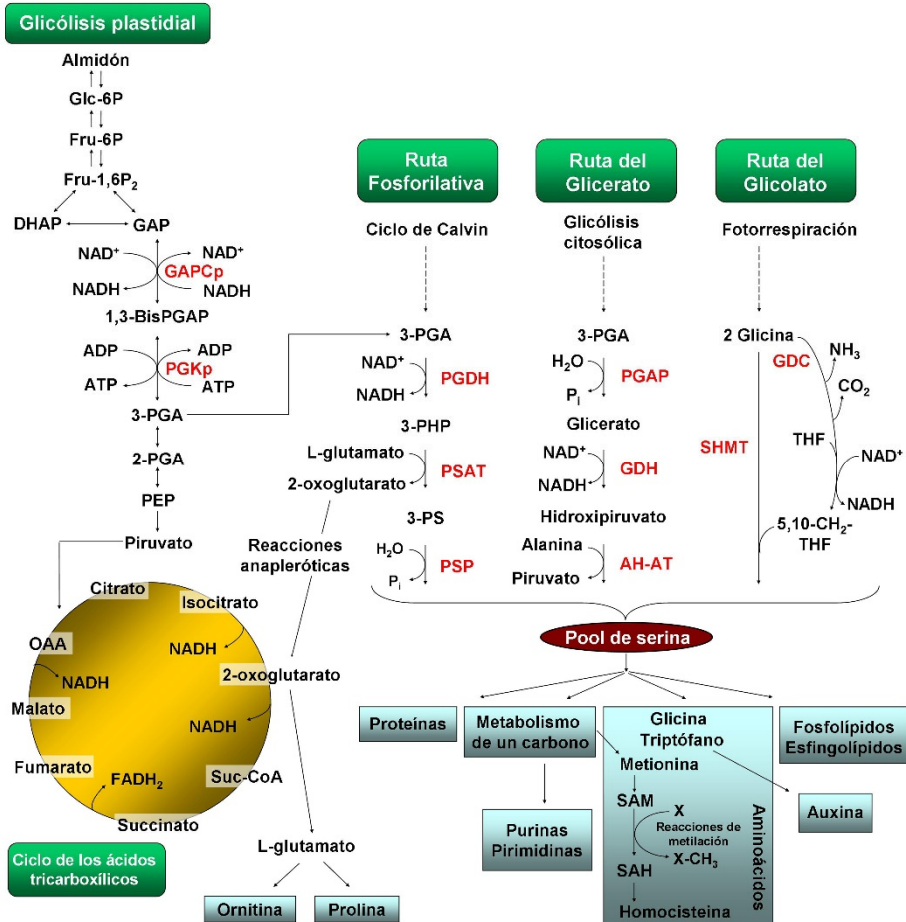
La serina es un aminoácido que forma parte de las proteínas además de participar en las funciones catalíticas de muchas enzimas. Este aminoácido también es precursor de muchas otras moléculas como los aminoácidos cisteína y metionina, esfingolípidos, fosfolípidos y bases nitrogenadas. También participa en

el metabolismo de moléculas de un carbono (Kalhan y Hanson, 2012; Ros et al., 2014).

La serina, en mamíferos, se ha relacionado con la proliferación celular, y por tanto con el cáncer, habiéndose relacionado alteraciones de la ruta de síntesis de serina con distintos tipos de cáncer (Kalhan y Hanson, 2012; Mehrmohamadi et al., 2014; Diehl et al., 2019; Reina-Campos et al., 2020). También se ha podido relacionar este aminoácido con el desarrollo del cerebro y del sistema nervioso central, en el que tiene un papel importante en la actividad neuronal, o como precursor de ciertos neuromoduladores como son la D-serina o glicina (Tabatabaie et al., 2010).

Mientras que en animales solo se ha descrito una ruta de biosíntesis de serina, en plantas, hay hasta tres rutas metabólicas que la sintetizan (Figura 1.12). Una de ellas está relacionada con la fotorrespiración, llamada ruta del Glicolato, y otras dos rutas, independientes de la fotorrespiración, llamadas ruta del Glicerato y RFBS (Ros et al., 2014). Se ha considerado que la más importante a nivel cuantitativo para aportar serina a la planta es la ruta del Glicolato (Douce et al., 2001; Bauwe et al., 2010; Maurino y Peterhansel, 2010; Ros et al., 2013). Como ya se ha comentado previamente, en esta ruta dos moléculas de glicina se convierten en una molécula de serina en una reacción catalizada por dos enzimas en la mitocondria, el complejo GDC y la enzima SHMT liberando  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{CO}_2$ , y consumiendo tetrahidrofolato como cofactor (Cascales-Miñana et al., 2013). Dado que esta ruta está asociada a la fotorrespiración, se considera que es más activa en los tejidos fotosintéticos y durante las horas de luz (Okamura y Hirai, 2017; Wulfert y Krueger, 2018). Sin embargo, se ha propuesto que las otras dos rutas podrían estar implicadas en la síntesis de serina en tejidos no fotosintéticos y en las horas de oscuridad (Benstein et al., 2013). Mientras que la ruta del Glicolato se localiza en la mitocondria, la del Glicerato se localiza en el citosol y peroxisoma, y la RFBS íntegramente en el plasto (Kleczkowski y Givan, 1988; Igamberdiev y Kleczkowski, 2018).

La ruta del Glicerato está catalizada por tres enzimas (Figura 1.12). La primera de ellas es la 3-fosfoglicerato fosfatasa (PGAP) que convierte el 3-PGA en glicerato. La segunda enzima de la ruta es la glicerato deshidrogenasa (GDH) que oxida el glicerato a hidroxipiruvato; la tercera reacción estaría catalizada por una o dos enzimas aminotransferasas llamadas alanina-hidroxipiruvato aminotransferasa



**Figura 1.12.** Representación de las tres rutas de síntesis de serina en plantas y su conexión con otras rutas metabólicas. Las enzimas que participan en la ruta fosforilativa son la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), la 3-fosfoserina aminotransferasa (PSAT) y la 3-fosfoserina fosfatasa (PSP). En la ruta del Glicerato las enzimas que participan son: la 3-fosfoglicerato fosfatasa (PGAP), la glicerato deshidrogenasa (GDH) y la alanina-hidroxipiruvato aminotransferasa (AH-AT). En la ruta del Glicolato o fotorrespiratoria participan las enzimas: la glicina descarboxilasa (GDC) y la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). En la glicólisis representada en la figura se resaltan las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPCp) y la fosfoglicerato quinasa (PGKp). Las líneas discontinuas indican varias reacciones enzimáticas. Otras abreviaturas: Glc-6P (glucosa 6-fosfato), Fru-6P (fructosa 6-P), Fru-1,6P<sub>2</sub> (fructosa 1,6 bisfosfato), DHAP (dihidroxiacetona fosfato), GAP (gliceraldehído 3-fosfato), Pi (fosfato inorgánico), 1,3-BisPGAP (1,3-bisfosfoglicerato), 3-PGA (3-fosfoglicerato), 2-PGA (2-fosfoglicerato), PEP (fosfoenolpiruvato), Suc-CoA (succinil Coenzima A), OAA (oxalacetato), 3-PHP (3-fosfohidroxipiruvato), 3-PS (3-fosfoserina), THF (tetrahidrofolato), 5,10-CH<sub>2</sub>-THF (5,10-metilen-tetrahidrofolato), SAH (S-adenosilhomocisteína), SAM (S-adenosilmetionina). Figura extraída y modificada de Ros et al., (2014).

(AH-AT) y/o glicina hidroxipiruvato aminotransferasa para finalmente formar serina (Figura 1.12). Mientras que la PGAP es una enzima citosólica, el resto actúan en el peroxisoma (Kleczkowski y Randall, 1988; Ros et al., 2014). No obstante, aunque se han aportado evidencias bioquímicas de la existencia de esta ruta en plantas, su función todavía sigue sin conocerse (Randall y Tolbert, 1971a, 1971b; Liang et al., 1984; Kleczkowski et al., 1986; Kleczkowski y Givan, 1988; Kleczkowski y Randall, 1988; Ros et al., 2014). Tampoco se ha identificado el gen que codifica la enzima clave de la ruta, la PGAP.

La otra ruta no fotorrespiratoria es la RFBS. Esta ruta presenta tres reacciones enzimáticas secuenciales reversibles, en el que se parte de 3-PGA para formar serina (Figura 1.12). La primera enzima de la ruta es la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH) que a partir de 3-PGA forma 3-fosfohidroxipiruvato utilizando  $\text{NAD}^+$  como cofactor. El segundo paso de la ruta está catalizada por la 3-fosfoserina aminotransferasa (PSAT), que mediante una reacción de transaminación transfiere el grupo amino del glutamato para formar fosfoserina y se libera 2-OG. La última reacción de la RFBS está catalizada por la enzima 3-fosfoserina fosfatasa (PSP) que convierte la 3-fosfoserina en L-serina.

Los genes que codifican para las enzimas de la RFBS de *Arabidopsis* ya han sido clonados y se ha demostrado la actividad enzimática *in vitro* de cada una de las enzimas que codifican (Saito et al., 1997; Ho et al., 1998, 1999a, 1999b; Ho y Saito, 2001). Se han identificado tres genes que codifican las tres isoformas de la enzima PGDH: *PGDH1* (At4g34200), *PGDH2* (At1g17745) y *PGDH3* (At3g19480) (Toujani et al., 2013a). En el caso de la enzima PSAT, se han identificado dos genes: *PSAT1* (At4g34630) y *PSAT2* (At2g17630) (Wulfert y Krueger, 2018). Por último, para la enzima PSP solo se ha identificado un gen llamado *PSP1* (At1g18640) (Cascales-Miñana et al., 2013).

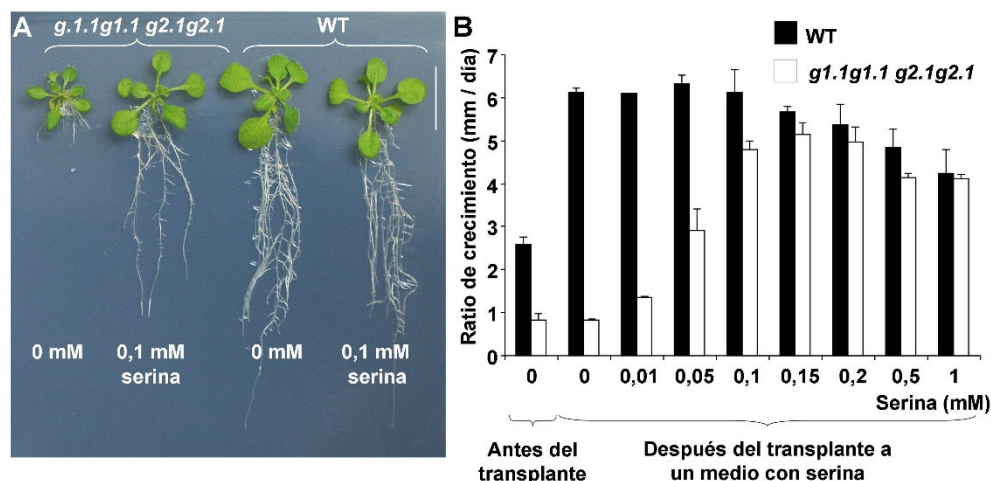
Debido a la existencia de tres rutas de síntesis de serina en plantas, se ha debatido sobre la función de cada una de ellas. Aunque a nivel cuantitativo se ha considerado la ruta del Glicolato como la más importante, al menos en tejido fotosintético (Douce et al., 2001), se ha postulado que esta ruta sólo sería activa durante las horas de luz, mientras que las otras dos rutas, serían importantes durante las horas de oscuridad tanto en tejido fotosintético como heterótrofo, al menos la RFBS, ya que los genes que codifican los enzimas de la ruta se expresan en ambos tipos de tejidos (Ros et al., 2014). Otras posibles explicaciones sobre la

presencia de distintas rutas son: i) que la serina que se produce a través de la ruta del Glicolato no es suficiente para todos los tipos celulares, ii) que algunos tipos celulares no presentan transportadores de serina para poder importarla, iii) o que estos tipos celulares no están conectados al sistema vascular de la planta. Estas hipótesis o una combinación de todas ellas podrían explicar la existencia de varias rutas de biosíntesis de serina en plantas (Ros et al., 2014).

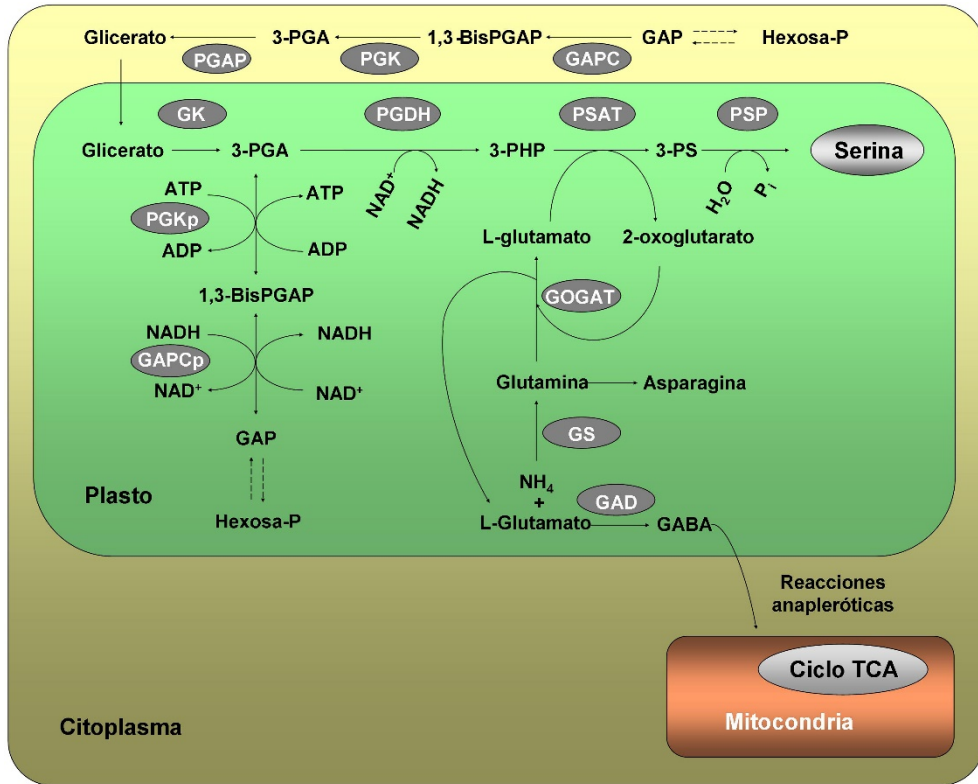
En trabajos previos de nuestro grupo se comenzó a dilucidar la posible importancia de la RFBS. Utilizando dobles mutantes homocigotos para los dos genes que codifican la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa plastidial (GAPCp), se pudo observar que presentaban un fenotipo drástico de raíces cortas y además estas líneas eran estériles siendo incapaces de desarrollar polen maduro (Muñoz-Bertomeu et al., 2009, 2010a, 2010b). Esta enzima, podría estar implicada en el desarrollo de la raíz principal, siendo importante para determinados tipos celulares del meristemo apical de la raíz (Anoman et al., 2015). Sin embargo, al añadir serina al medio, estos dobles mutantes restauraban el desarrollo normal de las raíces (Figura 1.13) (Muñoz-Bertomeu et al., 2009). Esto podría ser debido a que esta enzima aportaría el 3-PGA, precursor para la formación de serina mediante la RFBS en las raíces, donde no ocurre la fotorrespiración y por tanto no opera la ruta del Glicolato (Figura 1.14) (Muñoz-Bertomeu et al., 2009). Además, los dobles mutantes también eran capaces de recuperar el crecimiento de la raíz cuando eran complementados con una construcción génica que expresaba el gen endógeno *GAPCp1* bajo el control de un promotor específico de células heterótrofas [promotor del gen *PHT* (At5g43370) que codifica para el transportador de fosfato 1.2], ya que esta enzima es esencial para los meristemos de la raíz (Anoman et al., 2015).

Trabajos más actuales sobre la RFBS arrojan más luz acerca de la función que podría tener esta ruta en plantas (Benstein et al., 2013; Cascales-Miñana et al., 2013; Toujani et al., 2013a, 2013b; Flores-Tornero et al., 2015; Wulfert y Krueger, 2018). Estudios con mutantes silenciados o mutantes *knockout* para el gen *PGDH1*, mostraron que estas líneas presentaban un crecimiento mucho menor tanto en la parte aérea de la planta como de la raíz y además no desarrollaban ni polen ni embriones. Sin embargo, al crecer estas líneas en un medio suplementado con serina, o bien complementando las líneas mutantes *pgdh1* con el gen endógeno *PGDH1* junto con el promotor endógeno del gen, el fenotipo de crecimiento enano de la parte aérea y de la raíz se revertía (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013a).

Estos mismos fenotipos se volvieron a repetir en trabajos publicados con mutantes homocigotos condicionales para el gen *PSP1* (Cascales-Miñana et al., 2013; Flores-Tornero et al., 2015). Tanto los fenotipos de los mutantes *PGDH1* como de los mutantes del gen *PSP1* confirmaban la hipótesis lanzada en los trabajos publicados por Muñoz-Bertomeu et al., (2009). Estos resultados indicaban que la RFBS, podría tener un papel fundamental tanto en el crecimiento como en el desarrollo vegetativo de la planta y en el desarrollo del polen y del embrión. Así, la serina formada a través de la RFBS podría ser importante para determinados tipos celulares y tejidos como en las células del tapete, encargadas del desarrollo del polen, o en los meristemos de la raíz en donde se realiza la división celular. Esto tiene sentido, ya que el patrón de expresión del gen *PSP1* es muy específico en células del meristemo o células del tapete (Cascales-Miñana et al., 2013). Los fenotipos asociados a la falta de actividad de la RFBS podrían estar relacionados con la función de la serina como donadora de unidades de un carbono en procesos metabólicos de síntesis de nucleótidos y por lo tanto para la síntesis de ácidos nucleicos, en donde la demanda es alta en células en división y por lo tanto, en tejidos como los meristemos (Kalhan y Hanson, 2012; Benstein et al., 2013). No obstante, esta hipótesis todavía no ha sido confirmada.



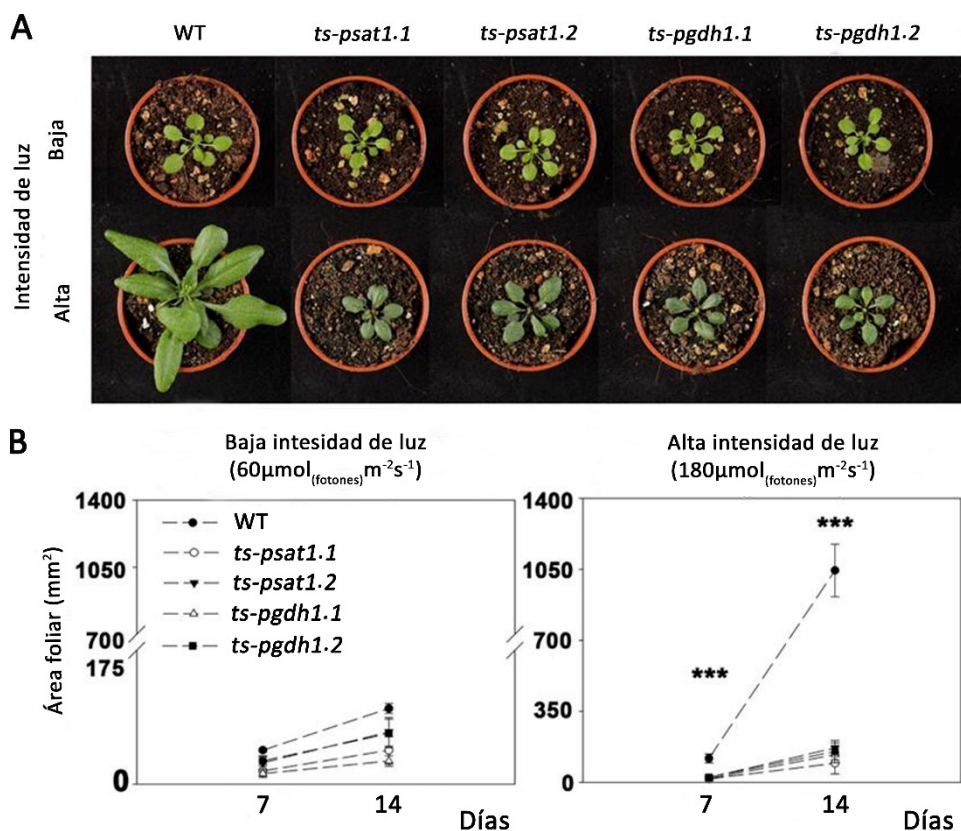
**Figura 1.13.** La serina recupera el crecimiento de la raíz en dobles mutantes de la enzima GAPCp (*g1.1g1.1 g2.1g2.1*). (A) Fotografía que muestra como una suplementación del medio de cultivo con 0,1 mM de serina permite a las raíces recuperar el crecimiento a los dobles mutantes, mientras que no afecta al crecimiento en plantas silvestres (WT). (B) Representación del ratio de crecimiento de las raíces en dobles mutantes y WT en función de la suplementación con diferentes concentraciones de serina en el medio de crecimiento. Figura extraída y modificada de Muñoz-Bertomeu et al., (2009).



**Figura 1.14.** Modelo propuesto sobre las rutas metabólicas afectadas por la enzima glicerato 3-fosfato deshidrogenasa (GAPC) plastidial (GAPCp). Mutantes *knockout* en GAPCp reducen la síntesis del 3-fosfoglicerato (3-PGA), el precursor para la síntesis de serina a través de la ruta fosforilativa de síntesis de serina (RFBS). Además, también podría estar afectando a otras rutas metabólicas como la asimilación de nitrógeno mediante la glutamina sintetasa/glutamina oxoglutarato aminotransferasa (GS/GOGAT) al requerir 2-oxoglutarato que sería suministrado por una reacción de la RFBS. Otras abreviaturas: GABA (ácido gamma aminobutírico), GAD (glutamato descarboxilasa), GAP (gliceraldehído 3-fosfato), GK (glicerato quinasa), PGAP (fosfoglicerato fosfatasa), PGDH (3-fosfoglicerato deshidrogenasa), PGK (fosfoglicerato quinasa), PGKp (PGK plastidial), Pi (fosfato inorgánico), PSAT (3-fosfoserina aminotransferasa), PSP (3-fosfoserina fosfatasa), 1,3-bisPGAP (1,3-bis-fosfoglicerato), 3-PHP (3-fosfohidroxipiruvato), 3-PS (3-fosfoserina). Figura extraída y modificada de Anoman et al., (2015).

Aunque inicialmente se asoció a la RFBS con una función durante el periodo de oscuridad aportando la serina que no se produce por la fotorrespiración, se ha visto que el crecimiento y producción de biomasa es dependiente de la RFBS también en condiciones de luz (Wulfert y Krueger, 2018). En este caso se comparó

el crecimiento de la parte aérea de líneas silenciadas para el gen *PSAT1* o *PGDH1* junto con el grupo control, a altas y bajas intensidades de luz. Se observó que, en plantas de 14 días, el crecimiento de las líneas deficientes en la RFBS fue drásticamente más bajo que la línea control a altas intensidades de luz y además estas diferencias eran mucho mayores que a bajas intensidades de luz (Figura 1.15). Además, también se observó que la expresión de los genes *PGDH1* Y *PSAT1* estaban inducidos en condiciones de alta luminosidad.



**Figura 1.15.** La ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina es esencial para el crecimiento en presencia de luz. En la parte superior (A) se muestran fotografías de plantas de líneas silenciadas para el gen *fosfoserina aminotransferasa 1* (*PSAT1*; mutantes *ts-psat1.1* y *ts-psat1.2*) y el gen *fosfoglicerato deshidrogenasa 1* (*PGDH1*; *ts-pgdh1.1* y *ts-pgdh1.2*) en comparación con el grupo control (WT) en alta o baja intensidad. En el panel inferior (B) se muestran los valores de área foliar medidos en dos tiempos diferentes (7 y 14 días) en altas y bajas intensidades de luz para los mutantes (*ts-psat1.1*, *ts-psat1.2*, *ts-pgdh1.1* y *ts-pgdh1.2*) y el WT. Imagen modificada de Wulfert y Krueger (2018).

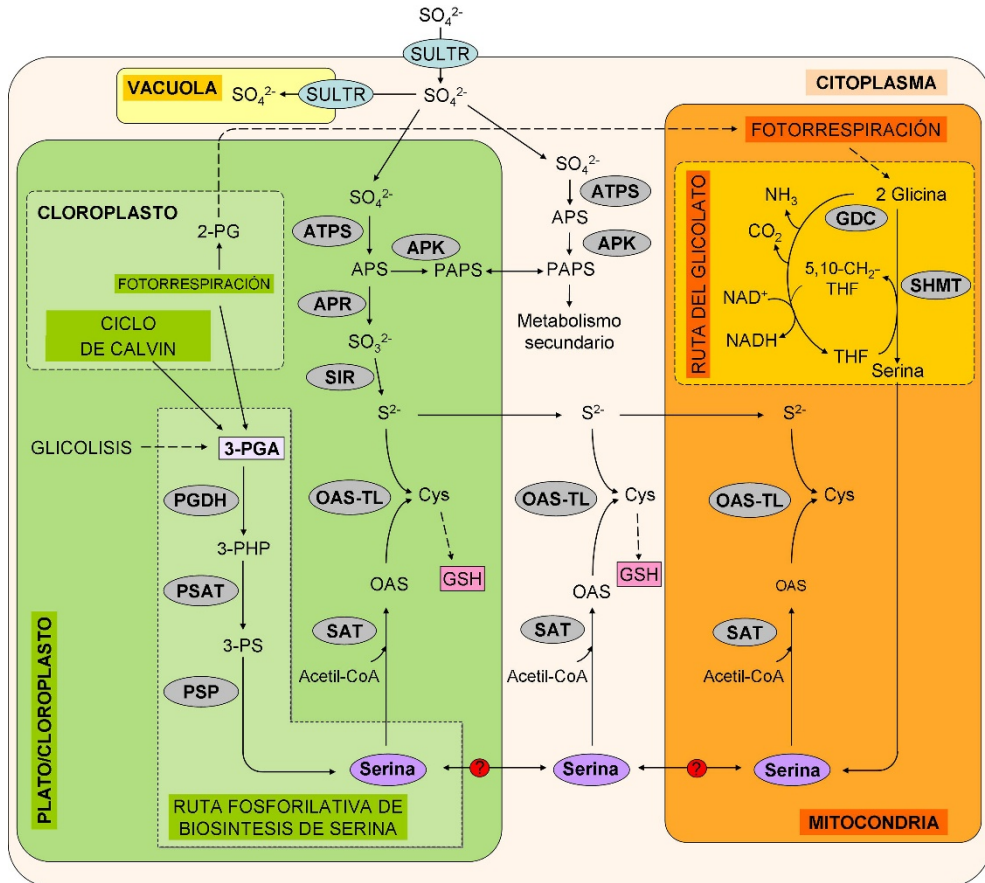


En un intento de conocer los mecanismos por los cuales la RFBS regula el crecimiento vegetal, nuestro grupo ha demostrado que esta ruta es un conector esencial del metabolismo del carbono, con el del nitrógeno y el del azufre (Anoman et al., 2019; Zimmermann et al., 2021a), necesarios para la biosíntesis proteica y por tanto para el crecimiento. En relación con el metabolismo del nitrógeno, utilizando líneas silenciadas para el gen *PGDH1* y mediante experimentos con  $^{15}\text{N}$  y  $^{14}\text{C}$  marcado, se observó una menor incorporación de estos isótopos a la síntesis de proteínas además de una menor síntesis de componentes celulares importantes en la división celular como son los fosfolípidos (implicados en la síntesis de membranas celulares) o los nucleótidos (importantes para la replicación del ADN) y por lo tanto en el crecimiento (Zimmermann et al., 2021a). Se concluyó que la RFBS estaría generando serina como precursor para la síntesis de estos compuestos.

La segunda reacción de la RFBS, catalizada por la PSAT, no solamente proporciona el sustrato para la última reacción de la RFBS, la fosfoserina, sino que también proporciona 2-OG, que es el sustrato en la ruta de asimilación del  $\text{NH}_4^+$  (ruta GS/GOGAT), que se produce también en el plasto. Nuestros estudios han revelado que los mutantes de la RFBS tienen tasas de absorción de  $\text{NH}_4^+$  muy elevadas asociadas a una alta actividad GS/GOGAT (Zimmermann et al., 2021a). Sin embargo, como ya hemos visto, esa alta actividad no está asociada a una mayor incorporación de aminoácidos a proteínas, sino a un incremento de la actividad catabólica.

Por otro lado se ha visto que la RFBS podría ser un punto de conexión con el metabolismo de asimilación de azufre en las plantas (Anoman et al., 2019). La serina es el precursor de OAS y a partir de esta se forman compuestos azufrados como la cisteína o el glutatión (Figura 1.16). En líneas mutantes de la RFBS, los genes relacionados tanto en el transporte [*SULTR2;1* o *SULTR4;2* implicados en la distribución del azufre entre órganos y tejidos (Takahashi, 2010)] como con la asimilación del azufre (APRs) estaban inducidos sugiriendo una deficiencia en azufre en estos mutantes. Sin embargo, los mutantes presentaban una mayor cantidad de OAS tanto en tejidos fotosintéticos como en raíces. Por otra parte, los mutantes presentaban alteraciones de la distribución de azufre reducido en forma de glutatión entre órganos fotosintéticos y no fotosintéticos, presentando menores niveles de cisteína y glutatión en tejidos heterotróficos específicos. Por último, en un medio de crecimiento con serina los niveles de OAS y la expresión de los genes implicados en el metabolismo del azufre en los mutantes de la RFBS recuperaban

niveles similares a los de las líneas control (Anoman et al., 2019). Estos resultados sugerían que la RFBS estaría implicada en la homeostasis del azufre entre tejidos fotosintéticos y heterotróficos en plantas.



**Figura 1.16.** Representación de la contribución de la ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina y la ruta del Glicolato al metabolismo del azufre. Enzimas implicadas en la ruta del Glicolato: Glicina descarboxilasa (GDC); Serina hidroximetil transferasa (SHMT). Enzimas implicadas en la ruta de asimilación del azufre: APS quinasa (APK), ATP sulfurilasa (ATPS), sulfito reductasa (SIR), transportador de sulfato (SULTR), O-acetilserina (OAS) tioliasa (OAS-TL), Serina acetiltransferasa (SAT), adenosín 5'fosfosulfato reductasa (APR). Enzimas implicadas en la ruta fosforilativa de síntesis de serina: 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), fosfoserina aminotransferasa (PSAT), fosfoserina fosfatasa (PSP). Otras abreviaturas: 2-fosfoglicolato (2-PG), 3-fosfoglicerato (3-PGA), 3-fosfohidroxipiruvato (3-PHP), 3-fosfoserina (3-PS), 5,10- metilen-tetrahidrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>-THF), adenosín 5-fosfosulfato (APS), Cisteína (Cys), Glutatión (GSH), 3'- fosfoadenosín 5'-fosfosulfato (PAPS), tetrahidrofolato (THF). Imagen modificada de Anoman et al., (2019).

En relación con el metabolismo del azufre el metabolismo de la serina también afecta a la síntesis de metabolitos secundarios como los glucosinolatos que derivan de la asimilación del  $\text{SO}_4^{2-}$ . Se ha demostrado que existe una disminución en el contenido de glucosinolatos en líneas silenciadas del gen *PGDH1* (Benstein et al., 2013; Zimmermann et al., 2021b). Por otro lado, se ha observado en mutantes silenciados del gen *PGDH1* que los factores de transcripción MYB34 y MYB51, que regulan la síntesis de glucosinolatos, también regulan la expresión de los genes implicados en la RFBS (Benstein et al., 2013). Además los genes implicados en la síntesis de glucosinolatos presentan menor expresión en mutantes condicionales del gen *PSP1* (Anoman et al., 2019).

Otra de las funciones de la RFBS podría estar relacionada con la respuesta de la planta frente al estrés abiótico, como son la presencia de alta salinidad en el suelo o las altas temperaturas. Se ha demostrado que la serina está involucrada en la tolerancia a varios estreses ambientales (Ho y Saito, 2001). En estudios recientes se ha visto que la actividad de la enzima PGDH se incrementa bajo condiciones de estrés salino en la remolacha azucarera (Kito et al., 2017). Otros trabajos también han asociado la sobreexpresión del gen *PGDH1* con una mayor tolerancia al estrés salino (Rosa-Téllez et al., 2020). En este último trabajo los autores observaron que las plantas que sobreexpresaban el gen *PGDH1* (Oex *PGDH1*) eran más tolerantes al estrés salino, mientras que las líneas que sobreexpresaban el gen *PGDH3* (Oex *PGDH3*) eran más sensibles a estas condiciones. Además, se observaron cambios metabólicos en ambas líneas, por ejemplo las Oex *PGDH3* presentaban mayor cantidad de marcadores de estrés como son la prolina y la rafinosa. Estos resultados podrían indicar el diferente papel de cada uno de los genes de la familia *PGDH* en la respuesta al estrés producido por la salinidad.

En resumen, la RFBS es una ruta clave en la síntesis de serina para el crecimiento y el desarrollo de la planta. Su función podría estar relacionada con el papel que desempeñaría como conector entre el metabolismo del carbono con el metabolismo del nitrógeno y del azufre.

Al contrario de lo visto con los genes *PGDH1* o *PSP1*, estudios con mutantes para los genes *PGDH2* o *PGDH3* no mostraron fenotipos drásticos de crecimiento. Además, estas líneas mutantes sí que eran fértiles al contrario que lo que pasaba con los mutantes para los genes *PGDH1* y *PSP1* (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013a). El estudio de los patrones de expresión de los genes *PGDH* mostró que

mientras que los genes *PGDH1* y *PGDH2* se expresan tanto en la parte aérea de la planta como en raíces (aunque mayoritariamente en raíces), la expresión del gen *PGDH3* solo se da en la parte aérea (Toujani et al., 2013a). Ensayos histoquímicos también mostraron un patrón de expresión específico para cada gen. *PGDH2* se expresa en los meristemos de las plántulas, pero no en los de la planta adulta, y en flores se expresa en el estigma y en las anteras. En el caso del *PGDH1*, se expresa principalmente en el ápice vegetativo, en la zona distal de los cotiledones y hojas, y por último en las anteras, el estigma y los granos de polen. En raíces, *PGDH1* se expresa en la vasculatura y en el meristemo. Por último, *PGDH3* se expresa en la parte aérea tanto de plántulas como de plantas adultas, también en el estigma y en las anteras de las flores, pero no se expresa en raíces (Toujani et al., 2013a). Sin embargo, hasta la realización de esta tesis no se conocía la función de los genes *PGDH2* y *PGDH3* en *Arabidopsis*.

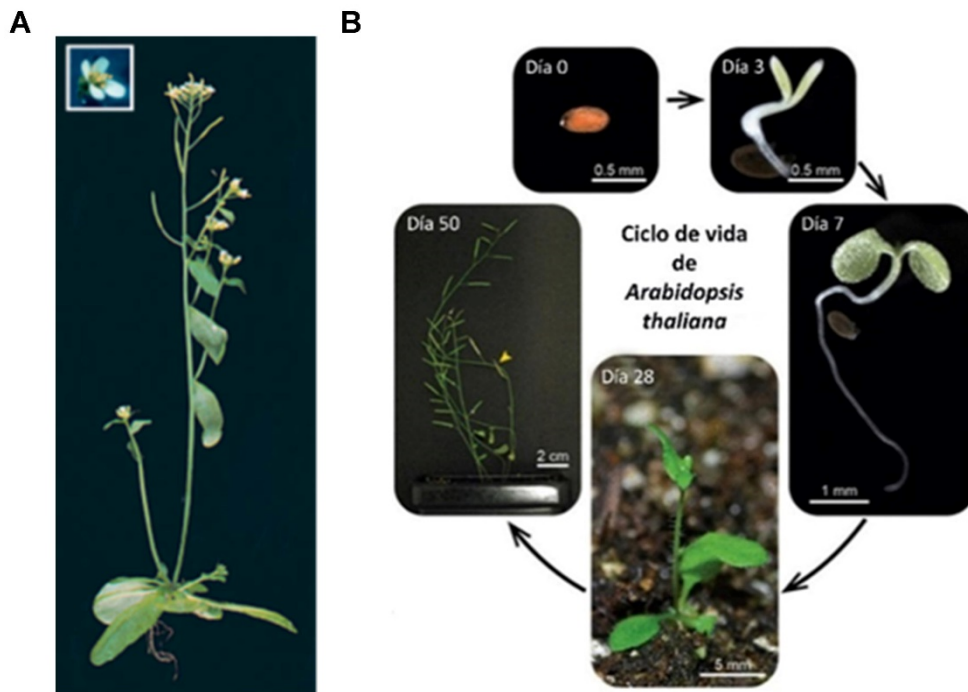
### 1.3 *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*

El uso de organismos modelo para el estudio básico o aplicado es de suma importancia en la investigación en biotecnología vegetal, al igual que otros campos de la biología. Para que un organismo pueda ser utilizado como modelo debe de tener una serie de características como, por ejemplo, que presente un ciclo de vida corto, sea de pequeño tamaño, de fácil manipulación y fáciles de mantener en condiciones de cultivo o cría en el laboratorio. En el caso de las plantas, el organismo modelo más estudiado es *Arabidopsis*, que es una planta angiosperma dicotiledónea que pertenece a la familia de las brasicáceas o crucíferas. Presenta una amplia distribución en Europa, Asia y América del norte. El ciclo de vida completo de la planta desde su germinación hasta la maduración y la formación de las primeras semillas es de alrededor de 6 semanas, siendo su metabolismo de tipo C<sub>3</sub>. Las flores tienen aproximadamente 2 mm de longitud y son capaces de autopolinizarse. Las semillas presentan un tamaño alrededor de 0,5 mm y se forman en unos frutos delgados conocidos como silicuas. Las plántulas se desarrollan en forma de roseta de entre 2 y 10 cm de diámetro. Las plantas maduras, pueden tener un tamaño de unos 20 o 30 cm de alto (y en algunos casos más de 50 cm) y a menudo producen centenares de silicuas con hasta 5000 semillas por planta (Meinke et al., 1998) (Figura 1.17).

Se han recogido diferentes ecotipos de esta planta a partir de las poblaciones naturales. Entre los ecotipos más utilizados para análisis experimentales y moleculares están el ecotipo Columbia y el Landsberg (Meinke et al., 1998). Gracias al pequeño tamaño de las semillas y a la versatilidad de la plántula a la hora de ser cultivada *in vitro*, las semillas de *Arabidopsis* pueden ser sembradas en placas Petri y ser cultivadas en cámaras de crecimiento en el laboratorio o bajo condiciones de invernadero (Meinke et al., 1998; Woodward y Bartel, 2018).

Un punto a favor para estudiar una planta modelo es que su genoma esté secuenciado, ya que facilitará enormemente los estudios genéticos. En el caso de *Arabidopsis* se secuenció su genoma completo en el año 2000 siendo la primera planta superior con su genoma completamente secuenciado. El genoma de *Arabidopsis* es pequeño, en comparación con otras especies de plantas, y se encuentra organizado en 5 cromosomas con un tamaño aproximado de 125 megabases que contienen más de 25000 genes que codifican proteínas (Meinke et al., 1998; Serino y Gusmaroli, 2011; Woodward y Bartel, 2018). Por otro lado, la facilidad de manipulación, transformación y de mutagénesis a través de mutágenos químicos, físicos o biológicos, o a través de herramientas moleculares (como la reciente técnica CRISPR-CAS9) permite obtener una amplia colección de mutantes que pueden ser depositados en colecciones. En el caso de esta especie se pueden solicitar mutantes a través de algunos centros especializados, dos de los más importantes son: *the Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC: <http://www.biosci.ohio-state.edu>) en los Estados Unidos, y *the Nottingham Arabidopsis Stock Center* [NASC (Scholl et al., 2000): <http://Arabidopsis.info/>] que se encuentra en el Reino Unido. Además, existe una base de datos donde se encuentra almacenada toda la información sobre los estudios realizados en los genes de *Arabidopsis*, su genoma, secuencias de genes, etc. conocida como *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR: <https://www.arabidopsis.org/>) (Serino y Gusmaroli, 2011).

Todas estas características, incluyendo su pequeño tamaño, su fácil manejo y cultivo en el laboratorio, así como un tamaño pequeño del genoma y alto grado de tolerancia a la homocigosidad, permiten que *Arabidopsis* sea una especie con múltiples beneficios para ser usada como planta modelo en los estudios en el campo de la biología vegetal.

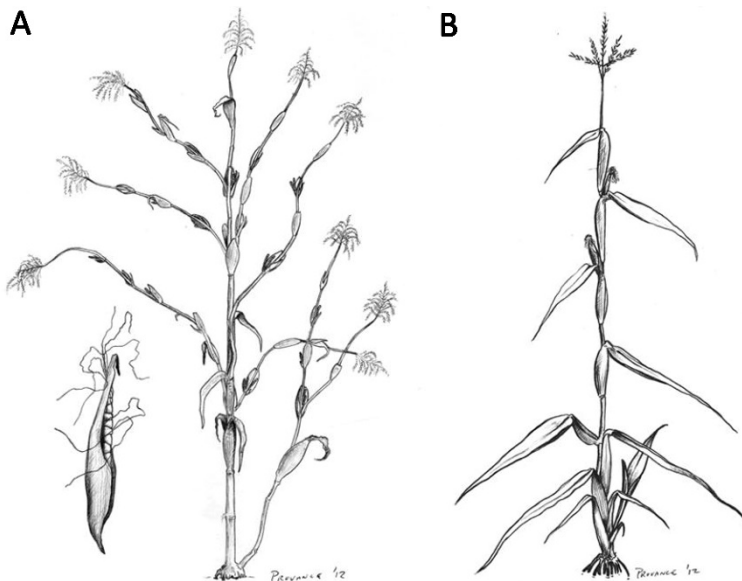


**Figura 1.17.** Morfología (A) y ciclo vital (B) de *Arabidopsis thaliana*. Imágenes tomadas y/o modificadas de Serino y Gusmaroli (2011) y Woodward y Bartel (2018).

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la síntesis de serina en plantas se da a través de tres rutas, una de ellas relacionada con la fotorrespiración (la ruta del Glicolato) (Ros et al., 2014). Debido a que *Arabidopsis* presenta un metabolismo  $C_3$ , también es importante estudiar el papel de la RFBS en plantas que presentan una tasa fotorrespiratoria mucho menor, como son las plantas  $C_4$ . Es por ello que también se haya utilizado en esta tesis doctoral al maíz, una especie monocotiledónea de la familia de las poáceas (gramíneas) con metabolismo  $C_4$  y con una gran importancia agroeconómica.

La planta del maíz es una planta domesticada por el ser humano, teniendo constancia de su uso hace 10000 años en la región del actual México (Ranum et al., 2014). Mediante estudios moleculares y evolutivos se pudo determinar que el ancestro de la planta del maíz proviene específicamente de la especie *Z. mays*

subsp. *parviglumis*, una especie de planta que se engloba dentro de un grupo de 5 especies de plantas del género *Zea* y que se conocen vulgarmente como teosinte (Stitzer y Ross-Ibarra, 2018). En la actualidad el maíz y el teosinte son plantas morfológicamente muy diferentes. Mediante un proceso de selección llevado a cabo por el hombre ha llegado hasta nuestros días la planta de maíz que actualmente conocemos. Mientras que la planta teosinte tiene múltiples ramas, cada una con múltiples mazorcas pequeñas a lo largo de la longitud de la rama y con un penacho (la flor masculina) en la punta de cada rama, la planta del maíz presenta un solo tallo y el penacho de la flor masculina en la punta. Por otro lado, la planta de teosinte es capaz de producir cientos de mazorcas pequeñas con unos 10 granos por mazorca y englobados por una cascara dura (gluma), mientras que la planta de maíz produce unas pocas mazorcas con muchos granos sin estar encerrados dentro de esa cáscara, lo que permite que los granos sean mucho más fáciles de cosechar y comer (Figura 1.18) (Yang et al., 2019).



**Figura 1.18.** Representación gráfica de la planta teosinte (A) y de una planta de maíz cultivada (B) junto con el fruto. Figura extraída de Stitzer y Ross-Ibarra (2018).

El genoma del maíz es grande, en comparación con el genoma que encontramos en *Arabidopsis*, con un tamaño de aproximadamente 2,5 gigabases y aproximadamente 40000 genes anotados, y además, presenta una gran cantidad de transposones (Nannas y Dawe, 2015). Los retrotransposones son los

transposones más comunes, aunque también se han descrito elementos de ADN móviles llamados helitrones que causan el movimiento de grandes fragmentos de ADN dentro del propio genoma. Además, se han dado eventos de poliploidía, en concreto tetraploidía, en el genoma de la planta del maíz, dando como resultado largas regiones tetraploides (Nannas y Dawe, 2015). Al igual que pasaba con *Arabidopsis*, toda la información sobre el genoma, colección de mutantes, mapas genéticos, y secuencias de genes se pueden encontrar en una página web (<http://www.maizegdb.org>).

El maíz, para el ser humano, tiene mucha importancia, ya que su consumo como fuente de alimento por persona y por día a nivel mundial está entre los 50-300 gramos. El cultivo de maíz se da en todo el mundo, aunque los mayores productores a nivel mundial son Estados Unidos, China y Brasil (Ranum et al., 2014). Según la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO) se estima que en el año 2012 se produjeron más de 850 millones de toneladas, siendo junto con el trigo y el arroz, uno de los cereales más importantes del mundo a nivel económico y en la alimentación. El maíz es usado tanto para la alimentación humana como animal. Además, en los últimos años se ha utilizado para la producción de biocarburantes para la industria de la automoción.

Esta importancia a nivel económico hace de la planta del maíz uno de los candidatos principales para su estudio a nivel biológico y biotecnológico. Así, por ejemplo, tenemos el caso del maíz BT, maíz transgénico más resistente a plagas, al que se le ha introducido un gen que codifica una toxina de la especie bacteriana *Bacillus thuringiensis*, que provoca la muerte de las larvas de los insectos al ingerir trozos de la hoja de la planta que codifica esta toxina haciéndolo más resistentes a las plagas (Shehryar et al., 2019).

Por todos estos motivos se ha incluido a la planta de maíz entre las especies de estudio de la presente tesis.

## 1.4 Interés biotecnológico en el metabolismo de plantas

Hemos visto en los capítulos anteriores como el metabolismo de las plantas es muy diverso, desde la fijación del carbono, el nitrógeno y el azufre inorgánico, hasta la síntesis de gran variedad de metabolitos secundarios. Además, las plantas son capaces de modular su propio metabolismo en función de las condiciones



ambientales o de la propia salud y edad de la planta. Así, por ejemplo, la planta de tabaco es capaz de aumentar su contenido de nicotina cuando es atacada por algún insecto o herbívoro como mecanismo de defensa. Otro ejemplo similar es el caso del tomate, que es capaz de producir y aumentar su contenido de triptófano como precursor para la síntesis de metabolitos de defensa frente a algún ataque por herbívoros o insectos (Judge y Dodd, 2020). Debido a esta gran diversidad metabólica que se ha descrito en las plantas, estas son las dianas perfectas para su uso en biotecnología metabólica o ingeniería metabólica.

Cuando queremos modificar el metabolismo de una planta para un fin concreto, estamos hablando de ingeniería metabólica. La ingeniería metabólica puede o bien mejorar y modificar el metabolismo endógeno o por el contrario introducir nuevas capacidades metabólicas para incrementar los niveles de determinados productos o para disminuir o eliminar aquellos que pueden ser perjudiciales (Farré et al., 2014). Existen diversas estrategias para modificar una ruta metabólica y poder obtener o bien el metabolito que es de nuestro interés o bien sus precursores. Se puede introducir el gen de interés en la planta que queramos modificar o bien realizar una estrategia multigénica transformando la planta con diversos genes. Hay diferentes estrategias descritas en Zorrilla-López et al., (2013):

- A) Mejorar la actividad de las reacciones que pueden limitar la velocidad de una ruta por sobreexpresión de una o varias enzimas (Figura 1.19). Como por ejemplo el incremento de la actividad de la enzima fitoeno sintasa en el tomate a partir de la introducción de un gen que codifica la misma enzima procedente de la bacteria *Erwinia uredovora* para la síntesis de carotenoides (Fraser et al., 2002).
- B) Sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis de precursores para aumentar los niveles de estos y mejorar el flujo hacia la ruta metabólica que se desee manipular (Figura 1.19). Por ejemplo, se modificaron las rutas del ácido mevalónico y del metileritritol-4-fosfato en tomate introduciendo el gen de la 3-hidroximetilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis* consiguiendo un aumento de fitoesteroides o bien transformando plantas de tomate con el gen de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa consiguiendo un aumento en el contenido de carotenoides en este caso (Enfissi et al., 2005).

- C) Modificar los flujos de la ruta bloqueando la expresión de determinados genes mediante ARN de interferencia (Figura 1.19). Como es el caso del silenciamiento de los genes *CHY1* y *CHY2* en la patata (*Solanum tuberosum* L.) que codifican beta-caroteno hidroxilasas, aumentando el contenido de carotenoides (Diretto et al., 2007).
- D) Por último, también se puede promover el desarrollo de compartimentos para el almacenaje de los metabolitos de interés (Figura 1.19). Por ejemplo, se conoce que el gen *Or* en la coliflor (*Brassica oleracea* L.) promueve el desarrollo de cromoplastos encargados de almacenar carotenoides (Lu et al., 2006).

1. Incremento de la actividad enzimática



2. Sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis de precursores



3. Silenciamiento o represión génica



4. Desarrollo de reservorios de metabolitos



**Figura 1.19.** Diferentes estrategias de modificación de las rutas metabólicas por ingeniería metabólica: 1) Modificación de la actividad enzimática. 2) Sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis de precursores. 3) Silenciamiento génico por ARN de interferencia o antisentido. 4) Promoción de la síntesis de compartimentos para metabolitos específicos. Figura modificada de Zorrilla-López et al., (2013).

Mediante el uso de algunas de estas estrategias existen claros ejemplos de biotecnología en plantas para la mejora de sus propiedades nutricionales. El ejemplo más conocido y que más debate ha generado es el conocido caso del arroz dorado, una variedad de arroz al que se le han introducido los genes que participan en la ruta de síntesis del  $\beta$ -caroteno (provitamina A). El  $\beta$ -caroteno es una molécula importante en la dieta del ser humano ya que es el precursor de la vitamina A. Dado que la deficiencia en la dieta de vitamina A puede ocasionar enfermedades como ceguera y el incremento de enfermedades infecciosas, sobre todo en poblaciones como la asiática donde la dieta básica es el arroz, se vio como una posible solución a estas carencias nutritivas, la producción de un tipo de arroz que contuviera  $\beta$ -caroteno en el grano. Esta variedad de arroz, conocida como arroz dorado por el color del grano más amarillento, fue modificada genéticamente para que produjera  $\beta$ -caroteno en la parte comestible del arroz. Se modificó genéticamente introduciéndole los genes que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de esta molécula, las enzimas fitoeno sintasa y licopeno  $\beta$ -ciclase (a partir de los genes del narciso [*Narcissus pseudonarcissus*]) y la enzima fitoeno desaturasa (a partir del gen de la bacteria *Erwinia uredovora*). Estos genes se introdujeron en el arroz bajo el control de un promotor de expresión específico para el endospermo del grano de arroz. De esta manera se consiguió la producción de  $\beta$ -caroteno en el grano de arroz (Ye y Beyer, 2000). Sin embargo, esta primera versión de arroz dorado generaba solo 1,6  $\mu\text{g/g}$  de arroz, por lo que se generó una segunda versión que podía producir hasta 23 veces más (37  $\mu\text{g/g}$  de arroz) (Paine et al., 2005).

Otros trabajos consiguieron aumentar los niveles de antocianinas en el tomate (Butelli et al., 2008). Las antocianinas son pigmentos vegetales de tipo flavonoide que dan coloración (rojo, púrpura, azul) a flores y frutos, y cuya función es atraer a los animales para que los consuman y faciliten la dispersión de las semillas. Se ha visto que ofrecen protección contra algunas enfermedades como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. El fruto de la planta del tomate no contiene prácticamente niveles de estos compuestos, por lo que, debido a la importancia del tomate en la dieta, se seleccionó como un buen candidato para la mejora genética en la síntesis de antocianinas. Mediante ingeniería genética introdujeron los genes *Del* y *Ros1* de la planta *Antirrhinum majus* L., que codifican factores de transcripción implicados en la síntesis de antocianinas en las flores de esta planta, bajo el control de un promotor específico del fruto del tomate. De esta manera consiguieron aumentar los niveles significativamente de antocianinas en el tomate (Butelli et al., 2008).

Sin embargo, en otros estudios que intentaron modificar genéticamente una planta de interés para obtener una mayor cantidad de un metabolito en concreto, se ha conseguido el efecto contrario, la acumulación de metabolitos no deseados. Un ejemplo de lo comentado anteriormente sería el trabajo presentado por Lücker et al., (2001), donde se le introdujo el gen que codifica la enzima S-linalol sintasa, para la síntesis de linalol (un compuesto monoterpene volátil responsable de atraer a insectos polinizadores) en la especie vegetal *Petunia hybrida*. En este caso, los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que se obtuvo mayores concentraciones de un compuesto intermedio no volátil. Estos resultados nos indican el complejo mecanismo de control que existe en el metabolismo en plantas y la necesidad de un mayor conocimiento y mayor información en todos los procesos que regulan el metabolismo.

Debido a la gran complejidad que ofrece el metabolismo vegetal, es necesario una integración de diversas áreas de conocimiento como son la genética, la bioquímica, la biología molecular o la fisiología vegetal. Mediante una estrategia de combinación y fusión de diferentes campos de conocimiento se abre un abanico de posibilidades y retos importantes, como es el obtener el conocimiento necesario y más amplio sobre las vías metabólicas para comprender en mayor profundidad todos los procesos que se desarrollan en el metabolismo vegetal, identificar los genes que están implicados y expresar los genes heterólogos que sean de interés en el organismo huésped sin que se dañe o modifique drásticamente la planta de estudio (Farré et al., 2014).

## 2. OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

---

Esta tesis doctoral se encuadra en un proyecto que tiene como objetivo profundizar en la caracterización de los genes de la RFBS mediante una estrategia por pérdida y ganancia de función, y en concreto, conocer la función de los genes *PGDH2* y *PGDH3* y ampliar en el conocimiento de los genes de la familia *PGDH*.

Por otro lado, en esta tesis, se pretende comprender la interacción de la RFBS con la ruta del Glicolato, tanto en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental como en condiciones de alto CO<sub>2</sub> que simularían el cambio climático, ya que la funcionalidad de esta última ruta depende de la concentración de CO<sub>2</sub> en el ambiente. Por último, uno de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar cual es la función de la RFBS en plantas con un metabolismo C<sub>4</sub> que presentan baja tasa de fotorrespiración. Los objetivos concretos de la tesis son los siguientes:

1. Profundizar en la caracterización de los genes *PGDH2* y *PGDH3*, dos de los genes de la familia *PGDH*, ya que su función es desconocida, mediante la obtención de una combinación de dobles mutantes de los tres genes *PGDH* y la obtención del mutante triple.
2. Estudiar la función de la RFBS en el metabolismo del nitrógeno y del carbono en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental y de elevada concentración de CO<sub>2</sub> mediante una estrategia de ganancia de función. Para ello se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* triple sobreexpresoras de los tres genes principales de esta ruta.
3. Estudio de la RFBS en plantas con baja tasa de fotorrespiración, usando como planta modelo el maíz, una planta con metabolismo C<sub>4</sub>. Para ello se han obtenido plantas de maíz sobreexpresoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis*.





## 3. MATERIALES Y MÉTODOS



## 3.1 Material biológico de estudio

Las especies vegetales utilizadas durante la realización de esta tesis doctoral fueron *Arabidopsis* y maíz. Las especies bacterianas utilizadas para obtener las diferentes construcciones con las que transformar posteriormente plantas de *Arabidopsis* fueron *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.

### 3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Respecto a *Arabidopsis* se utilizó el ecotipo Columbia (N-1092) obtenido del NASC (Scholl et al., 2000). Este ecotipo fue empleado como fondo genético para la obtención de diferentes líneas transgénicas y como control silvestre (WT, wild type de sus siglas en inglés). Además de las nuevas líneas generadas en esta tesis también se utilizaron líneas mutantes condicionales del gen *PSP1* (*c-psp1*) obtenidas a partir del fondo genético *psp1.1* (SALK\_062391), mutantes simples del gen *PGDH1* (*pgdh1-2*; GK\_155B09), del gen *PGDH2* (*pgdh2-2* y *pgdh2-3* con referencias SALK\_149747 y SALK\_048256, respectivamente) y del gen *PGDH3* (*pgdh3-1* y *pgdh3-2* con referencias SM\_337584 y GK\_877F12, respectivamente) o líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* ya obtenidas o aisladas previamente por nuestro grupo (Cascales-Miñana et al., 2013; Toujani et al., 2013a; Ros et al., 2014).

A partir de algunas de las líneas indicadas anteriormente se obtuvieron en esta tesis doctoral líneas mutantes condicionales para el gen *PGDH1* (*c-pgdh1-2*; ver Apartado 3.8.4), así como, una combinación de dobles y triples mutantes de los genes *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *pgdh2-3 pgdh3-1*, *pgdh2-2 pgdh3-2* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*; ver Apartado 3.8.5). También se generaron líneas transgénicas triple sobreexpresoras de los genes *PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1* implicados en la RFBS (*Pro35S:PGDH1-GFP/Pro35S:PSAT1-GFP/Pro35S:PSP1-GFP* que en esta tesis los nombraremos como TriOex; Apartado 3.8.6).

### 3.1.2 *Zea mays*

Durante la realización de esta tesis se empleó la variedad B104 de maíz como control y para generar líneas transgénicas, que fueron obtenidas tal y como se indica en los Apartados 3.7.5 y 3.8.7.

### 3.1.3 *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas durante esta tesis doctoral fueron la DH5 $\alpha$  y DH10B. La cepa DH5 $\alpha$  fue ampliamente utilizada en las transformaciones por choque térmico, para la replicación y manipulación de plásmidos recombinantes, mientras que la cepa DH10B fue la cepa administrada por el TAIR que contenía el BAC F8D20 que se utilizó para la obtención de la construcción del gen *PSA71* (Apartado 3.7.3).

El genotipo de DH5 $\alpha$  es F-  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r $_{k}^{-}$ , m $_{k}^{+}$ ) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda^{-}$ .

El genotipo de DH10B es F $^{-}$  *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 *recA1 endA1 ara D139*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK*  $\lambda^{-}$  *rpsL nupG*

### 3.1.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de plantas se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 pSOUP. Esta cepa posee resistencia a los antibióticos gentamicina, rifampicina y tetraciclina. Estas resistencias son debidas a que la cepa GV3101 contiene el plásmido pMP90, que posee genes de resistencia a gentamicina y rifampicina (Furini et al., 1997; Koncz y Schell, 1986; Mullins et al., 2001), junto al vector binario pSOUP, que contiene un gen de resistencia al antibiótico tetraciclina (Hellens et al., 2000).

## 3.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

### 3.2.1 *Arabidopsis thaliana*

#### 3.2.1.1 Esterilización de semillas

Las semillas a esterilizar se colocaron en un tubo de 1,5 mL y se realizaron dos lavados sucesivos de 15 minutos cada uno, en agitación continua, con 1 mL de una solución de etanol 70% y SDS al 0,05% (Dodecil Sulfato Sódico, SIGMA, Ref. 1667289). Una vez realizados estos dos lavados, la solución final se eliminó y se sustituyó por 1 mL de una solución de etanol 70%, manteniendo de nuevo a las semillas en agitación durante 5 minutos. Una vez transcurridos estos 5 minutos, las semillas se depositaron y se dejaron secar en papel de filtro estéril dentro de una cabina de flujo laminar horizontal en condiciones de esterilidad.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez secas se procedió a sembrar las semillas en el medio de cultivo adecuado o se guardaron a 4°C hasta su uso en un tubo estéril de 1,5 mL.

#### 3.2.1.2 Cultivo *in vitro*

Para el cultivo *in vitro* rutinario de *Arabidopsis* se utilizaron placas redondas de 9 cm de diámetro o placas cuadradas de 12 cm de lado, que contenían un medio de cultivo compuesto por 0,9 g/L de un preparado de DUCHEFA BIOCHEMIE (Ref. P03769-05) compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y vitaminas Gamborg (Gamborg et al., 1968), 0,9 g/L de MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico, SIGMA, Ref. 32K5465), 8 g/L de agar (PRONADISA, Ref. SB090321), y el pH ajustado a 5,7 [ajustado con Tris (tris(hidroximetil)aminometano; SIGMA, Ref. T6066) o KOH]. Este medio fue designado como MS1/5.

Cuando fue necesario seleccionar plantas transgénicas las semillas fueron sembradas en un medio similar al anterior excepto por contener una mayor cantidad del preparado de sales MS con vitaminas Gamborg (2,25 g/L) y que suplementamos con 0,5% (p/v) de sacarosa (este medio fue designado como MS1/2). A este medio se le adicionó el antibiótico o herbicida correspondiente en función del agente de selección de la línea transgénica a analizar. Las concentraciones finales de los antibióticos utilizados se especifican en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Concentración de los antibióticos o herbicidas empleados en el cultivo *in vitro* de *Arabidopsis*.

Antibiótico	Concentración final (µg/mL)
Higromicina	25
Kanamicina	50
Fosfotricina-BASTA	25

Para determinados experimentos de caracterización fenotípica y metabolómica *in vitro* se realizaron modificaciones del medio MS1/5 mediante la adición de 0,5% (p/v) de sacarosa o de 0,1 mM del aminoácido serina.

La esterilización de los medios de cultivo *in vitro* para *Arabidopsis* se llevó a cabo en un autoclave (20 min a 120°C, 105 Pa). Las sustancias termolábiles como los antibióticos y los aminoácidos se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,20 µm (Whatman, Ref. FP30/0.2 CA-S) y se añadieron al medio esterilizado enfriado a unos 40-50°C. Se vertió 25 mL de medio en las placas redondas y 75 mL de medio en las placas cuadradas.

Una vez realizada la siembra en condiciones de esterilidad, las placas se sellaron con cinta porosa *Micropore Hypoallergenic* (3M MICROPORE TM, Ref. 1530-0 para las placas redondas y Ref. 1530-1 para las placas cuadradas), que permite el intercambio de gases, pero mantiene la humedad en el interior de las placas. Antes de ser transferidas a cámaras de crecimiento (Sanyo-MLR-351H o IBERCEX H-900) para la germinación, las semillas sembradas en las placas se estratificaron 3-4 días a 4°C con objeto de favorecer y sincronizar la germinación. El cultivo permaneció los días adecuados para cada experimento a una temperatura de 22-25°C, humedad relativa 40-60%, un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y una intensidad de luz de 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Cuando fue necesario el cultivo *in vitro* en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, las plantas se crecieron a una concentración ambiental de CO<sub>2</sub> de 2500ppm en las mismas condiciones de luz y humedad.

### 3.2.1.3 Cultivo en invernadero

El cultivo de *Arabidopsis* en invernadero se realizó, de manera rutinaria, en macetas de poliestireno cuadradas de 7x7x6,5cm y 200 mL de capacidad, rellenas con una mezcla previamente humedecida de vermiculita exfoliada calibre 3 (ASFALTEX) y sustrato Kekkila (enriquecido con macronutrientes N-P-K 15-10-20, KEKKILÄ IBERIA) en proporción 1:1 (v/v). Una vez depositadas las semillas sobre la tierra, las macetas fueron colocadas en bandejas con agua, se recubrieron con plástico transparente para crear un ambiente con alta humedad relativa y se colocaron en una cámara fría a 4°C. Al cabo de cuatro días las bandejas se transfirieron a las cabinas del invernadero, depositándose en lugares alejados de la luz solar para evitar el sobrecalentamiento. Pasados dos días, se hicieron perforaciones en el plástico y 2-3 días más tarde se retiró totalmente el plástico protector y se colocaron las bandejas en zonas adecuadas para recibir luz directa. El riego se realizó añadiendo agua a las bandejas cada 3-5 días según las necesidades hídricas de las plantas. Una vez a la semana se adicionó solución nutritiva preparada por el servicio de invernadero del Servicio Central de Soporte para la Investigación Experimental (SCSIE) en lugar de regar con agua.

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

Cuando fue necesario, algunas plántulas de cultivo *in vitro* se trasplantaron a macetas con la mezcla anteriormente mencionada y se colocaron en bandejas en las mesas del invernadero para su crecimiento.

En aquellos casos en que necesitamos obtener nuevas semillas, las plantas se cultivaron en invernadero utilizando el sistema Arasystem (arabases y aratubos) para evitar cruces no deseados. Además, cuando fue necesario se confirmaron los genotipos utilizando sus agentes de selección y/o mediante análisis diagnósticos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los genes (ver Apartado 3.4.2.1).

Las arabases y los aratubos se colocaron cuando las plantas estaban empezando a desarrollar el tallo floral. Al final del ciclo biológico, cuando el botón floral dejó de producir flores, se cesó el riego y se dejaron secar las plantas hasta la desaparición completa del color verde de las silicuas. Finalmente, las plantas se transfirieron a sobres de papel para asegurar su secado completo, y una o dos semanas después, las semillas de cada una de las plantas se limpiaron de otros restos vegetales mediante tamizado a través varios coladores de cota de malla decreciente, hasta dejar las semillas completamente limpias en tubos. Las semillas se guardaron a 4°C hasta su uso.

Durante los diferentes ensayos comentados en los párrafos anteriores las condiciones de crecimiento en la cabina del invernadero fueron de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), con una intensidad de luz aproximadamente de  $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 50-70% de humedad relativa y una temperatura alrededor de 24°C durante el día y durante la noche. La luz natural fue suplementada con luz artificial (lámparas de vapor de sodio y lámparas de vapor de mercurio) cuando fue necesario.

#### 3.2.2 *Zea mays*

##### 3.2.2.1 *Cultivo en invernadero*

Para obtener plantas de maíz se sembraron sus semillas en macetas de poliestireno (similares a las de *Arabidopsis*) que contenían perlita expandida con un tamaño de partícula de entre 1-5mm (Projar), se pusieron en bandejas y se regaron con la solución nutritiva del invernadero. Tras una semana las semillas habían germinado y las plántulas tenían unas 2 o 3 hojas.

En el caso de las líneas transgénicas se realizaron ensayos de comprobación para confirmar la presencia del transgén mediante PCR (ver Apartado 3.4.2.1) o

mediante la tolerancia al herbicida BASTA (agente de selección de estas líneas transgénicas). Las plántulas control (B104) también fueron analizadas para confirmar su genotipo. Para el análisis de tolerancia se cortó un fragmento de la primera hoja y se depositó en una placa de Petri con una solución acuosa de BASTA (131 mg/L), se sellaron las placas con cinta porosa *Micropore Hypoallergenic* y se colocaron en las mismas condiciones de luz, humedad y temperatura que durante el cultivo *in vitro* de *Arabidopsis*. Tras una semana en estas condiciones los fragmentos de hojas de plantas silvestres o singénicas se volvieron amarillos, mientras que los que pertenecían a plantas transgénicas mantuvieron su color verde (de esta manera podemos identificar de una manera sencilla las plantas transgénicas).

Tras comprobar el genotipo de las plantas de interés (controles B104 o plantas transgénicas), mediante los métodos anteriores, estas se trasplantaron a macetas o contenedores de 35 litros de capacidad con una composición de sustrato Kekkila y perlita en una proporción 3:1 (v/v) respectivamente. Las macetas se regaron entre 1 y 2 veces por semana con solución nutritiva en función de las necesidades hídricas. Tras unos meses las plantas desarrollaron las inflorescencias masculinas (de las cuales recogimos el polen) y femeninas (que se autopolinizaron) para poder obtener la siguiente generación. Cuando de la axila de alguna hoja aparecía una pequeña mazorca sin abrir (inflorescencia femenina) esta se cubría rápidamente con una bolsa de papel para evitar cruzamientos no deseados. Dado que en algunos casos existe un leve desfase temporal entre el desarrollo de la flor masculina, que se desarrolla antes, y la flor femenina, se recogió el polen de cada planta de manera individual y se guardó a 4°C hasta su uso. En el momento en el que la flor femenina se desarrolló y aparecieron los estigmas filamentosos, se procedió a polinizar cada flor con el polen de la misma planta dejándolo caer sobre los estigmas. Las autopolinizaciones de las plantas se prolongaron durante el periodo en que la inflorescencia masculina generaba polen o mientras los estigmas estaban receptivos.

Las condiciones de crecimiento en el invernadero fueron de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), con una intensidad de luz aproximada de  $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 50-70% de humedad relativa y una temperatura alrededor de 28°C durante el día y alrededor de 25°C durante la noche. La luz natural fue suplementada con luz artificial (lámparas de vapor de sodio y lámparas de vapor de mercurio) cuando fue necesario.



#### 3.2.2.2 Obtención y limpieza de las semillas

Las semillas de maíz se separaron de la mazorca de forma manual, se limpiaron y se procedió a realizar una esterilización superficial (para eliminar posibles esporas y hongos) mediante 2 lavados sucesivos de 5 minutos en soluciones alcohólicas. En primer lugar, las semillas se introdujeron en matraces de 250 mL y se esterilizaron en agitación suave en un primer lavado con etanol al 70% con SDS al 0,05% durante 5 minutos. Una vez transcurridos los 5 minutos esta solución se eliminó y se realizó un segundo lavado con etanol 70% durante otros 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las semillas se depositaron y se dejaron secar en papel de filtro dentro de una cabina de flujo laminar. Una vez secas las semillas se guardaron a 4°C hasta su uso en bolsas de papel.

#### 3.2.3 *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

##### 3.2.3.1 Medio LB

Para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* se usó el medio LB (del inglés Lysogeny Broth; Bertani, 1951 y 2004). Este medio de cultivo está formado por 1% (p/v) de triptona (PRONADISA, Ref. 1612.00), 0,5% (p/v) de extracto de levadura (PRONADISA, Ref. 1702.00) y 1% (p/v) de NaCl (el original también llevaba glucosa pero en la actualidad la formulación no la lleva). El pH se ajustó a 7 con NaOH. Cuando este medio de cultivo se requirió en estado sólido se agregó 1,5% (p/v) de agar. Para la adición de antibióticos se procedió a enfriar el medio autoclavado a unos 40-50°C. Las concentraciones finales de los antibióticos utilizados se especifican en la Tabla 3.2.

---

**Tabla 3.2.** Concentración final de los antibióticos de selección en cultivo *in vitro* de bacterias

---

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración final (µg/mL)</b>
Ampicilina	50
Espectinomycinina	100
Gentamicina	25
Kanamicina	50
Tetraciclina	5

---

### 3.2.3.2 Medio SOB

Durante el protocolo de preparación de células competentes por choque térmico (Apartado 3.6.1) el medio SOB (del inglés Super Optimal Broth) fue utilizado para el crecimiento previo de las bacterias. Este medio de cultivo está compuesto por 2% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Este medio se esterilizó mediante el autoclave en las condiciones ya descritas anteriormente.

### 3.2.3.3 Medio SOC

Para el proceso de transformación de *E. coli* se usó el medio SOC (del inglés Super Optimal Broth with Catabolic represor), un medio más enriquecido para el cultivo de bacterias. La característica fundamental de este medio es que permite obtener elevadas eficiencias de transformación bacteriana mediada por plásmidos, al crecer las células bacterianas en este medio después de ser transformadas por choque térmico (Apartado 3.6.3). 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, después de autoclavar se agregaron las soluciones estériles de MgCl<sub>2</sub> y glucosa a una concentración final de 10 y 20 mM, respectivamente.

### 3.2.3.4 Mantenimiento bacteriano

En función del objetivo y el protocolo empleado 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<sup>®</sup> o matraces estériles de 15 o 250 mL, respectivamente. Los medios de cultivo con las bacterias inoculadas se colocaron en un incubador orbital (COMECTA, Ref. 5312090) a 37°C para el cultivo de *E. coli* o a 28°C para el crecimiento de *A. tumefaciens* (temperaturas óptimas para cada bacteria) a una velocidad de agitación entre 200 y 250 revoluciones por minuto (rpm) para mantener una adecuada aireación.

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

Los medios de cultivo (líquidos o sólidos) fueron suplementados con los antibióticos de selección adecuados en función de las resistencias específicas para cada una de las cepas y los vectores usados.

Para el mantenimiento a largo plazo de las cepas bacterianas se hicieron glicerizados a partir de los cultivos líquidos. Para ello, se añadieron 270  $\mu\text{L}$  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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 3.3 Aislamiento de ácidos nucleicos

### 3.3.1 Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*

Para la extracción de ADN genómico de cada planta se partió de unos 50 - 100 mg de material vegetal joven (trozo de hoja) que fue triturado a temperatura ambiente en un tubo de 1,5 mL con ayuda de un pistilo de plástico. A continuación, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción [200 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético; pH 7,5 - 8,0) y 0,5% SDS] y se agitaron los tubos vigorosamente durante 5 segundos en un vórtex hasta homogeneizar la muestra. En este paso, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta completar la homogeneización de las muestras a analizar. Posteriormente se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm (esta y el resto de centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente), y se recuperaron 300  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se transfirieron a nuevos tubos, evitando aspirar el precipitado. A continuación, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos, induciéndose así la precipitación del ADN. Posteriormente se realizó una centrifugación durante 5 minutos a 13000 rpm, recuperando de esta forma el ADN precipitado en el fondo de los tubos. Tras eliminar el sobrenadante por decantación, las muestras se centrifugaron durante 5 segundos a 13000 rpm, se eliminó el resto de solución con ayuda de una pipeta y se dejó secar el precipitado durante unos 20 minutos. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (mQ) y se conservó el ADN extraído a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.3.2 Extracción de ADN genómico de maíz

El protocolo de extracción utilizado para la extracción de ADN genómico de maíz fue el mismo que el empleado para la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* pero con algunas modificaciones. Para la extracción de ADN genómico de cada planta se partió de unos 50 - 100 mg de material vegetal (trozo de hoja) que fue triturado a temperatura ambiente en un tubo de 1,5 mL con ayuda de un

pistilo de plástico. A continuación, se agregaron 600 µL de tampón de extracción [200 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA (pH 7,5 - 8,0) y 0,5% SDS] y se agitaron los tubos vigorosamente durante 5 segundos en un vórtex hasta homogeneizar la muestra. En este paso, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta completar la homogeneización de las muestras a analizar. Posteriormente se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm (esta y el resto de centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente), y se recuperó todo el sobrenadante (aproximadamente 600 µL) que se transfirió a nuevos tubos, evitando aspirar el precipitado. Posteriormente, se añadió el mismo volumen de cloroformo (600 µL) y se agitó vigorosamente en un vórtex. Una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 13000 rpm, se recuperaron 400 µL del sobrenadante de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo nuevo de 1,5 mL. A continuación, se añadieron 400 µL de isopropanol, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos, induciéndose así la precipitación del ADN. Posteriormente se realizó una centrifugación durante 5 minutos a 13000 rpm, recuperando de esta forma el ADN precipitado en el fondo de los tubos. Tras eliminar el sobrenadante por decantación, las muestras se centrifugaron durante 5 segundos a 13000 rpm, se eliminó el resto de solución con ayuda de una pipeta y se dejó secar el precipitado durante unos 20 minutos. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 100 µL de H<sub>2</sub>O mQ y se conservó el ADN extraído a 4°C hasta su uso.

### 3.3.3 Extracción de ADN plasmídico

El protocolo seguido para la extracción de ADN plasmídico fue el mismo tanto si se usó para secuenciar la muestra como para otros análisis (restricción para verificar la presencia o no de un determinado fragmento de ADN, transformación de *Agrobacterium*, etc.). El protocolo que se siguió fue el de lisis alcalina con SDS con algunas modificaciones (Birnboim y Doly, 1979).

Este protocolo está basado en tres soluciones (I, II y III) cuya composición se detalla en el texto. Para la extracción de ADN plasmídico siguiendo este procedimiento se partió de 3-5 mL de cultivo saturado de *E. coli* en un tubo de 15 mL. Este cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante. El precipitado resultante fue resuspendido en 200 µL de la solución I [50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA pH 8,0)] mediante pipeteo, para posteriormente, añadir 300 µL de la solución II (0,2

N de NaOH, 1% de SDS) y 300  $\mu$ L de la solución III [60 mL de acetato de potasio (5 M), 11,5 mL de ácido acético glacial, y 28,5 mL de H<sub>2</sub>O]. Entre la adición de la solución II y la solución III se incubó la muestra en hielo durante 5 minutos, y cada vez que se añadió una de las dos soluciones los tubos se agitaron. Tras la adición de la última solución las muestras se centrifugaron durante 10 minutos y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo. A continuación, añadimos 5  $\mu$ L de ribonucleasa (RNasa a 10 mg/mL) e incubamos durante 20 minutos a 37°C. Tras la incubación, añadimos 400  $\mu$ L de cloroformo, agitamos y centrifugamos 10 minutos a 12000 rpm. Una vez centrifugado recogimos 600  $\mu$ L del sobrenadante y los pasamos a un nuevo tubo. Añadimos el mismo volumen de isopropanol y lo incubamos 10 minutos a -20°C para favorecer la precipitación del ADN. Una vez transcurrido dicho tiempo, centrifugamos 10 minutos a 13000 rpm y eliminamos el sobrenadante. Añadimos 1 mL de etanol 70% frío y volvimos a centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm. Eliminamos el sobrenadante por decantación y se centrifugó a las mismas revoluciones durante 5 segundos para eliminar posteriormente el resto de solución con ayuda de una pipeta y se dejó secar el precipitado. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ y se conservó a -20°C hasta su uso.

#### 3.3.4 Extracción de BACs

Para poder clonar el gen *PSAT1* (ver Apartado 3.7.3) se utilizó como molde el BAC (cromosoma artificial bacteriano) F8D20 proporcionado por el TAIR, que contiene la región genómica donde se encuentra dicho gen. El TAIR nos proporcionó la cepa de *E. coli* que lo mantenía, por lo que tuvimos que hacer una extracción de este BAC a partir de un cultivo saturado crecido a 37°C en medio líquido LB suplementado con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina.

El protocolo de extracción consistió en centrifugar 1,5 mL del cultivo y resuspender el precipitado celular en 200  $\mu$ L de tampón de resuspensión (solución I del Apartado 3.3.3 suplementada con 5 mg/mL de lisozima). Se incubó esta solución bacteriana durante 5 min en hielo, se añadió 400  $\mu$ L de la solución de lisis (solución II del Apartado 3.3.3), se agitó suavemente por inversión del tubo varias veces y se incubó nuevamente durante 5 min en hielo. Tras esta incubación se añadió la solución ácida (solución III del Apartado 3.3.3), se mezcló suavemente y se introdujo el tubo en el congelador de -80°C durante 15 min. A continuación, se descongeló y rápidamente se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Del sobrenadante se pipetearon a un nuevo tubo de 1,5 mL

un total de 750  $\mu\text{L}$ , se añadieron 450  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se agitó la preparación y se volvió a introducir durante 15 min a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tras este periodo se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% enfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó durante 2 min a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de TE [(10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), y 1 mM de EDTA (pH 8,0)] y se dejó resuspender el ADN a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12-16 horas hasta su utilización. En caso de no utilizarlo inmediatamente la solución de ADN de tipo BAC se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.3.5 Extracción de ARN total de plantas

Para la extracción de ARN de las diferentes muestras vegetales se usó el kit IBI MINI Total RNA kit (ref: IB47343) siguiendo las especificaciones del fabricante. Todas las soluciones y columnas usadas fueron las suministradas por el propio kit ya que están libres de RNasas, con lo que se permite una mayor protección frente a la degradación del ARN.

Se partió de material congelado en nitrógeno líquido, que se trituroó en un mortero y del que se realizaron alícuotas de entre 50-70 mg. A estas alícuotas se les añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón RB, 5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y se agitaron con un vórtex. Posteriormente, las muestras se calentaron a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y las mezclas se cargaron en columnas de filtrado (para poder eliminar de la solución los restos vegetales). A continuación, se centrifugaron durante 1 minuto a 3500 rpm y los filtrados se pasaron a tubos nuevos de 1,5 mL, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se homogeneizaron por agitación. Estas mezclas se cargaron en un segundo tipo de columnas y se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto (con este paso los ácidos nucleicos se unieron a las columnas).

Tras un paso de lavado con el tampón *Wash Buffer* (adición de 400  $\mu\text{L}$  y posterior centrifugación en las mismas condiciones) se procedió a la degradación selectiva del ADN unido. Para ello, se añadió y se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente una solución de desoxirribonucleasa (5  $\mu\text{L}$  de DNasa y 45  $\mu\text{L}$  de su tampón). Tras este periodo de digestión se añadieron a la columna 400  $\mu\text{L}$  de tampón W1 para detener la reacción de la DNasa y se centrifugó a  $15000 \times g$  durante 30 segundos. Por último, se hicieron 2 lavados con 600  $\mu\text{L}$  con el tampón *Wash Buffer* con pasos intermedios de centrifugación a 13000 rpm. Finalmente se

hizo un último paso de centrifugación a la misma velocidad que la anterior durante 3 minutos para secar por completo la columna. Para la elución del ARN purificado se añadieron 40 µL de agua libre de RNasa y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. El volumen eluido conteniendo el ARN se guardó a -80°C hasta su utilización.

## 3.4 Análisis de los ácidos nucleicos

### 3.4.1 Cuantificación de ácidos nucleicos

La determinación de la concentración de ácidos nucleicos (ADN plasmídico o ARN) se realizó mediante espectrofotometría con 1 µL de la muestra utilizando un NanoDrop ND-1000, el cual indica directamente la concentración del ADN o ARN y su pureza. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es una técnica de biología molecular en el cual se obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un bajo número de copias (Saiki et al., 1985, 1988; Mullis et al., 1986). Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo partiendo de una cantidad de ADN molde de entre 10 ng y 50 ng (en una solución acuosa), que podía ser bien ADN genómico, plasmídico o de BAC. En ocasiones, como molde se colocaron algunas células de *E. coli* o *A. tumefaciens*, que con los primeros minutos de la PCR a 95°C se rompen y liberan sus plásmidos en la mezcla de reacción (a esta técnica peculiar se la conoce como PCR de colonia).

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). Cada reacción se realizó en 30 µL de mezcla que contenía: tampón de PCR 1X [Tris HCl 75 mM (pH 9,0), KCl 50 mM y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM], MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,2 mM de cada desoxinucleótido (dNTP), 0,5 µM de cada cebador, 0,9 U de Taq polimerasa y entre 10 y 50 ng de ADN. En caso de necesitar más volumen de amplificación se incrementaron las cantidades de la mezcla proporcionalmente.

Como polimerasa termoestable en las reacciones rutinarias donde no se requería una alta fidelidad, se usó la enzima Taq DNA Polimerasa Clean up (UVAT

Bio, Ref. R-0202-01), mientras que cuando se requería una amplificación del ADN de alta fidelidad se empleó la enzima Phusion Hot Start II DNA Polimerasa (ThermoFisher Scientific, Ref. F-549S).

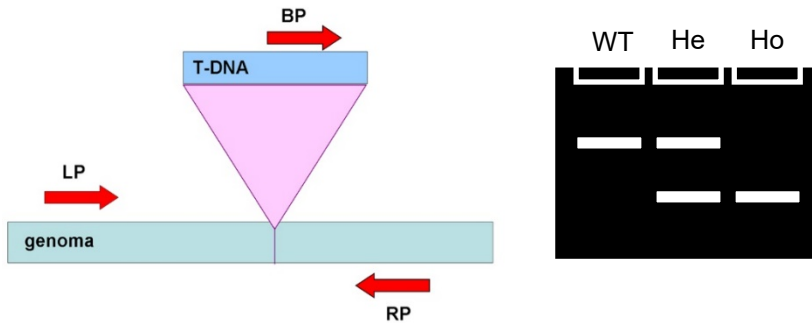
Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR SYSTEM 9600 (APPLIED BIOSYSTEMS). Los parámetros estándar del termociclador para la amplificación fueron: 10 minutos a 94°C, seguidos de 35-45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a una temperatura de 1 o 2°C inferior a la menor temperatura 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), y un tiempo de extensión a 72°C, siendo el tiempo de extensión de 1 minuto por cada 1000 pb de ADN a amplificar (o de 30 segundos por cada 1000 pb en el caso de la Phusion Hot Start II DNA polimerasa). Para finalizar se mantuvo la temperatura a 72°C durante 10 minutos, para posteriormente rebajarla a 4°C y extraer del termociclador las muestras amplificadas para su análisis. Durante todo el proceso hasta el mantenimiento a 4°C el bloque térmico superior se mantuvo a una temperatura de 103°C para evitar la condensación de la muestra. Los cebadores y sus secuencias respectivas utilizadas en esta tesis se detallan en la Tabla 3.3.

#### 3.4.2.1 PCR diagnóstica

La PCR diagnóstica se utilizó para genotipar los diferentes mutantes empleados en esta tesis doctoral, en concreto para amplificar fragmentos de ADN genómico de los genes de la familia *PGDH* y del gen *PSP1* en *Arabidopsis*, y del gen heterólogo *PGDH1* de *Arabidopsis* en líneas transgénicas de maíz. Así pues, para la identificación de los mutantes heterocigotos y homocigotos, se realizaron PCRs diagnósticas utilizando un par de oligonucleótidos (LP y RP), que hibridan en el ADN del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado del T-DNA (ADN de transferencia) y un tercer oligonucleótido que hibrida con la inserción del T-DNA (BP). Tras las distintas PCRs, los correspondientes productos se visualizaron en un gel de agarosa lo que permitió la identificación de los mutantes homocigotos y heterocigotos a través del análisis del patrón de bandas resultante. Este análisis está basado en la amplificación de dos bandas de diferentes tamaños: una banda de tamaño menor correspondiente al alelo mutante homocigoto y otra de mayor tamaño correspondiente al alelo silvestre (WT). El patrón de bandas también permite la identificación de plantas heterocigotas por la presencia de ambas



bandas (Figura 3.1). En el caso del maíz, para realizar la PCR diagnóstica se emplearon cebadores que se unieran al transgén que amplificaba una región que comprende el gen *PGDH1* y el gen *GFP* (proteína verde fluorescente) de manera que aquellas que presentaban banda tras realizar una electroforesis en gel de agarosa se consideraron positivas para el transgén.



**Figura 3.1.** Esquema de la posición de los cebadores (imagen de la izquierda) y representación de las bandas esperadas tras la PCR en líneas silvestres (WT), heterocigotas (He) y homocigotas mutantes (Ho) realizando una PCR con los tres cebadores (imagen de la derecha). LP y RP hacen referencia a cebadores del genoma de la planta, mientras que BP hace referencia a un cebador de unión en el T-DNA.

#### 3.4.3 Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores se usaron los programas informáticos Jellyfish v1.5 y AmplifX 1.7.0.

Los criterios iniciales para el diseño de los cebadores utilizados en las diferentes PCRs [para la identificación de genotipos, para la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), para secuenciar diferentes regiones de interés o para el clonaje de secuencias en los vectores de interés] se pueden resumir en una selección de fragmentos de entre 20-28 nucleótidos con un contenido alto de G+C (alrededor del 50-60%). Las secuencias candidatas fueron valoradas posteriormente en función de sus parámetros de estabilidad y temperaturas de hibridación, procurando siempre que entre los cebadores de un mismo conjunto (directo-reverso) ambas temperaturas fueran lo más próximas posibles para evitar hibridaciones de baja especificidad. Asimismo, se procuró evitar secuencias de tres o más citosinas o guaninas en las regiones terminales y se descartaron aquellos cebadores que formaron dímeros. Además de estos criterios, en el caso de los

cebadores diseñados para qRT-PCR se comprobó que amplificaran un fragmento de entre 100-200 pb (Udvardi et al., 2008). Estos criterios se usaron tanto para el diseño de cebadores para *Arabidopsis* como para el maíz.

Una vez diseñados los cebadores se utilizó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la página del TAIR (<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) para comprobar su especificidad y que no se unieran a otras regiones inespecíficas en el genoma de *Arabidopsis*. En el caso del maíz, se empleó la herramienta BLAST de la página web del *maize and genomics database* (<https://maizegdb.org/>) para comprobar la especificidad de los cebadores diseñados para esta planta.

Los cebadores empleados en este trabajo se detallan en las Tablas 3.3 y 3.4.

#### 3.4.4 Purificación de los productos de PCR

Para la purificación del producto de PCR se utilizó el kit de ROCHE APPLIED SCIENCE High Pure PCR Product Purification Kit (Ref. 11732668001). Mediante este procedimiento se eliminan los restos de cebadores, sales, oligonucleótidos no incorporados y la enzima ADN Polimerasa, que pueden interferir en las posteriores reacciones de secuenciación o clonaje. En caso de volúmenes de PCR inferiores a 100  $\mu$ L, se ajustó a dicho volumen con H<sub>2</sub>O mQ. Posteriormente se le añadieron 500  $\mu$ L del tampón de unión [3 M de tiocianato de guanidinio, 10 mM de Tris-HCl, 5% de etanol (v/v), pH 6,6 (25°C)] y se mezcló por pipeteo para su homogenización. La mezcla se introdujo en las columnas con filtro suministradas por el kit y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente, eliminando posteriormente la solución filtrada. Llegados a este punto, en el que el ADN está fijado a la matriz de la columna, se procedió a su lavado con sendas adiciones del tampón de lavado [20 mM de NaCl, 2 mM de Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)] de 500  $\mu$ L y 200  $\mu$ L respectivamente, seguidas cada una de un paso de centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm y la posterior eliminación del filtrado. El eluido final de la muestra se realizó con 50  $\mu$ L de tampón de elución [10 mM de Tris-HCl, pH 8,5 (25°C)] por centrifugación (13000 rpm, 1 minuto). El ADN purificado se cuantificó (ver Apartado 3.4.1) y se guardó a -20°C hasta su uso.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 3.3.** Lista de cebadores para *Arabidopsis* usados en este trabajo.

Gen	Cebador	Secuencia	Uso
At4g34200 (PGDH1)	PD LP6	GAAGTGAGGGTGGGTTTTCTAGGG	Genotipado para el mutante <i>pgdh1-2</i>
	PD RP6	CGGTGGCGTTTCACAAACAAC	
	Gabi 8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	
	EDA9 RT For	GTTGGGAGAATTGCACCGAG	qRT-PCR para la línea <i>c-pgdh1-2</i> y las líneas triples sobreexpresoras
	At4g34200GFP-R	GAGCTTGAGGAAAACGAACTCCTC	
	EDA9 RT Rev	AGAATCAACAACACACCAAAGTAGAG	
At1g17745 (PGDH2)	PD RP4	GGGAGGTTAGCTGTGCAGTTAG	Genotipado para el mutante <i>pgdh2-2</i>
	PD LP4	GTGGTCCTTGTCTGTCTTCTATC	
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
	PD RP10	CTCGCAAAGATTACGAGATCTG	Genotipado para el mutante <i>pgdh2-3</i>
	PD LP10b	GGTTGTGACGCGTGAGATTG	
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
	PD 4 RT For	GGACAGGTTGGTAACATACTTGG	
	PD 4 RT Rev	CATCAACTCCAATCGCCATTATC	
At3g19480 (PGDH3)	PD LP7-8RP9	GGCAGATGCAAAGAGATGAAG	Genotipado para el mutante <i>pgdh3-1</i>
	PD RP7-8LP9b	GGATGTAGCGTAATCTAGCACAAAC	
	DMS5	CGGGATCCGACACTCTTTAATTAAGTACACTC	
	PD LP7-8RP9	GGCAGATGCAAAGAGATGAAG	Genotipado para el mutante <i>pgdh3-2</i>
	PD RP7-8LP9b	GGATGTAGCGTAATCTAGCACAAAC	
	Gabi 8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	
	PD8 RT For	CTCTGTTTTCCCATCCGTCAG	
	PD8 RT Rev	GCCTAGCTTCTCCGTTACGAG	
At4g35630 (PSAT1)	PSAT1+1 For	ATGGCGGCTACGACGAAC	Para amplificar la región codificante del gen <i>PSAT1</i> a partir del BAC F8D20 para generar la construcción Pro35S:PSAT1-GFP en el vector pMDC86
	PSAT1+ 1270 Rev	AGCATGCTTAGCCTGGAAATC	
	PSAT1+63 For	ACCCAAATCATCATCTCAATCC	Cebadores usados para secuenciar regiones del gen <i>PSAT1</i>
	PSAT1 +305 rev	CCAGATCCACGCCAGTTGT	
	PSAT1+610 for	AGTTGGAGCAAACCTCCGGAC	
	PSAT1 +994 for	GTGGAGAAGAAGAACCAGAGGAA	

Tabla 3.3. Continuación

Gen	Cebador	Secuencia	Uso
At4g35630 ( <i>PSAT1</i> )	PSAT1+1189 for	AGATCAGTGGGAGGTATGAGAGC	Cebadores usados para secuenciar regiones del gen <i>PSAT1</i>
	M13 Forward	TGTAAAACGACGGCCAG	
	T7 PROMOTER REV	TAATACGACTCACTATAGGG	
	PSAT1+30 For	CGGAAGCAACAACACTCAGATT	qRT-PCR para el gen <i>PSAT1</i> de las líneas triples sobreexpresoras
	PSAT1+162 rev	CTCCATCTTGAACCTGAGTCGTT	
At1g18640 ( <i>PSP1</i> )	PSP_RP	CTCGACAAGAGACCCCAAG	Genotipado para el mutante <i>psp1-1</i>
	PSP_LP	CCGCCAAGATTGATTAGTCTG	
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
	2x35S -786 for	GGTCACTGTCAACGTCGC	Para obtener la construcción <i>Pro35S:PSP1-GFP</i> en el vector pMDC100 a partir del vector pMDC83 <i>Pro35S:PSP1-GFP</i>
	T-Nos +322 <i>Bg</i> II Rev	GGAAGATCTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG	
	pMDC100Clo-478 for	CTGCTCTAGCATTGCCATTC	Para secuenciar la construcción <i>Pro35S:PSP1-GFP</i>
	pMDC100NptII-838 rev	AAGCTGCTCTAGCCAATACGC	
	PSP +36 rev	AACTGGCACAACCCTTGAAGTAG	
	PSP2 RT For	GATGCCAAGAATCGATGCTAC	qRT-PCR para el gen <i>PSP1</i> de las líneas triples sobreexpresoras
	PSP2 RT Rev	CTCGACAAGAGACCCCAAG	
At1g13320	At1g13320 For	ACCTGCGGTAATAACTGCATCTA	Estándar interno para qRT-PCR
	At1g13320 Rev	CCGAACATCAACATCTGGGTC	

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 3.4.** Lista de cebadores para maíz usados en este trabajo.

construcción génica/gen	Cebador	Secuencia	Uso
<i>ProUbi:PGDH1-GFP</i>	EDA9GFP <i>Xba</i> I <i>Avr</i> II F	TGCCTAGGCTCTAGAGCCCTTATGTC AGCCACC	Cebadores usados para la obtención de la construcción génica <i>ProUbi:PGDH1-GFP</i> en el vector pMCG1005 a partir del vector pMDC83 <i>Pro35S:PGDH1-GFP</i>
	EDA9GFP <i>Spe</i> I Rev	GACTAGTGGGAAATTCGAGCTCTT AGTGGT	
	At4g34200+2323 For	TCAACCTGGTATGATCGGGACTG	Cebadores usados para el genotipado de las plantas de maíz transgénicas
	GFP del 83+373 Rev	CCTCCTGAAATCGATTCCCTTA	
At4g34200 ( <i>PGDH1</i> )	EDA9 RT For	GTTGGGAGAATTGCACCGAG	Cebadores usados para la qRT-PCR de las líneas de maíz sobreexpresoras de <i>PGDH1</i>
	At4g34200GFP-R	GAGCTTGAGGAAAACGAACCTCTC	
Actina (Zm00001eb366720)	ZmActin2_RT-F	GTTTGATTGGTGGTTCCATTC	Cebadores para el gen de la actina 2 usados como control positivo en las PCRs realizadas para la genotipación de las plantas de maíz y como estándar interno en las qRT-PCR
	ZmActin2_RT-R	GACTATGCCCGGACCAGATT	

#### 3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos de PCR se usó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. De forma rutinaria los productos de amplificación del ADN 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% de agarosa D-1 de baja electroendósmosis (PRONADISA, Ref. 8016) y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio.

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

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

Tras la electroforesis, para saber si los fragmentos amplificados eran los esperados, estos se compararon con las bandas de tamaño conocido del marcador llamado 100 bp plus (UVAT Bio. Ref: R-0404-01), que tiene un rango de 100 pb a 5 kb.

En aquellos casos en los que fue requerida la cuantificación del producto de PCR separado por electroforesis, se utilizó el marcador  $\lambda$ -HindIII (Takara, Ref. 3403) y por comparación de la intensidad de bandas se estimó su concentración. En este último caso, para su preparación se utilizó 1  $\mu$ L de marcador (0,5  $\mu$ g), 1  $\mu$ L de tampón de carga 6X y 4  $\mu$ L de agua destilada.

### 3.4.6 Extracción y purificación de bandas de ADN en gel de agarosa

Tras separar las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, cuando fue conveniente, las bandas de interés se purificaron siguiendo el protocolo especificado por el kit de MACHEREY-NAGEL PCR clean-up Gel extraction, NucleoSpin® Extract II (Ref. 740609.50).

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis, se identificó la banda de interés bajo luz UV y se cortó el fragmento de gel que la contenía. El fragmento de gel se depositó en un tubo de 1,5 mL y se añadió el tampón NT. El volumen de tampón utilizado en este paso se calculó a razón de 200  $\mu$ L de tampón por cada 100 mg de gel de agarosa. La muestra se incubó a 50°C hasta que se disolvió el gel y posteriormente se cargó en una columna con su correspondiente tubo de colección. A continuación, se centrifugó 1 min a 13000 rpm y se desechó el filtrado. A partir de este punto, los pasos siguientes tuvieron como objetivo lavar la membrana de sílice de la columna donde estaba fijado el ADN. Para tal fin, se añadieron 700  $\mu$ L del tampón NT3 y la muestra se centrifugó otro minuto a 13000 rpm desechando nuevamente el filtrado. Este último paso se

repitió nuevamente, pero en esta ocasión la centrifugación duró 2 min para asegurarnos de eliminar cualquier resto de la solución. Finalmente, el ADN se eluyó añadiendo 50  $\mu$ L del tampón NE a la columna, incubando la muestra durante 1 min a temperatura ambiente, y como último paso, centrifugando durante 1 min a 13000 rpm. El ADN purificado se cuantificó (ver Apartado 3.4.1) y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 3.4.7 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron con las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos fabricantes. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir. Las enzimas usadas para el diseño de la construcción del gen *PSP1* unido al gen de la proteína GFP y bajo el control del promotor *35S* fueron *HindIII* (Takara, Ref:1060A) y *Ecl136II* (Thermofisher, Ref: ER0251), mientras que para la construcción pMDC100 *Pro35S:PSP1-GFP* fue *HindIII*. En el caso de la construcción *ProHS:PGDH1-GFP* se usaron las enzimas de restricción *PmeI* (Thermofisher, Ref: ER1341) y *SpeI* (Takara, Ref: 1086A).

#### 3.4.8 Ligación de fragmentos de ADN

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

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

#### 3.4.9 Análisis y secuenciación de ADN

Los plásmidos obtenidos en la elaboración de las distintas construcciones genéticas fueron secuenciados en el Servicio de Genómica del SCSIE de la Universidad de Valencia. Los alineamientos y las comparaciones entre secuencias se realizaron a través de la aplicación BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

## 3.5 Análisis de la expresión génica

### 3.5.1 Obtención del cDNA

Para la obtención del ADN complementario (cDNA) se usaron dos kits. El primero de ellos es el FIREScript RT cDNA Synthesis KIT (Ref. 06-15-00050) de Solis BioDyne. Para cada reacción se añadieron 0,5 µL del primer Oligo dT (100 µM), 0,5 µL de random primers (100 µM), 0,5 µL de dNTP mix (20 mM cada dNTP), 0,5 µL de RiboGrip RNase Inhibitor (40 U/µL), 2 µL del tampón de reacción RT (10x con DTT), 1 µL de FIREScript RT, el volumen necesario de muestra de ARN que corresponda a 2 µg de ARN y el volumen adecuado de agua libre de RNAsas para completar un volumen final de 20 µL de reacción. El otro kit que se empleó fue el de ThermoFisher Scientific Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Ref. K1641). En este caso, en cada reacción se añadió el volumen necesario para contener 2 µg ARN, 2 µL de la mezcla de reacción (que contiene el tampón de reacción, los Oligo dT, los dNTPs y los random hexamer primers), 1 µL de la mezcla enzimática (que contiene la enzima retrotranscriptasa y el RiboLock RNase Inhibitor), y el volumen de agua necesario hasta completar un volumen final de 20 µL.

En ambos casos, e independientemente del kit utilizado, las mezclas de reacción se incubaron en un termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C seguido de un paso final de 5 minutos a 85°C. Terminado el proceso se añadieron 20 µL de agua mQ a cada tubo de reacción y se guardaron a -80°C hasta su uso.

### 3.5.2 PCR cuantitativa a tiempo real

Para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los genes de interés se utilizó el kit de TAKARA TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus) (Ref. RR420L) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada reacción contenía 7,8 µL de agua mQ, 0,4 µL de cada cebador a 10 mM, 10 µL de TB Green Premix Ex Taq, 0,4 µL de ROX Reference Dye (Estos dos últimos proporcionados por el kit) y 1 µL del cDNA. Para cada muestra de cDNA y juego de cebadores se realizaron tres repeticiones.



El análisis por qRT-PCR fue llevado a cabo usando un GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (APPLIED BIOSYSTEMS, Ref. PN 4304472), que detecta la fluorescencia emitida por el TB GREEN intercalado en la doble cadena de ADN. El método de amplificación fue el siguiente: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura del cebador, y 1 min de extensión 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.

Como control de expresión se utilizó el gen At1g13320 en *Arabidopsis* y el gen de la actina 2 en maíz, que tienen expresión constitutiva, seleccionados de acuerdo con los principios metodológicos expuestos por Czechowski et al., (2005) y en función de la eficiencia de los cebadores. La abundancia relativa del nivel de ARN mensajero fue calculada a través del método comparativo por análisis de los diferentes parámetros de Ct obtenidos de acuerdo con Pfaffl (2001).

## 3.6 Obtención de células competentes y procedimientos de transformación bacteriana

### 3.6.1 Obtención de células competentes de *Escherichia coli*

Para la propagación de plásmidos recombinantes y obtención de las construcciones descritas en el Apartado 3.7, se utilizaron células competentes de *E. coli*, obtenidas a través del protocolo descrito por Inoue et al., (1990) con modificaciones.

Se fabricaron células competentes de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Para ello, se partió de 400  $\mu$ L de cultivo saturado, que fue inoculado en 200 mL de medio SOB. Este cultivo se incubó entre 18-25°C hasta alcanzar un valor de absorbancia entre 0,5-0,7 a 600 nm. Alcanzado este punto, el cultivo se enfrió en hielo durante 10 min, para posteriormente centrifugar las células durante 10 min a 5000 rpm a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante por decantación, el sedimento celular se resuspendió agitando primero con el resto del sobrenadante para continuar posteriormente la resuspensión con 10 mL de tampón de transformación (TB) frío [20 mM de PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)] a pH 6,7 ajustado con KOH, 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, 210 mM de KCl y 50 mM de MnCl<sub>2</sub>]. La mezcla se mantuvo durante 10 min en hielo y se centrifugó en las mismas condiciones. Acto seguido, se repitió la

operación resuspendiendo primero el precipitado bacteriano con el resto del sobrenadante y, posteriormente, con 4 mL de TB frío. Finalmente, y con agitación suave continuada se añadieron gradualmente 375  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO; VWR, Ref 23500-260). Esta solución se dejó reposar 10 min en hielo y se distribuyó en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos estériles de 1,5 mL. Cada alícuota se congeló inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80°C.

Para poder evaluar la eficiencia de transformación de las células competentes, transformamos alícuotas de 100  $\mu$ L de células competentes con 5  $\mu$ L (50 pg) del plásmido pUC19 siguiendo el protocolo de Hanahan (1983) y Tartof y Hobbs (1988). Se incubaron durante 16-18 horas y se calculó la eficiencia de transformación con las siguientes formulas:

$$ufc\ transformadas = \frac{(\text{número de colonias})}{DNA\ de\ plásmido\ (\mu g)} \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{factor de dilución} = \frac{\text{Volúmen total de transformación}}{\text{Volumen sembrado}}$$

### 3.6.2 Obtención de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la obtención de células competentes de *A. tumefaciens* se generó un cultivo saturado en 10 mL de medio LBTG [medio LB suplementado con tetraciclina (5  $\mu$ g/mL) y gentamicina (25  $\mu$ g/mL)]. A continuación, se inoculó 1 mL de este cultivo en 100 mL de medio LBTG, y se incubó a 28°C a 250 rpm de agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 1. Las células de este cultivo se recogieron por centrifugación en frío (4°C) a 5000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 1 mL de una solución a 4°C de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. La suspensión se dividió en alícuotas de 0,1 mL, que se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

### 3.6.3 Protocolo de transformación de *Escherichia coli*

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

Las células competentes mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se pusieron en hielo durante 5 min para su descongelación y se les añadió de 1 a 10  $\mu\text{L}$  del plásmido transformante (proveniente de la mezcla de ligación o de recombinación). Tras agitar el tubo las células con el plásmido se dejaron reposar durante 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se realizó un choque térmico de 90 segundos a  $42^{\circ}\text{C}$  en un bloque térmico, e inmediatamente después se colocó el tubo en hielo durante 2 min. Seguidamente, se agregó 1 mL de medio SOC y se incubaron durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación suave. Finalmente, se extendió parte del contenido de la transformación en 3 placas de medio LB con el antibiótico de selección adecuado en función del vector utilizado. En cada una de las tres placas se extendió un volumen diferente del cultivo (25, 100 y 500  $\mu\text{L}$ ) mediante el uso de bolas de vidrio estériles y agitación de la placa. Una cuarta placa con medio LB sin antibiótico se sembró con 100  $\mu\text{L}$  de bacterias transformadas para comprobar la viabilidad de las células. Las colonias resistentes a los antibióticos de selección resultaron visibles tras un periodo de 12 a 16 horas después de la siembra. La presencia del vector de transformación en dichas colonias fue verificada por PCR de colonia. Las colonias transformantes que resultaron positivas se cultivaron en 5 mL de medio LB (junto con el antibiótico de selección del vector de transformación), y tras una noche de crecimiento a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación, se procedió a la extracción y secuenciación de los plásmidos siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 3.3.3. También se hicieron glicerizados de las colonias positivas siguiendo el protocolo del Apartado 3.2.3.4 para posteriores usos.

#### 3.6.4 Protocolo de transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la introducción de las construcciones en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 pSOUP se utilizó el método de congelación-descongelación de Holsters et al., (1978) con modificaciones. Se descongeló una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y se añadió 1  $\mu\text{g}$  de plásmido. La mezcla se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente se preincubó durante 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añadió 1 mL de medio LBTG. La mezcla resultante se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 4 h en agitación suave. Seguidamente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de medio LBTG. Finalmente, la suspensión transformante se sembró en placas con medio sólido LBTGK [LBTG suplementado con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina (el antibiótico de selección para bacterias del vector de transformación)]. Se sembraron 25, 100 y 500  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana de igual modo que con *E. coli*.

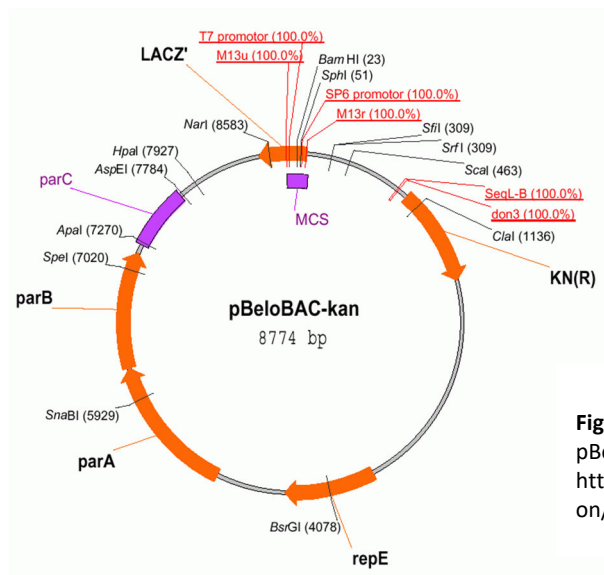
Dichas placas se incubaron a 28°C en oscuridad. Las colonias resistentes a los antibióticos de selección resultaron visibles a los 2-3 días de la siembra. Las colonias transformantes se verificaron mediante PCR de colonia como en el caso de *E. coli*. Las colonias que resultaron positivas se lanzaron en 5 mL de medio LBTGK. Tras un día de crecimiento a 28°C en agitación constante los cultivos se saturaron y se procedió a obtener glicerizados para su almacenaje a -80°C (siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.3.4 para *E. coli*).

## 3.7 Diseño de las construcciones plasmídicas para la obtención de plantas transgénicas

### 3.7.1 BAC y vectores de clonación y transformación

Para poder generar las nuevas líneas transgénicas empleadas en esta tesis doctoral se emplearon los siguientes vectores y BAC:

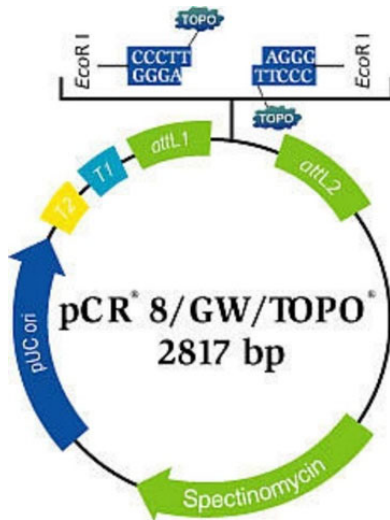
**pBeloBAC-Kan:** BAC proporcionado por el TAIR que contiene clonado, entre otros genes de *Arabidopsis*, el gen *PSAT1*. Este BAC se utilizó para la amplificación de dicho gen lo que permitió su posterior clonaje en el plásmido pCR8®/GW/TOPO®. Como agente de selección presenta el gen de resistencia a kanamicina (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Esquema del plásmido pBeloBAC-Kan. Extraído de la web <https://www.arabidopsis.org/jsp/commom/image.jsp?id=1708&format=gif>.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

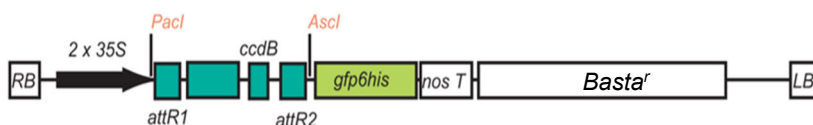
**pCR8®/GW/TOPO®**: Plásmido multicopia de 2817 pb utilizado para la clonación de productos de PCR en *E. coli*. Posee el gen marcador de resistencia al antibiótico espectinomicina. Este plásmido, que incorpora la tecnología Gateway de la empresa INVITROGEN, fue utilizado para clonar los productos de PCR necesarios para la elaboración de las diferentes construcciones del pMDC86 con los genes de interés, aprovechando que se comercializa linealizado y posee, en cada uno de sus extremos, un nucleótido de deoxitimidina en los cuales tiene covalentemente unida una enzima topoisomerasa I del virus Vaccinia por cada nucleótido (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Esquema del plásmido pCR8®/GW/TOPO®. Extraído de la web <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K250020>

**pMDC86** es un plásmido modificado por nuestro grupo a partir del plásmido pMDC83 (Curtis y Grossniklaus, 2003) en el cual se ha sustituido el gen de resistencia a higromicina por el gen de resistencia a BASTA. El vector de clonación pMDC83 se diseñó para sobreexpresar genes de interés en *Arabidopsis* y para estudiar la localización subcelular de las proteínas que codifican dichos genes. Este vector utiliza la tecnología Gateway, basada en la utilización de un cassette portador del sitio de recombinación att, que permite la transferencia del producto de clonación desde otros vectores, generalmente utilizados para el clonaje en *E. coli*. En nuestro caso, el vector donador fue el pCR8®/GW/TOPO® (comentado anteriormente). El vector pMDC83 está formado por 12513 pb; sus principales características son la presencia de dos genes de resistencia a kanamicina e

higromicina (resistencia utilizada para bacterias y plantas, respectivamente). Nuestro grupo modificó el pMDC83 sustituyendo el gen de resistencia a higromicina por el gen que otorga resistencia al herbicida BASTA en plantas, llamando a este nuevo plásmido pMDC86. Además, pMDC86 al igual que pMDC83 presenta la secuencia de la proteína GFP fusionada a la secuencia de la cola de histidina en el extremo C-terminal. La secuencia codificante de la proteína de interés puede clonarse en fase con la secuencia de la GFP, lo que posibilita la generación de una proteína de fusión en la cual la proteína fluorescente está en posición C-terminal (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Esquema del T-DNA del plásmido pMDC86. Este plásmido deriva del pMDC83 al cual se le sustituyó el gen de resistencia a higromicina por el gen de resistencia a BASTA. Imagen extraída y modificada de Curtis y Grossniklaus, 2003.

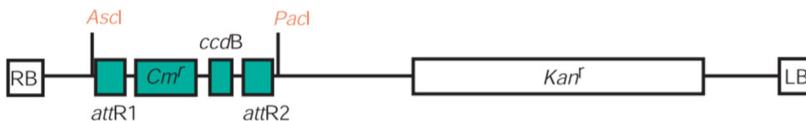
**pMDC83 Pro35S:PSP1-GFP.** Plásmido que se obtuvo en trabajos anteriores por nuestro grupo (Cascales-Miñana et al., 2013). Este vector fue diseñado para que la secuencia del gen *PSP1* estuviera bajo el control del promotor 35S y, además, tuviera en su extremo C-terminal la proteína GFP. Este plásmido se usó como molde para obtener mediante PCR el fragmento que contenía el gen *PSP1*, el promotor 35S y el gen que codifica la GFP junto con el terminador NOS (Apartado 3.7.4).

**pMDC83 Pro35S:PGDH1-GFP.** Plásmido obtenido en trabajos anteriores por nuestro grupo descrito en Toujani et al., (2013a). Este vector se diseñó para expresar la secuencia del gen *PGDH1* bajo el control del promotor 35S. Además, en su extremo C-terminal está unida la proteína GFP. Este plásmido se usó para obtener la construcción génica *ProHS:PGDH1-GFP* (ver Apartado 3.7.2). Además, también se empleó como molde para obtener mediante PCR el fragmento que contenía el gen *PGDH1*, el promotor 35S y el gen que codifica la GFP (ver Apartado 3.7.5).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**pMDC83 *ProHS:PSP1-GFP*.** Plásmido obtenido en trabajos anteriores por nuestro grupo descrito en Cascales-Miñana et al., (2013). Se diseñó para expresar el gen *PSP1* bajo el control el promotor inducible por choque térmico *HS* (*Heat shock*). Este plásmido se usó para la obtención mediante enzimas de restricción del promotor *HS*, un promotor inducible por choque térmico, para generar la construcción génica *ProHS:PGDH1-GFP* (ver Apartado 3.7.2).

**pMDC100.** Plásmido que se usó como aceptor de la construcción *Pro35S:PSP1-GFP* (procedente del vector anteriormente comentado) (Apartado 3.7.4). Es un vector que al igual que el pMDC83 utiliza la tecnología Gateway para la inserción de productos de clonación a partir de otros vectores (Figura 3.5), y lleva dos genes que confieren resistencia a kanamicina, uno para bacterias y otro para plantas. En nuestro caso, no usamos el pMDC100 para la obtención de una construcción con la tecnología Gateway, sino mediante una estrategia con enzimas de restricción (Apartado 3.7.4).



**Figura 3.5.** Esquema del T-DNA del plásmido pMDC100. Imagen extraída de Curtis y Grossniklaus, 2003.

**pMCG1005.** Vector binario para la transformación de maíz mediada por *A. tumefaciens* que contiene cuatro copias del promotor *35S* del virus del mosaico de la coliflor. Bajo el control de los 4 promotores *35S* se encuentra el gen *bar* como agente de selección para plantas que confiere resistencia a BASTA (Char et al., 2017). También contiene un casete del promotor del maíz del gen de la *ubiquitina 1* (Christensen y Quail, 1996) acoplado al primer intrón del gen de la alcohol deshidrogenasa del maíz (*Adh1*) (Callis et al., 1987) y el terminador del gen de la octopina sintasa de *A. tumefaciens* (Koncz et al., 1983). Este plásmido ha sido empleado para la obtención de plantas de maíz sobreexpresoras de *PGDH1* mediante la construcción *ProUbi:PGDH1-GFP* que se clonó en este plásmido.

**pUC18/19.** El pUC18/19 es un plásmido de 2686 pb derivado del plásmido pBR322. En líneas generales, posee una región *lacZ* de clonaje múltiple (pUC18

presenta este sitio de clonaje múltiple en sentido reverso), un sitio de lectura abierto derivado del plásmido pMB1 y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Este plásmido fue utilizado para evaluar la calidad de las células competentes de *E. coli* (Apartado 3.6.1).

### 3.7.2 Obtención de la construcción génica *ProHS:PGDH1-GFP*

El promotor *HS* del gen que codifica la proteína HSP18.2 (At5g59720) es un promotor fuerte inducible por choque térmico en plantas transgénicas (Matsuhara et al., 2000). Para obtener la construcción que tuviera la secuencia codificante del gen *PGDH1* fusionado al gen *GFP*, y que su expresión estuviera controlada por el promotor *HS*, se utilizaron dos plásmidos construidos previamente por nuestro laboratorio [pMDC83 *Pro35S:PGDH1-GFP* descrito en Toujani et al., (2013a) y pMDC83 *ProHS:PSP1-GFP* descrito en Cascales-Miñana et al., (2013)]. Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *PmeI* y *SpeI*, lo que permitió por un lado eliminar el promotor *35S* de la construcción pMDC83 *Pro35S:PGDH1-GFP*, y por otro separar de la construcción pMDC83 *ProHS:PSP1-GFP* un fragmento de 1061 pb que contenía el promotor *HS* (852 pb). Mediante electroforesis se identificaron y separaron los fragmentos de pMDC83 *Pro35S:PGDH1-GFP* sin su promotor y el fragmento de 1061 pb conteniendo el promotor *HS*, se purificaron y se ligaron, dando lugar a la construcción *ProHS:PGDH1-GFP*. La nueva construcción fue secuenciada y posteriormente introducida en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis*.

### 3.7.3 Obtención de la construcción génica *Pro35S:PSAT1-GFP*

La construcción para la obtención de plantas sobreexpresoras del gen *PSAT1* consistió en el clonaje de la parte codificante de dicho gen en el plásmido pMDC86 (obtenido por nuestro grupo; Apartado 3.7.1) para obtener el plásmido pMDC86 *Pro35S:PSAT1-GFP*. El plásmido pMDC86 es similar al pMDC83 (Curtis y Grossniklaus, 2003) salvo por el agente de selección en plantas, que en el pMDC83 proporciona tolerancia a higromicina y en el pMDC86 proporciona tolerancia a BASTA.

El gen *PSAT1* no contiene intrones, por lo que se utilizó el BAC F8D20 para poder amplificar por PCR su región codificante. El producto de PCR resultante, utilizando los cebadores PSAT1+1 For y PSAT1+1270 Rev (Tabla 3.3), se clonó en el plásmido pCR8/GW/TOPO del kit de INVITROGEN *pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit*



(Ref. K2500-20), transformándose posteriormente con dicho plásmido células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Tras comprobar mediante secuenciación que la secuencia de interés no tenía mutaciones, esta región codificante fue subclonada en el plásmido pMDC86, utilizando la tecnología Gateway, la cual está basada en los sitios de recombinación att, usando la enzima recombinasa del kit de INVITROGEN Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> II enzyme mix (Ref. 11791-100). El plásmido pMDC86 es portador de la proteína verde de fusión GFP que se dispone en fase de lectura con el ADN introducido. El plásmido pMDC86 *Pro35S:PSAT1-GFP* generado también fue comprobado por secuenciación, pero en este caso, solamente las regiones de inserción para confirmar que la GFP estuviera en fase de lectura con la región codificante del gen *PSAT1*. Por último, esta construcción se introdujo en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis*.

#### 3.7.4 Obtención de la construcción génica *Pro35S:PSP1-GFP*

Por otro lado, también se diseñó la construcción del gen *PSP1* bajo el control del promotor *35S* y unido al gen que codifica la proteína GFP en el plásmido pMDC100. El plásmido pMDC100 fue elegido para obtener esta construcción por proporcionar tolerancia en plantas a kanamicina, y a pesar de tener sitios de recombinación del sistema Gateway, el clonaje de las secuencias en su interior fue mediante enzimas de restricción.

El fragmento *Pro35S:PSP1-GFP* se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores 2x35S -786 for y T-Nos +322 *Bgl*II Rev (Tabla 3.3) a partir de la construcción previamente obtenida por nuestro grupo pMDC83 *Pro35S:PSP1-GFP* (Cascales-Miñana et al., 2013). Tras comprobar mediante electroforesis con una alícuota de la PCR que el fragmento amplificado tenía el tamaño adecuado y no había bandas inespecíficas, se procedió a purificar el resto de la reacción de la PCR y se digirió con la enzima de restricción *Hind*III, generando un amplicón con un extremo 5' cohesivo *Hind*III y un extremo 3' romo. Por otro lado, el plásmido pMDC100 se digirió con *Hind*III y *Ecl*136II (que genera un extremo romo). De esta forma, mediante purificación de la banda correcta, separada en un gel de electroforesis, conseguimos eliminar en el pMDC100 toda la región que se encuentra entre las regiones de recombinación attR1 y attR2 y reemplazarla por el fragmento *Pro35S:PSP1-GFP*. De esta forma conseguimos obtener un nuevo plásmido, en este caso el pMDC100 que confiere resistencia a Kanamicina en plantas y que lleva el gen *PSP1* bajo el control del promotor *35S* y unido a la GFP

(pMDC100 *Pro35S:PSP1-GFP*). Tras confirmar que los bordes de inserción eran correctos mediante secuenciación, se procedió a introducir este plásmido en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis*.

### 3.7.5 Obtención de la construcción génica de maíz

La construcción para la obtención de plantas de maíz sobreexpresoras del gen *PGDH1* consistió en el clonaje de la parte codificante del gen, unida a la secuencia de la proteína GFP, en el plásmido pMCG1005 (obtenido de la Iowa State University). El fragmento *PGDH1-GFP* se obtuvo a partir del plásmido pMDC83 *Pro35S:PGDH1-GFP* (descrito en Toujani et al., 2013a) mediante PCR utilizando los cebadores EDA9GFP *XbaI* *AvrII* For y EDA9GFP *SpeI* Rev (Tabla 3.4). Tras verificar mediante electroforesis que el fragmento tenía un tamaño aproximado de 2656 pb, el amplicón fue purificado y digerido con la enzima de restricción *SpeI* para generar un fragmento *SpeI* cohesivo por un lado y romo por el otro. Por otro lado, el plásmido pMCG1005 se digirió con *SpeI* y *StuI* (esta última enzima genera un extremo romo) para eliminar el intrón de arroz *Waxy-a*. Tras purificar el fragmento correspondiente al plásmido (13220 pb) este se ligó con el fragmento *PGDH1-GFP* para obtener la construcción pMCG1005 *ProUbi:PGDH1-GFP*. Este plásmido formado confiere resistencia a BASTA en plantas y, tras confirmar que la secuencia introducida en el plásmido era correcta mediante secuenciación, se procedió a enviar dicho plásmido al servicio de transformación de plantas de la Iowa State University para que obtuvieran plantas transformadas de maíz y nos las enviaran.

## 3.8 Transformación genética de *Arabidopsis* y obtención de nuevas líneas

### 3.8.1 Protocolo de transformación de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *Arabidopsis* se transformaron mediante infección del botón floral con *A. tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Para la transformación se sembraron varias macetas, como se indicó en el Apartado 3.2.1.3, y las plantas se cultivaron en invernadero hasta que los tallos florales alcanzaron una altura de unos 15 cm.

El primer paso de la transformación consistió en agregar 1 mL de cultivo saturado de *A. tumefaciens*, que contuviera el vector con el que deseábamos transformar las plantas, a 200 mL de medio LB con tetraciclina (5 µg/mL), gentamicina (25 µg/mL) y Kanamicina (50 µg/mL); la mezcla resultante se incubó en agitación constante (225 rpm) a 28°C durante 12-16 horas. Las células fueron recogidas por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C y resuspendidas posteriormente en 400 mL de la solución de transformación [compuesta por 5% (p/v) de sacarosa, 10 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 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 con las bacterias de *A. tumefaciens*. El tiempo de exposición por maceta fue de 2 minutos, transformándose entre 6 y 12 macetas por cada construcción. Una vez pasado el tiempo de inmersión, las macetas con las plantas fueron introducidas en una bolsa transparente, para mantener durante más tiempo las flores húmedas en la solución bacteriana. Tras un día se hicieron algunas aberturas en las bolsas para que fueran perdiendo la humedad y, por último, al día siguiente se eliminó la bolsa. Varias semanas después de la agroinfiltración las macetas se dejaron de regar para que las plantas se secaran para la recolección de sus semillas.

#### 3.8.2 Obtención de líneas transgénicas homocigotas

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas se sembraron en placas Petri con medio de cultivo MS1/2 suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de las plantas y cefotaxima para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens* (ver Apartado 3.2.1.2). Las semillas sembradas en este medio se estratificaron 3 días a 4°C y posteriormente se colocaron en una cámara durante 2 semanas en condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas que no han introducido el T-DNA, no poseen el gen de resistencia al antibiótico de selección y sufren un retraso en el crecimiento tras la germinación, con escaso desarrollo radicular y cotiledones que no adquieren coloración verde, muriéndose finalmente a los pocos días. Los transformantes resistentes (T1) se trasplantaron a tierra, crecieron en el invernadero y entre 40-50 días después se recogieron sus semillas T2.

Las semillas T2 se sembraron de nuevo en placas de medio MS1/2 suplementado con el antibiótico de selección. Tras un periodo de estratificación de 3 días a 4°C y tras la germinación y crecimiento durante 2 semanas se realizó el

análisis de la segregación. Aquellas líneas que tenían una segregación de 3 resistentes y una sensible para el antibiótico de selección eran las líneas que presentaban únicamente una copia de T-DNA. Estas líneas se seleccionaron para la obtención de la generación T3, trasplantando a tierra entre 15-20 plantas resistentes, y dejándolas crecer en el invernadero para obtener las semillas T3. Para conocer qué plantas eran homocigotas dentro de cada línea, se sembraron unas 100 semillas por planta en placas con MS1/2 suplementado con el agente de selección. Tras la estratificación, germinación y crecimiento se seleccionaron los tubos de semillas que presentaron una segregación de 100% resistentes, que eran los individuos homocigotos para el transgén.

### 3.8.3 Procedimiento para la realización de cruces entre líneas de *Arabidopsis thaliana*

En cualquier investigación en la que se estudien genes, una técnica de uso frecuente es la de realizar cruzamientos para obtener líneas que incorporen varias mutaciones, o líneas mutantes y transgénicas a la vez, u otras con varios transgenes diferentes. En este apartado se describe como se realizan los cruces para el caso de la especie estudiada, ya que dicho procedimiento puede ser algo diferente para otras especies.

Tras sembrar los genotipos a cruzar y dejarlos crecer en condiciones de invernadero se eligieron aquellas plantas con uno o varios escapos florales de unos 15 a 20 cm de altura. Por un lado, se eligió el parental femenino para preparar sus flores para la polinización. En cada inflorescencia se eligieron las dos o tres flores más desarrolladas sin abrir, y utilizando lupas de aumento y pinzas se eliminaron de ellas los sépalos, pétalos y estambres, quedando únicamente los carpelos. Por otro lado, del parental masculino se eligieron flores recién abiertas y se utilizaron sus estambres para la polinización, ya que de esta forma estos tienen el polen en el estadio correcto. Para realizar la polinización fue suficiente con frotar las anteras con los estigmas del parental femenino. Tras unos días se pudo observar en la mayoría de los cruces realizados que los carpelos se transformaban en silicuas pequeñas, que tras su crecimiento y maduración nos proporcionaron las posibles semillas cruzadas.

En caso de que los dos parentales tuvieran agentes de selección, las semillas fueron sembradas en MS1/2 suplementado con el antibiótico o herbicida

correcto (el que proporciona el parental masculino). En caso de que alguno no presentara tolerancia, ese parental fue seleccionado como femenino y las semillas producidas tras el cruce se sembraron en medio MS1/2 suplementado con el agente de selección del parental masculino, para facilitar su identificación.

#### 3.8.4 Obtención de plantas transgénicas condicionales para el gen *PGDH1*

El mutante *pgdh1-2* en homocigosis es letal, mostrando un retraso en el desarrollo embrionario que conduce al aborto de los embriones, por lo que se mantienen en heterocigosis (Toujani et al., 2013a). El alelo mutante *pgdh1-2* proporciona tolerancia a sulfadiazina, así que para asegurarnos de que las plantas a transformar tenían el alelo mutado, hicimos un paso previo antes de sembrarlas en las macetas de 12 cm de diámetro. Este paso consistió en sembrar estas semillas provenientes de una madre heterocigota en medio MS1/2 suplementado con sulfadiazina, y aquellas plantas tolerantes que habían crecido al cabo de 10 días fueron transferidas a dichas macetas. Para poder obtener este mutante en homocigosis, y que fuera viable, se transformaron estas plantas heterocigotas (*PGDH1pgdh1-2*) con la construcción *ProHS:PGDH1-GFP* para generar líneas de mutantes condicionales fértiles al someterlas a choque térmico de 37°C durante una hora al día.

Las semillas obtenidas tras la transformación fueron sembradas en medio MS1/2 suplementado con sulfadiazina, cefotaxima e higromicina y las plantas tolerantes fueron transferidas de forma individual a macetas y puestas en condiciones de invernadero para su crecimiento (plantas T1). En el momento en que empezaron a florecer, fueron sometidas a choques térmicos diarios durante 1 hora a 37°C para que los embriones homocigotos no abortaran, ya que de esta forma se consigue expresar el gen *PGDH1*. Las semillas T2 provenientes de estas plantas se sembraron en un medio de cultivo MS1/2 suplementado con higromicina para poder identificar aquellas líneas que tuvieran 1 inserción (al dar un ratio 3:1 de tolerancia:sensibilidad). Las semillas T2 con una inserción fueron sembradas en medio MS1/2 con sulfadiazina para identificar aquellas que fueran ya homocigotas *pgdh1-2pgdh1-2*. Aproximadamente 15-20 plantas de cada una de estas líneas homocigotas tolerantes a sulfadiazina fueron transferidas de forma individual a macetas para obtener la generación T3 y buscar las homocigotas para el transgén

sembrándolas en higromicina. A estas líneas homocigotas para el transgén y homocigotas para la mutación se las designó como *c-pgdh1-2*.

Durante todo el proceso de obtención de estas líneas se realizaron análisis PCR para comprobar el genotipo de las plantas en relación al alelo mutante *pgdh1-2* (las combinaciones de cebadores se muestran en la Tabla 3.3).

### 3.8.5 Obtención de plantas dobles y triples mutantes para los genes de la familia PGDH

En primer lugar, se generaron los mutantes doble homocigotos *pgdh2-2 pgdh3-2* y *pgdh2-3 pgdh3-1* a partir de los mutantes simples. Para la generación del triple mutante y de otras combinaciones de mutantes se utilizó el doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1* que fue cruzado con las líneas condicionales (*c-pgdh1-2*).

La línea *pgdh2-2* de la colección SALK es tolerante a kanamicina, mientras que la línea *pgdh3-2* de la colección GABI-Kat lo es a la sulfadiazina. Estas tolerancias junto con la PCR diagnóstica para cada mutante (las combinaciones de cebadores para cada gen se muestran en la Tabla 3.3), nos permitieron obtener el doble mutante homocigoto *pgdh2-2 pgdh3-2*.

La línea *pgdh2-3* de la colección SALK tenía silenciada la tolerancia a kanamicina, mientras que la línea *pgdh3-1* de la colección SM “Suppressor-Mutator” presentaba tolerancia a BASTA. En este caso utilizamos como parental masculino la línea tolerante a BASTA y tras el cruzamiento sembramos las semillas en medio MS1/2 suplementado con BASTA para comprobar que el cruce había salido correctamente. Estas plantas tolerantes se pasaron a maceta para obtener la nueva generación de semillas que eran segregantes, y mediante su siembra en BASTA y la realización de PCRs diagnósticas (las combinaciones de cebadores para cada gen se muestran en la Tabla 3.3) nos permitieron identificar el doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1*.

Para la obtención de las diferentes combinaciones de mutantes con las líneas condicionales *c-pgdh1-2* se utilizó el mutante doble obtenido en el paso anterior (*pgdh2-3 pgdh3-1*) y se cruzó con las líneas *c1-pgdh1-2* y *c2-pgdh1-2*. Utilizando las tolerancias a agentes de selección (*pgdh3-1* a BASTA, *pgdh1-2* a sulfadiazina, y la construcción que complementa al mutante anterior a higromicina) y la realización de PCRs diagnósticas (las combinaciones de cebadores para cada gen se muestran en la Tabla 3.3) nos permitieron ir rastreando tras los diferentes

cruces los genotipos para al final obtener los dos nuevos tipos de doble mutantes (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*) y el triple mutante (*c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*).

#### 3.8.6 Obtención de plantas triples sobreexpresoras de los genes de la Ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina

Para la obtención de las líneas triples sobreexpresoras de los tres genes principales de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina (*PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1*) partíamos de plantas sobreexpresoras del gen *PGDH1* ya obtenidas y aisladas previamente, y cuyo agente de selección es el gen de resistencia al antibiótico higromicina (Toujani et al., 2013a). Se diseñaron dos construcciones, como se ha comentado anteriormente, para sobreexpresar los genes que codifican las enzimas PSAT y PSP en *Arabidopsis*. Estas dos enzimas participan en la segunda y en la tercera reacción de la RFBS, respectivamente, como ya se comentó en la introducción, mientras que la enzima PGDH participa en la primera.

Las dos construcciones obtenidas para este propósito en esta tesis doctoral se han diseñado con dos plásmidos distintos (uno para el gen *PSAT1* y otro para el gen *PSP1*), en el que cada uno presenta un agente de selección diferente (BASTA para el plásmido que expresa el transgén que contiene *PSAT1* y kanamicina para el plásmido que expresa el transgén del *PSP1*) y también, a su vez, diferente al agente de selección de las líneas sobreexpresoras de *PGDH1* (higromicina). La presencia de distintos agentes de selección en cada una de las líneas sobreexpresoras permitió obtener más fácilmente las líneas triple sobreexpresoras al poder utilizar la selección por antibióticos durante la germinación de las semillas.

Con cada una de estas construcciones se transformaron dos líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (oexEDA9-L1 y oexEDA9-L2; Toujani et al., 2013a) que en esta tesis fueron renombradas como Oex PGDH1-L1 y Oex PGDH1-L2. Con esta estrategia, y para cada una de las líneas oex PGDH1, se consiguieron por una parte plantas sobreexpresoras para el gen *PSAT1* y *PGDH1*, y por otra, plantas que sobreexpresan *PSP1* y *PGDH1*. A partir de plantas doble sobreexpresoras homocigotas se realizaron cruces hasta conseguir plantas sobreexpresoras homocigotas para los tres transgenes. La identificación de estas líneas homocigotas para cada uno de los tres genes fue posible a los diferentes agentes de selección empleados.

### 3.8.7 Obtención de plantas sobreexpresoras del gen *PGDH1* en maíz

Las semillas de maíz obtenidas a partir de plantas transformadas por la construcción génica *ProUbi:PGDH1-GFP*, procedentes del servicio de transformación de plantas de la Iowa State University, fueron recibidas y se procedió a la identificación y aislamiento de las plantas que presentaran una sola copia del transgén. Estas semillas enviadas estaban rotuladas como T1 y provenían de las plantas transgénicas regeneradas tras la transformación, por lo que si utilizamos la terminología anterior de *Arabidopsis* se corresponderían con la generación segregante T2 (donde ya podemos identificar las líneas que presentan una copia del transgén mediante el ratio 3:1).

Utilizando la terminología de la Iowa State University, se sembraron las semillas T1 para cada línea independiente y tras germinar se realizaron ensayos de tolerancia a BASTA (ver Apartado 3.2.2.1) y PCRs diagnósticas para identificar las plantas transgénicas y las singénicas (ver Tabla 3.4). Con los resultados pudimos establecer la segregación y, por tanto, cuantas inserciones del T-DNA presentaba las plantas progenitoras. Tras este ensayo se identificaron aquellas líneas de una inserción y dentro de ellas las plantas que fueron tolerantes a BASTA y positivas para la PCR (y por lo tanto contienen el transgén de interés; estas plantas podrían ser ya homocigotas o heterocigotas pero por los ensayos realizados no las podíamos distinguir). Estas plantas seleccionadas tras crecer y florecer se autopolinizaron para obtener la siguiente generación de semillas. Una vez obtenidas estas semillas se volvieron a sembrar y a analizar para identificar los lotes de semillas homocigotas (que serían aquellas 100% tolerantes o PCR+ por ser su progenitora homocigota).

Dado que el ciclo de vida del maíz es de entre 4 y 5 meses, durante la realización de esta tesis se han podido obtener algunas líneas homocigotas, pero para algunas otras nuestro grupo sigue haciendo ensayos para obtenerlas. A las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* se las denominó ZmOex PGDH1.



## 3.9 Cuantificación de parámetros morfológicos de las plantas

La caracterización fenotípica de las diferentes líneas obtenidas se realizó tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero (únicamente se caracterizaron las plantas de *Arabidopsis*). Durante la caracterización fenotípica *in vitro* se midió el peso fresco tanto de la parte aérea como de las raíces, así como también la longitud de la raíz principal. En la caracterización fenotípica de las plantas crecidas en invernadero se determinó únicamente el peso fresco de la roseta. Los pesos evaluados se realizaron mediante una balanza OHAUS ANALYTICAL modelo PA124. El tiempo transcurrido entre la escisión del sistema radicular y la pesada de ambos órganos se acortó lo máximo posible para evitar pérdidas de agua que pudieran alterar el resultado final.

Para los análisis *in vitro* se utilizaron placas cuadradas en posición vertical y las plantas se dejaron crecer 14-15 días. El medio de cultivo utilizado en la caracterización fenotípica *in vitro* fue diferente en función del tipo de experimento (ver Apartado 3.2.1.2). En el caso de la determinación de los parámetros en invernadero se cultivaron las plantas de forma individual en macetas cuadradas y se midieron las rosetas a los 30-40 días.

## 3.10 Determinación del contenido en almidón

La recogida del material (de *Arabidopsis* o maíz) para la determinación de su contenido en almidón se realizó coincidiendo con el contenido máximo de almidón (final del día o del período de luz). El material vegetal se trituró en N<sub>2</sub> líquido, se alicuotó en tubos con tapón de rosca de 1,5 mL (entre 40 y 60 mg) y se añadió 1 mL de etanol 80%. Las muestras se mantuvieron en agitación durante 15 min a 80°C y tras este periodo se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (23-24°C). Se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso (1 mL de etanol 80%, agitación a 80°C y centrifugación). Tras eliminar el sobrenadante el precipitado se lavó con 1 mL de agua mQ enfriada a 4°C agitando en un vortex durante 30 segundos, tras lo cual se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante el precipitado se secó durante 30 min en un concentrador de vacío integrado (SpeedVac Eppendorf Concentrator

Plus 5305 con bomba de vacío). En estos momentos los azúcares solubles de la muestra han sido eliminados y el precipitado contiene el almidón.

Para la medida del almidón el precipitado seco fue resuspendido en 0,2 mL de KOH 200 mM mediante agitación en un vórtex, e incubado durante 1 hora a 95°C. En caso de que el precipitado no se hubiera resuspendido totalmente en el primer paso, las muestras se agitaron durante el periodo de incubación a 95°C reiteradamente hasta su resuspensión total. Tras este periodo se añadió ácido acético 1M hasta alcanzar un pH próximo a 5 (aproximadamente 40,8 µL) y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Una vez que teníamos el almidón resuspendido y con el pH en torno a 5 se realizó el ensayo enzimático para su cuantificación utilizando el kit Enzytec™ Starch (Ref. E1268, R-Biopharm) con algunas modificaciones en las instrucciones del fabricante. Este ensayo de determinación del almidón se basa en que el almidón se hidroliza en D-glucosa a pH 4,6 en presencia de la enzima amiloglicosidasa (AGS). La D-glucosa formada se determinó con la ayuda de las enzimas hexoquinasa y glucosa 6P deshidrogenasa (Glu-6P-DH) a pH 7,6. La D-glucosa es fosforilada dando lugar a Glucosa 6P por la acción de la hexoquinasa. En presencia de Glu-6P-DH, la Glucosa 6P se oxida por el NADP en D-gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH. La cantidad de NADPH formada es estequiométricamente igual a la cantidad de D-glucosa formada por la hidrólisis del almidón. El NADPH se determinó por su absorción a 340 nm. El protocolo utilizado consistió en alicuotar 8,6 µL de la muestra en un tubo con tapón de rosca de 1,5 mL y se añadieron 17,3 µL del reactivo AGS (en el caso del blanco de reacción se utilizaron 25 µL de agua mQ). Tras mezclar, la muestra se incubó durante unas 12-16 horas a 55°C. Tras este periodo se adicionaron 87 µL de la solución 1 (que contiene NADP y ATP) y 87 µL de agua mQ. Tras mezclar se dejó reposar la mezcla durante 3 min y se realizó una medida de absorbancia a 340 nm. Tras esta primera medida se adicionaron 1,5 µL de la mezcla de Hexoquinasa y Glu-6P-DH, se mezcló, se mantuvo la reacción durante 15 min a temperatura ambiente y, por último, se volvió a medir la absorbancia a 340 nm. Las medidas se realizaron por triplicado para cada muestra. Utilizando los factores de dilución y la ley de Lambert Beer se calculó la concentración de almidón por gramo de peso fresco de la muestra.

## 3.11 Determinación del contenido de proteínas totales

El material vegetal (*Arabidopsis* o maíz) se trituró con N<sub>2</sub> líquido, se alicuotó en tubos de 1,5 mL (unos 50 mg) y se añadieron 0,5 mL de HCl 0,1 M. Las muestras se agitaron durante 30 segundos con un vórtex y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperaron 100 µL del sobrenadante en un nuevo tubo y las proteínas fueron precipitadas por la adición de 25 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 100% mientras se mantuvo la mezcla en hielo durante 15 min. Las proteínas formaron un precipitado al centrifugarse los tubos en las mismas condiciones anteriormente indicadas. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se lavó con 200 µL de TCA al 1% y se volvieron a centrifugar los tubos en las mismas condiciones. Tras eliminar el sobrenadante se hizo un segundo paso de lavado con 400 µL de etanol absoluto y, tras centrifugar y eliminar el sobrenadante el precipitado se dejó secar. Una vez seco el precipitado se resuspendió con NaOH 0,1 M. En función del material el volumen de resuspensión fue diferente: para parte aérea de *Arabidopsis* 200 µL, para raíces de *Arabidopsis* 100 µL, para hojas o tallos de maíz 100 µL y para raíces de maíz 50 µL.

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.

## 3.12 Análisis por western blot

El Western blot que se presenta en el apartado de resultados fue realizado por el Dr. Armand Anoman (antiguo miembro de nuestro laboratorio) tal y como se describe en Casatejada-Anchel et al., (2021). No obstante, se considera que este experimento es necesario incluirlo en esta tesis para integrarlo con el resto de resultados obtenidos por mí, tal como se hizo en el artículo anteriormente citado y en el que soy primer autor.

## 3.13 Análisis del perfil metabolómico

Para la determinación metabolómica se utilizaron plántulas de 15 días de edad cultivadas *in vitro*. Las plantas se recogieron después de 8 horas de exposición a la luz. Se muestrearon por separado la parte aérea y las raíces, que fueron utilizadas para determinar el contenido de metabolitos en extractos derivatizados

en metanol por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) utilizando el protocolo descrito por Lisec et al., (2006) con algunas modificaciones (ver Figura 3.6). En función de las líneas a analizar, las condiciones de crecimiento pudieron variar (las condiciones exactas se indicarán en los apartados específicos de resultados).

### 3.13.1 Extracción de los metabolitos

El material vegetal se recogió, se congeló rápidamente en N<sub>2</sub> líquido para detener los procesos metabólicos y se guardó a -80°C hasta su procesado. Para realizar la extracción de los metabolitos, el material se trituró en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y se repartió en alícuotas de aproximadamente 50 mg en tubos de 1,5 mL con tapón de rosca, anotando el peso exacto del material alícuotado para posteriormente realizar los cálculos en función del peso. A cada tubo se le añadieron 0,46 mL de metanol (Merck, cat. N° 1.06007.1000) y 20 µL de ribitol (0,2 mg/mL; Sigma, cat. no. 488-81-3). El metanol permite detener todas las reacciones celulares y el ribitol se utilizó como control interno para la fase polar, ya que no está presente de forma natural en las muestras a analizar. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 30 segundos y se incubaron durante 15 min a 70°C con agitación a 650 rpm en un agitador térmico (Eppendorf Thermomixer confort). Para evitar el exceso de presión durante este tratamiento los tubos se abrían y tapaban cada 2 min. Tras la incubación se centrifugaron los tubos durante 10 min a 14000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL. A cada tubo se le añadieron 0,25 mL de cloroformo (Merck, cat. N° 1.02444.1000) y 0,5 mL de agua mQ, mezclándose en un vórtex durante 15 segundos. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 15 min a 4000 rpm y se transfirieron 0,15 mL de la fase superior (fase polar) a dos tubos de 1,5 mL. Las muestras se secaron en el concentrador de vacío integrado a temperatura ambiente y antes de cerrar los tubos se introdujo en ellos N<sub>2</sub> gaseoso (este paso se realiza para evitar la oxidación de las muestras y que no se produzcan reacciones indeseadas por la presencia de contaminantes en el aire). Finalmente, los tubos se almacenaron a -80°C hasta la derivatización de las muestras (Figura 3.6). Por cada línea y tratamiento se realizaron 6 réplicas biológicas.

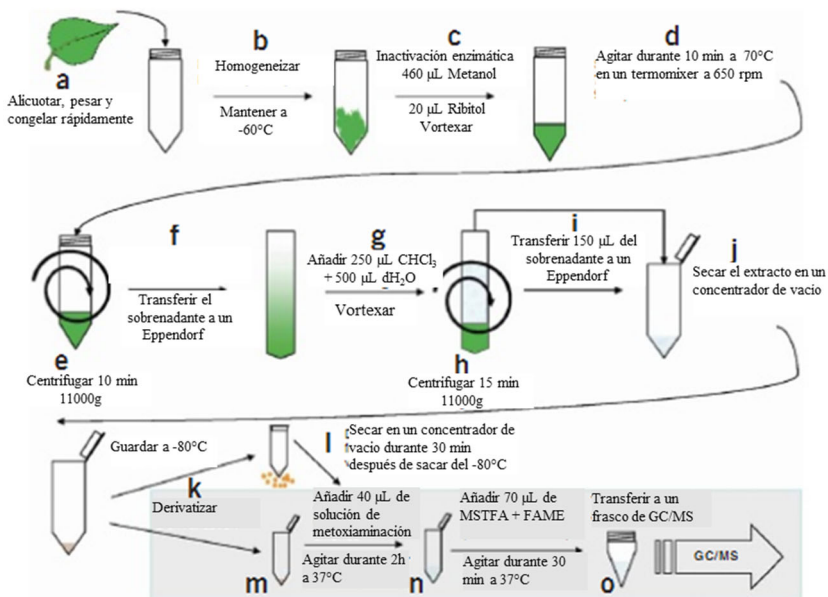
### 3.13.2 Derivatización

Este apartado fue realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Alisdair Fernie (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Alemania) por un miembro de nuestro equipo, la Dra. Rosa-Téllez. De las muestras

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

almacenadas en el paso anterior teníamos dos replicas técnicas, pero solamente una fue enviada al laboratorio del Dr. A. Fernie, la otra se conservó como reserva.

Antes de proceder a la derivatización, las muestras se volvieron a secar en un concentrador de vacío durante 30 min. Se preparó una solución de metoxiaminación [20 mg/mL de hidrocloreto de metoxiamina (Merck, Sigma, cat. no. 593-56-6) en piridina pura (Merck, cat. no. 110-86-1)]. Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de esta solución de metoxiaminación 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  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). Se añadieron 35  $\mu\text{L}$  de la mezcla a las muestras que se volvieron a incubar a 37°C durante 30 min con agitación continua (900 rpm). Finalmente se transfirió todo el volumen de cada muestra a un frasco de cristal y se procedió al análisis por GC-MS (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Protocolo modificado de preparación de los extractos para los análisis metabolómicos. La extracción de los metabolitos (a-j) se realizó en nuestro laboratorio, la derivatización y la cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) (k-o) se realizaron en el laboratorio del Doctor Alisdair Fernie en Alemania. MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos. Esquema modificado de Lisec et al., (2006).

### 3.14 Análisis de la actividad fotosintética

Los análisis de actividad fotosintética se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Sergio González Nebauer (catedrático en la Universidad Politécnica de Valencia) tal y como se describen en Casatejada-Anchel et al., (2021). Las plantas utilizadas para estos análisis crecieron en macetas bajo condiciones de invernadero durante 30 días. Las medidas se llevaron a cabo 2 horas después del comienzo del periodo de luz para permitir unas medidas correctas de fotosíntesis.

### 3.15 Tratamiento estadístico de los resultados

Los valores experimentales indicados en este trabajo representan las medias aritméticas y el error estándar de los resultados, que posteriormente fueron evaluados mediante contrastes de hipótesis, ajustando las variables respuesta a un modelo lineal.

Para los análisis de los experimentos genéticos (obtención de las plantas homocigotas de una inserción) se utilizó el test Chi-Cuadrado (Zar, 1996), que permite poder verificar si los valores de plántulas tolerantes y sensibles a los agentes de selección estaban de acuerdo con las proporciones mendelianas o, por el contrario, si se desviaban de estas. El p-valor utilizado como nivel de significación fue menor de 0,05, que nos permite asumir que valores superiores a este valor indican que las diferencias observadas no son suficientemente significativas como para rechazar la hipótesis nula, y por tanto aceptar que las proporciones observadas se ajustan a los valores esperados de segregación.

Las comparaciones de las medias de los experimentos que enfrentaban al grupo control con las diferentes líneas mutantes y/o tratamientos fueron realizadas utilizando el tratamiento estadístico t-Student (T-test) mediante el programa Microsoft Excel 2016. El nivel de significación fijado, fue como en el caso del Chi-Cuadrado, el de un p-valor menor a 0,05, asumiendo diferencias significativas entre las medias cuando los valores de significación fueron menores a este valor umbral.

Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas mediante el análisis ANOVA de un factor y una prueba post hoc posterior (Tukey's b o Games-Howell en función de que las varianzas fueran iguales o diferentes,

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

respectivamente) con el programa IBM SPSS Statistics. El nivel de significación se fijó de nuevo en el 5% ( $p < 0,05$ ).

Los análisis filogenéticos y de evolución molecular se realizaron con la versión X de MEGA (Kumar et al., 2018). El análisis basado en la expresión génica se realizó utilizando la herramienta expressolog tree viewer de bioanalytical resource for plant biology (Patel et al., 2012). El análisis de expresión y co-expresión de 2 genes se realizó con datos transcriptómicos de repositorios públicos utilizando la herramienta Genevestigator (<https://genevestigator.com/>; Hruz et al., 2008). Por último, las interacciones de los genes de la RFBS se obtuvieron utilizando la herramienta GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010).

Para el análisis de componentes principales (PCA) se utilizó la aplicación de la web MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>).





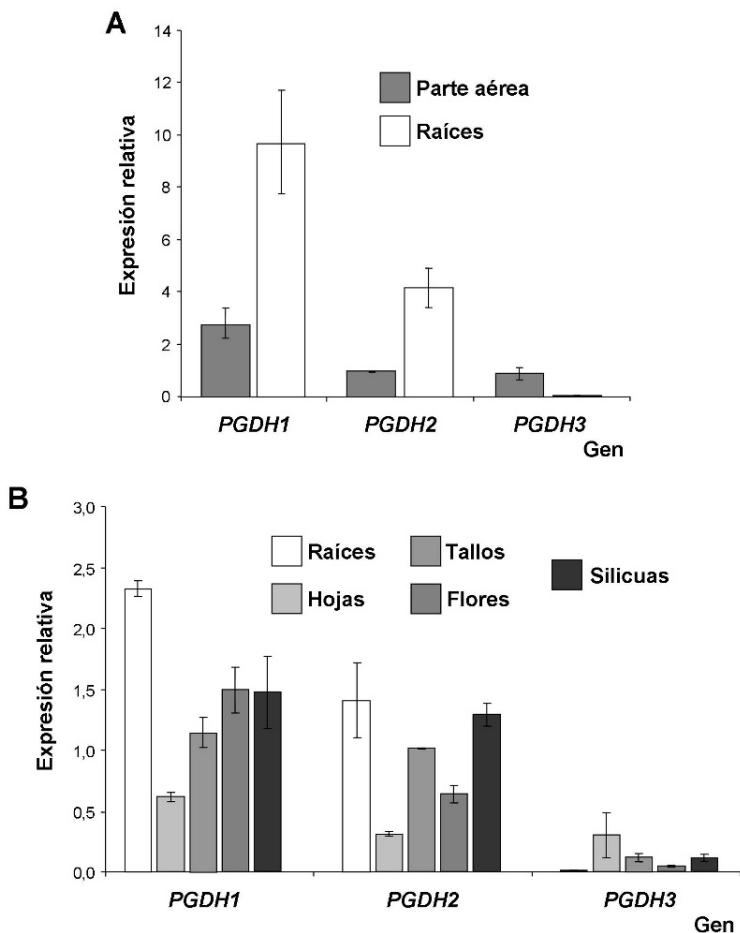
## 4. RESULTADOS



### 4.1 Análisis de los mutantes de los genes *PGDH1*, *PGDH2* y *PGDH3*

El análisis del nivel de expresión de los genes de la familia *PGDH*, mediante qRT-PCR, mostró que *PGDH1* es el gen que mayor expresión presenta de los tres, tanto en plántulas como en estados más avanzados de desarrollo, seguido de *PGDH2* (Figura 4.1). Tanto *PGDH1* como *PGDH2* se expresan principalmente en las raíces de plántulas y de planta adulta, pero también se expresan en silicuas, flores, meristemos y hojas. Sin embargo, *PGDH3* se expresa exclusivamente en los tejidos de la parte aérea de la planta, principalmente en las hojas, siendo casi indetectable en raíces, tal y como ya han confirmado otros estudios de expresión génica (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013a). De acuerdo con la herramienta Genevestigator, *PGDH1* tiene unos niveles altos de expresión en las primeras fases del desarrollo (durante la germinación y en el estadio de plántula) y, aunque su expresión disminuye, se mantiene durante todas las fases del ciclo de la planta. El gen *PGDH2*, por el contrario, tiene una tendencia opuesta aumentando progresivamente la expresión desde la fase de plántula hasta las fases de desarrollo más tardías (cuando la planta desarrolla flores y silicuas). Por último, la expresión de *PGDH3*, es mayor en las etapas maduras que coinciden con la plena capacidad fotosintética de la planta y se expresa menos en las etapas tempranas y tardías del desarrollo.

En estudios previos, la caracterización de las líneas silenciadas del gen *PGDH1*, mostraron que dichas plantas presentan una fuerte reducción del crecimiento primario de la raíz (Benstein et al., 2013), un fenotipo también observado en los mutantes condicionales del gen *PSP1* (*c-psp1-1*), el único gen que codifica para la última enzima de la RFBS (Cascales-Miñana et al., 2013). En este caso anterior se tuvieron que crear estos mutantes condicionales para poder estudiar su fenotipo, ya que el mutante *knockout* de ese gen es letal. El mutante condicional *c-psp1-1* es una línea transgénica *knockout* para el gen *PSP1*, a la cual se le ha introducido un transgén que contiene el cDNA del gen *PSP1* bajo el control del promotor *HS* (Cascales-Miñana et al., 2013). Este mutante presenta niveles bajos de expresión del gen *PSP1* en condiciones no inducibles, lo que lo hace viable y, por tanto, adecuado para estudiar la función de *PSP1* durante el desarrollo vegetativo de la planta (Anoman et al., 2019; Cascales-Miñana et al., 2013).

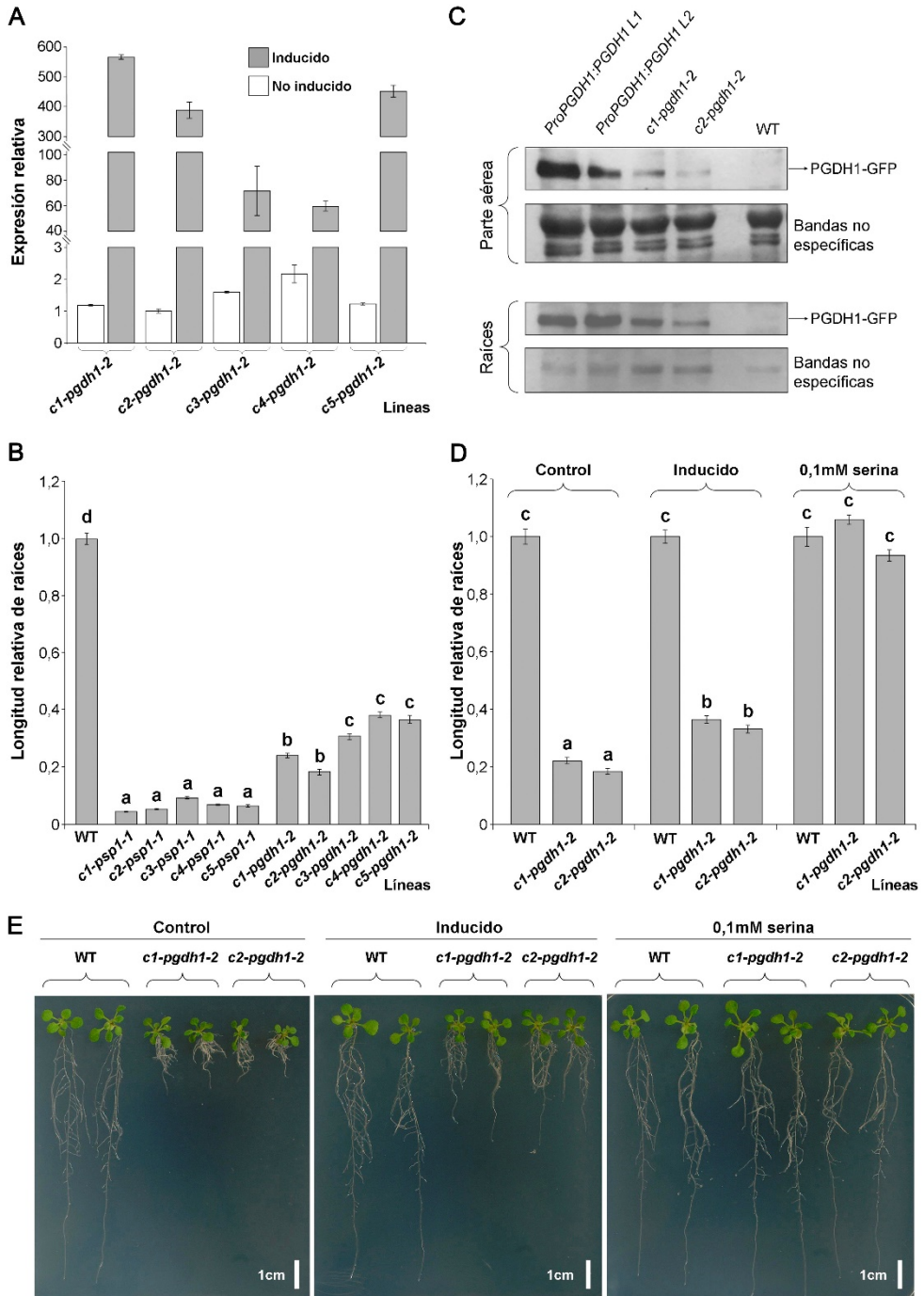


**Figura 4.1.** Cuantificación de la expresión relativa de los genes de la familia *PGDH*. (A) Análisis qRT-PCR de los genes *PGDH* en parte aérea y raíces en plantas crecidas en placa durante 15 días. (B) Análisis de la expresión relativa en diferentes órganos de plantas adultas crecidas en condiciones de invernadero durante 40 días. Los valores (media  $\pm$  SE;  $n = 3$  replicas biológicas independientes) están normalizados respecto a la expresión de *PGDH2* en la parte aérea (A) o tallos (B).

Para poder estudiar plantas con expresión reducida del gen *PGDH1*, ya que el mutante *knockout* también es letal, diseñamos el mutante *c-pgdh1-2* a partir de mutantes *knockout* de *PGDH1* (*pgdh1-2*) al que les introdujimos una construcción que contiene el cDNA de *PGDH1* bajo el control del promotor *HS* (el mismo promotor usado para las líneas *c-psp1-1*; ver Apartado 3.8.4 de Materiales y

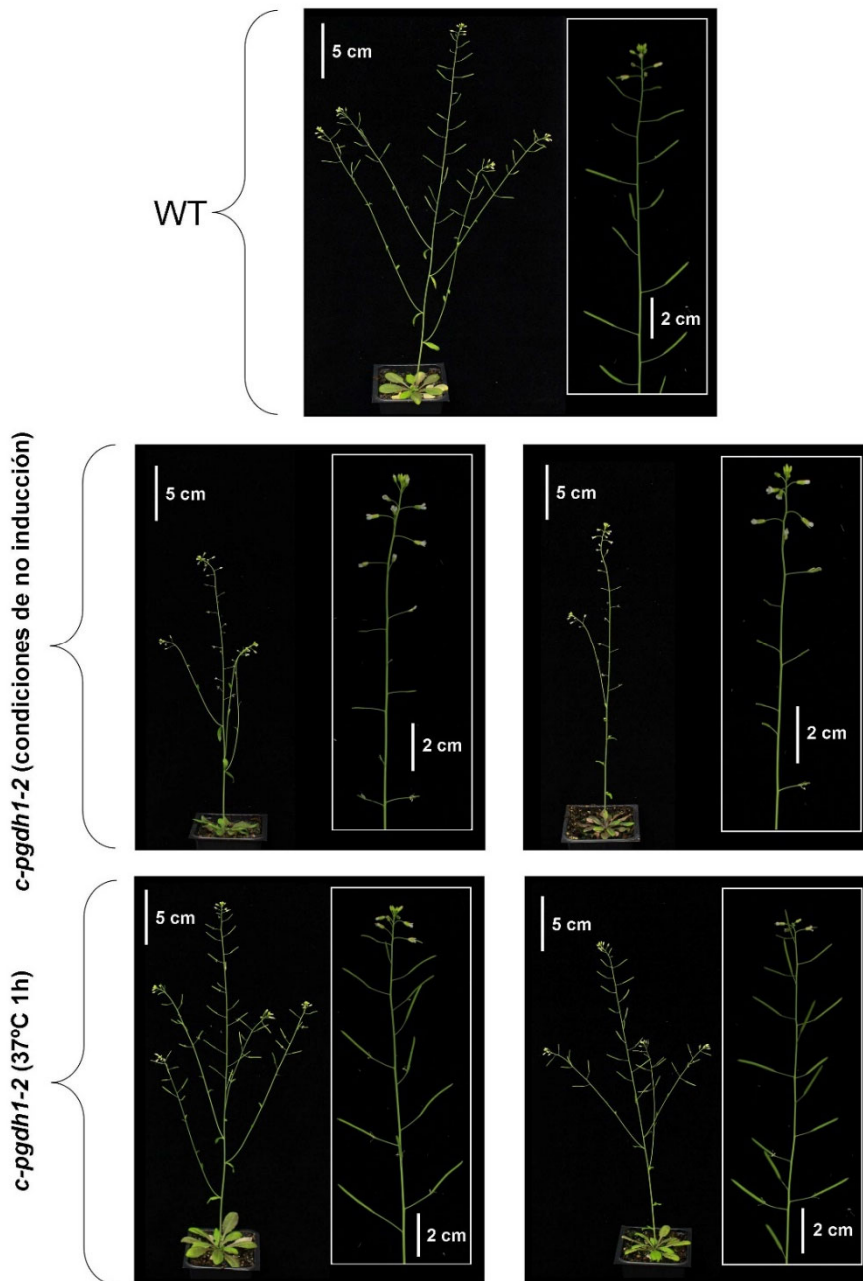
Métodos). Obtuvimos 5 líneas condicionales *c-pgdh1-2* con diferentes niveles de expresión de *PGDH1* (Figura 4.2A). Cuando germinamos y crecimos las cinco líneas en placas de cultivo bajo condiciones de cultivo no inducibles, todas las líneas presentaron una reducción del crecimiento primario de la raíz, el fenotipo más característico de las líneas deficientes en la RFBS (Benstein et al., 2013; Cascales-Miñana et al., 2013) (Figura 4.2B y E). Al compararlas con las líneas condiciones para el gen *PSP* (Cascales-Miñana et al., 2013) se observó que la reducción del crecimiento de las raíces en las líneas *c-psp1-1* era mucho más drástica que en los mutantes *c-pgdh1-2* (Figura 4.2B). Dos de las líneas *c-pgdh1-2* (*c1-pgdh1-2* y *c2-pgdh1-2*) que presentaban una mayor reducción del crecimiento primario de la raíz (Figura 4.2B) junto con unos bajos niveles de expresión del gen *PGDH1* (Figura 4.2A), fueron seleccionadas para posteriores análisis. Las líneas *c1-pgdh1-2* y *c2-pgdh1-2* mostraron niveles basales de proteína *PGDH1* más bajos que los controles que expresaban *PGDH1* bajo el control del promotor nativo (*ProPGDH1:PGDH1*) (Figura 4.2C). Estas líneas recuperaron el crecimiento de la raíz tanto en condiciones inducibles bajo choque térmico, como por la suplementación de serina al medio de cultivo (Figura 4.2D y E). En estado adulto, *c1-pgdh1-2* y *c2-pgdh1-2* fueron estériles cuando las condiciones no eran inductivas, otro fenotipo asociado por la deficiencia de la RFBS, mientras que la fertilidad de estas líneas se rescató induciendo el gen *PGDH1* bajo condiciones inducibles (Figura 4.3).

Para estudiar más a fondo el efecto de los genes *PSP1* y *PGDH1* en el desarrollo vegetativo de la planta se compararon las dos líneas de *c-pgdh1-2* (*c1-pgdh1-2*, *c2-pgdh1-2*) y *c-psp1-1* (*c1-psp1-1* y *c2-psp1-1*) que presentaban el fenotipo más drástico (Figura 4.4). Además del crecimiento reducido de la raíz primaria, las líneas *c-pgdh1-2* también mostraron una reducción del peso fresco de la raíz, mientras que las líneas *c-psp1-1* se vieron afectadas tanto en el peso fresco de las raíces como en el de la parte aérea en comparación con los controles (Figura 4.4B y C). El crecimiento de las líneas mutantes condicionales en el invernadero mostró que el peso fresco de la roseta también presentaba una disminución mucho mayor en las líneas *c-psp1-1* que en las *c-pgdh1-2* cuando fueron comparadas con el control. Estos resultados demuestran que el fenotipo de las líneas *c-psp1-1* es mucho más drástico que en las líneas *c-pgdh1-2* (Figura 4.4D), y, por tanto, sugieren que los genes *PGDH2* y *PGDH3* podrían contribuir al crecimiento de la planta en los mutantes condicionales *c-pgdh1-2*.



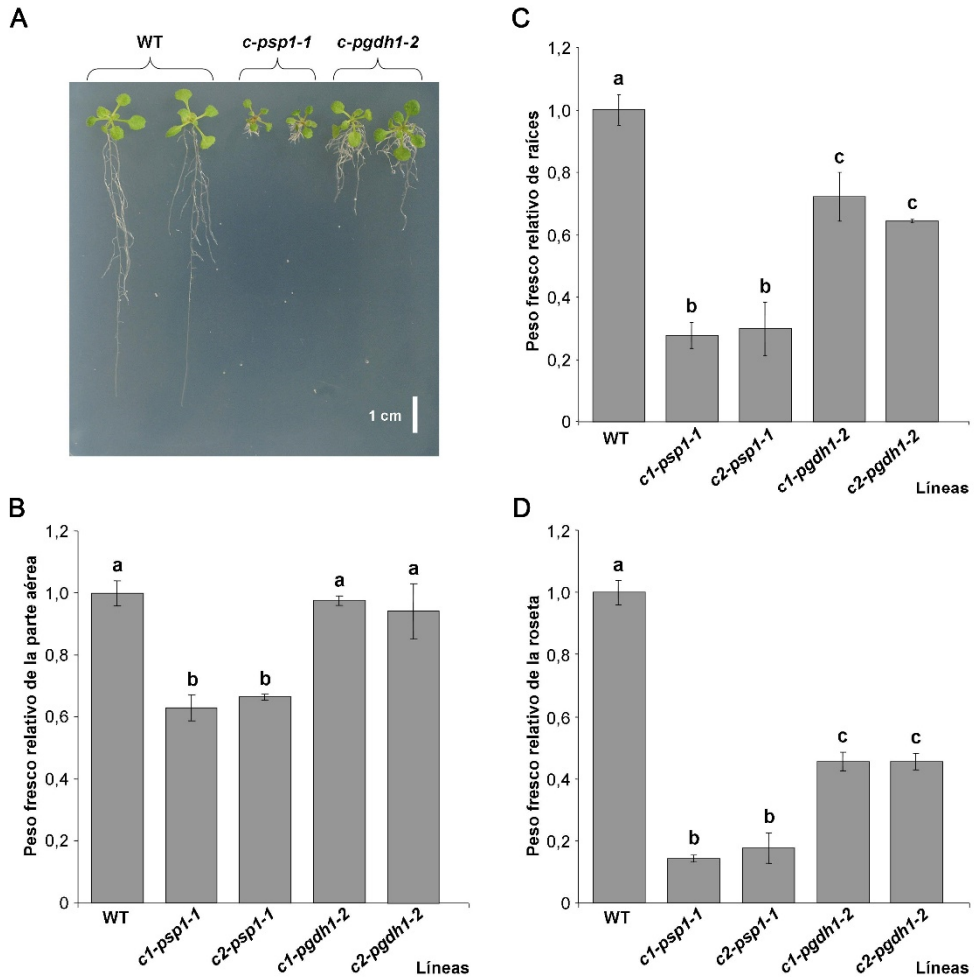
**Figura 4.2.** Caracterización fenotípica y molecular de los mutantes condicionales de los genes *PGDH1* y *PSP1* (*c-pgdh1-2* y *c-psp1-1*) de plantas crecidas en placa (durante 13 días). (A) Análisis de la expresión de *PGDH1* por qRT-PCR en cinco líneas transgénicas homocigotas antes y después de la inducción del gen *PGDH1* por choque térmico. Los valores de *PGDH1* fueron normalizados respecto al valor más bajo de la línea *c2-pgdh1-2*. (B) Longitud relativa de la raíz primaria de las líneas *c-pgdh1-2* y *c-psp1-1* crecidas en placa. (C) Análisis por Western blot que muestra la expresión de la proteína de fusión PGDH1-GFP en parte aérea y raíces de la línea control (WT) y en los mutantes *pgdh1* complementados con la construcción *PGDH-GFP* bajo el control del promotor de choque térmico *HS* (*c1-pgdh1-2*, *c2-pgdh1-2*) o bajo el control del promotor del gen *PGDH1* (*ProPGDH1:PGDH1 L1*, *ProPGDH1:PGDH1 L2*). Las plantas fueron crecidas bajo condiciones de inducción o de no inducción. La señal de una banda no específica se muestra como control de carga de las muestras. (D) Longitud relativa de la raíz primaria de líneas *c-pgdh1-2* bajo condiciones de inducción o en presencia de 0,1 mM de serina en el medio de cultivo. (E) Foto representativa de plantas crecidas bajo condiciones de inducción o en presencia de 0,1 mM de serina en el medio de cultivo. Los datos de caracterización fenotípica (paneles A, B o D) son la media  $\pm$  SE ( $n \geq 60$  plantas), y las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Para estudiar más en detalle la contribución de los genes *PGDH2* y *PGDH3* al crecimiento vegetativo de la planta se comparó el crecimiento, tanto en placa como en invernadero, de mutantes simples de *PGDH2* (*pgdh2-2*, *pgdh2-3*), de *PGDH3* (*pgdh3-1*, *pgdh3-2*) y de mutantes dobles de *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-2 pgdh3-2*, *pgdh2-3 pgdh3-1*). No se observó un fenotipo de reducción del crecimiento diferente en los mutantes simples *pgdh2-2* y *pgdh2-3* respecto a las plantas control cuando fueron crecidas en placas de cultivo, mientras que los mutantes *pgdh3-1* y *pgdh3-2* mostraron una reducción del crecimiento de la parte aérea del 15-25% respecto a los controles (Figura 4.5A-E). Sin embargo, en las combinaciones de mutantes dobles de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-2 pgdh3-2*, *pgdh2-3 pgdh3-1*) no se observaron fenotipos más drásticos que con los mutantes simples. De hecho, cuanto más fuerte es el fenotipo del alelo mutante *PGDH3*, más débil es el fenotipo del doble mutante. Solo una combinación de los mutantes dobles (*pgdh2-3 pgdh3-1*) mostró un peso fresco de la parte aérea más bajo que el control (Figura 4.5B). En condiciones de invernadero, hubo una reducción general del peso fresco de la roseta tanto de los mutantes simples como en los dobles ensayados, alrededor de un 20-30%, comparado con la línea control (Figura 4.5E). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre los mutantes simples respecto a los dobles en ninguno de los parámetros analizados, ni en placa ni en maceta (Figura 4.5), lo que sugiere que, a pesar de tener un patrón de expresión diferente, *PGDH2* y *PGDH3*, no tienen un efecto aditivo en el crecimiento de la planta.

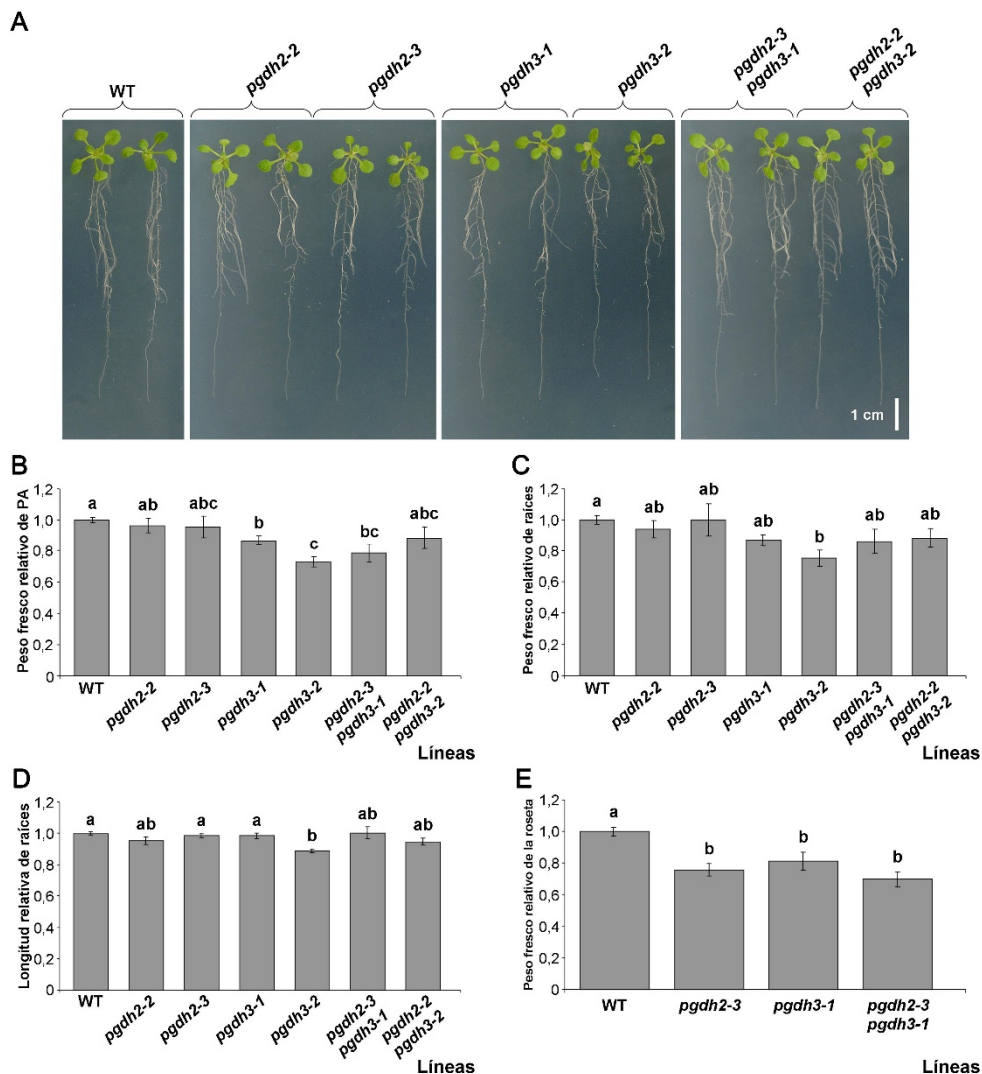


**Figura 4.3.** Fotografías de plantas silvestres (WT) y de plantas mutantes condicionales para el gen *PGDH1* (*c-pgdh1-2*) crecidas en invernadero bajo condiciones de no inducción o inducción a 37°C durante 1 hora cada día.





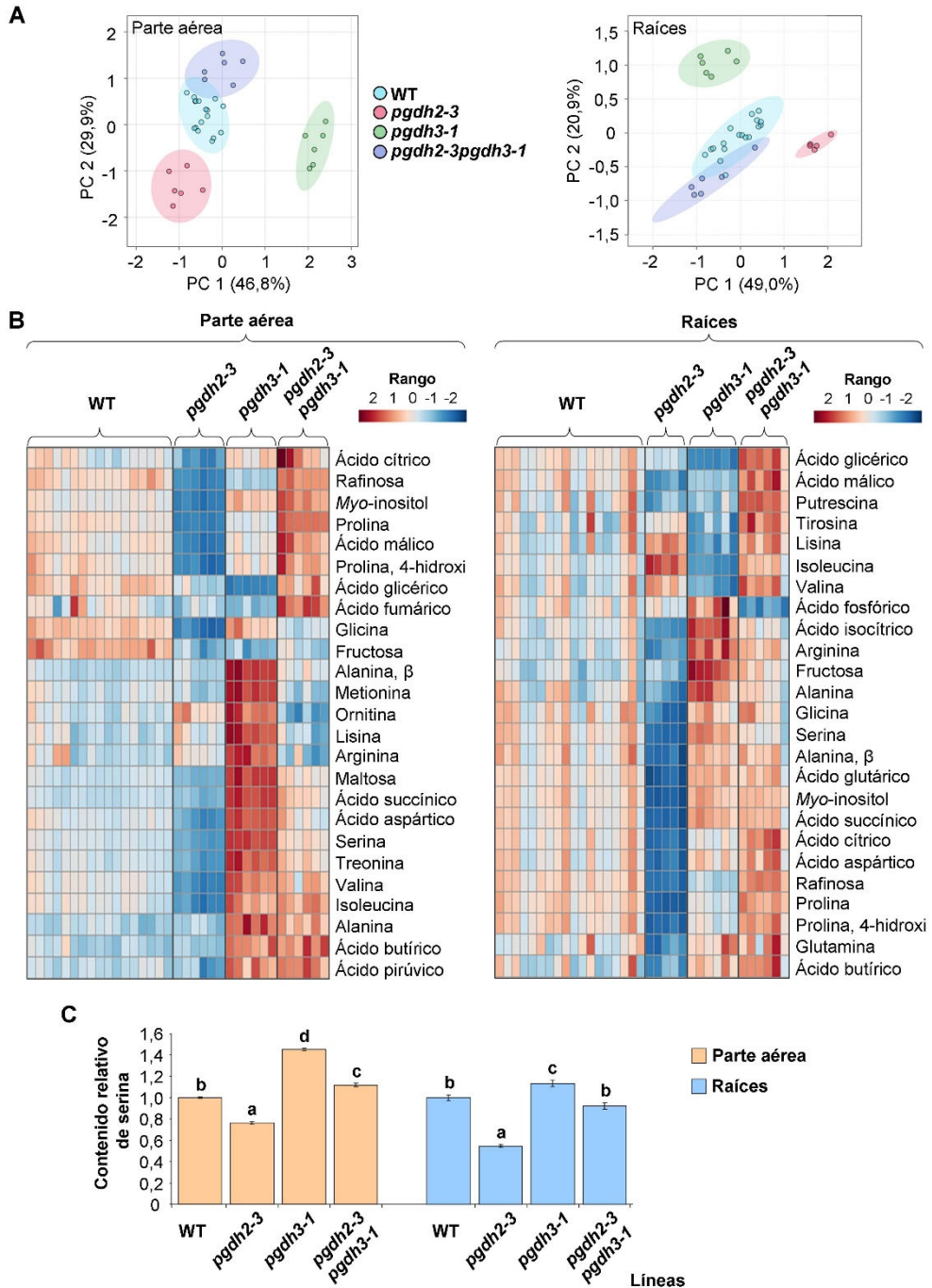
**Figura 4.4.** Comparación de los mutantes condicionales *PGDH1* (*c-pgdh1-2*) y *PSP1* (*c-pszp1-1*) crecidos en placa (durante 17 días) o en condiciones de invernadero (durante 46 días). (A) fotografía representativa de cada línea crecidas en placa. (B, C) peso fresco de la parte aérea y de las raíces de las líneas *c1-pszp1-1*, *c2-pszp1-1*, *c1-pgdh1-2*, *c2-pgdh1-2* y el control (WT) de plantas crecidas en placa. (D) peso fresco de la roseta de plantas adultas (de los mismos genotipos utilizados en B y C) crecidas en invernadero. Los valores representados son la media  $\pm$  SE ( $n \geq 100$  plantas) y están normalizados respecto a la media calculada para el WT. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



**Figura 4.5.** Caracterización fenotípica de los mutantes simples y dobles de *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-2*, *pgdh2-3*, *pgdh3-1*, *pgdh3-2*, *pgdh2-3 pgdh3-1* y *pgdh2-2 pgdh3-2*) crecidos en placa (durante 15 días) o en condiciones de invernadero (durante 46 días). (A) fotografía representativa de cada línea crecidas en placa. (B, C) peso fresco de la parte aérea (PA) y raíces de mutantes simples, dobles y línea silvestre (WT) crecidos en placa. (D) longitud de la raíz primaria de las líneas crecidas en placa. (E) peso fresco de la roseta de plantas adultas crecidas en condiciones de invernadero. Los valores representados son la media  $\pm$  SE ( $n \geq 100$  plantas) y están normalizados respecto a la media calculada para el WT. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

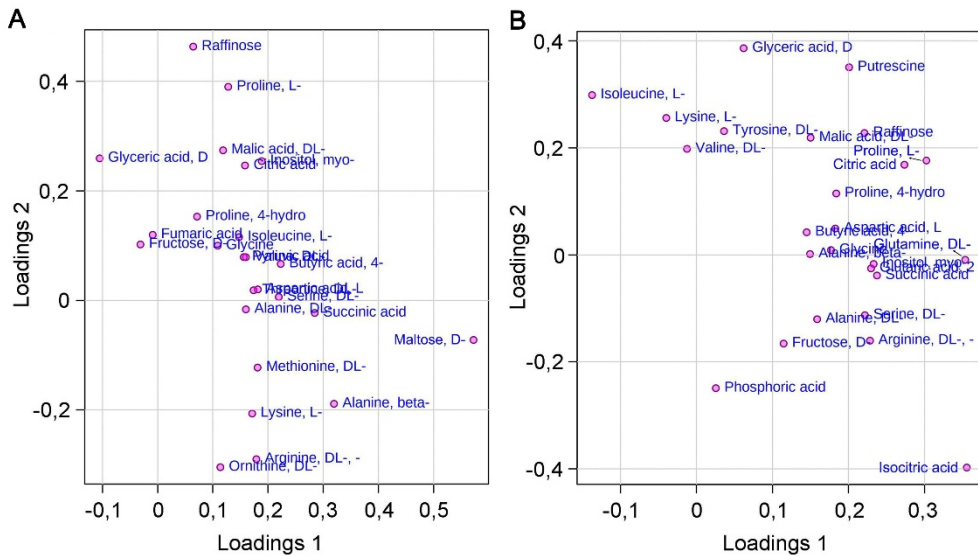
Tras esta caracterización fenotípica el siguiente paso fue realizar un estudio metabolómico en los mutantes de los genes *PGDH*. Para ello seleccionamos el doble mutante que mostraba una reducción significativa del peso de la parte aérea en comparación con el WT (*pgdh2-3 pgdh3-1*), así como también los mutantes simples que tienen los alelos del doble mutante seleccionado. Según el PCA el perfil metabolómico de los mutantes simples *pgdh2-3* y *pgdh3-1* fue diferente tanto en las raíces como en la parte aérea y no se solapaban con el perfil de la línea WT (Figura 4.6A). En la parte aérea, aquellos metabolitos que mejor explicaban las diferencias entre *pgdh2-3* y *pgdh3-1* fueron el ácido glicérico y la maltosa (Figura 4.7A). Los niveles de ácido glicérico se redujeron un 50% en el mutante *pgdh3-1* en comparación con el WT, siendo el valor más bajo de las líneas ensayadas. La maltosa, sin embargo, se incrementó notablemente en este mutante un 128%, mientras que se redujo en el mutante *pgdh2-3* (Tabla 4.1). Por otro lado, en las raíces los metabolitos que mejor explicaban las diferencias entre los dos mutantes simples corresponden a la isoleucina, lisina, glutamina y ácido isocítrico (Figura 4.7B), que mostraron tendencias opuestas (los dos primeros compuestos tenían mayores niveles en el mutante *pgdh2-3* y los dos últimos mayores niveles en el mutante *pgdh3-1*; Tabla 4.2). De todos estos resultados cabe remarcar que los niveles de ácido glicérico fueron de nuevo más bajos en el mutante *pgdh3-1* que en el resto de las líneas ensayadas (Tabla 4.2).

El perfil metabólico del doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1*, también fue diferente respecto a los mutantes simples. Sin embargo, en este caso, estaba parcialmente solapado con el perfil del WT tanto en la parte aérea como en raíces (Figura 4.6A). De hecho, en el doble mutante varios metabolitos mostraron un valor intermedio en comparación con los mutantes simples, tal y como se visualiza en la Figura 4.6B y en las Tablas 4.1 y 4.2. Un claro ejemplo es el metabolito serina, que se redujo en el mutante *pgdh2-3*, se incrementó en el mutante *pgdh3-1*, y en el doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1* presentaba un valor intermedio respecto a los valores del WT (Figura 4.6C y Tablas 4.1 y 4.2). Otros metabolitos de la parte aérea en el doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1* como el ácido glicérico, lisina, arginina y metionina mostraban niveles similares al WT. Además, metabolitos como la ornitina, la prolina y la rafinosa mostraron una tendencia opuesta a la de los mutantes simples (Figura 4.6B y Tabla 4.1). En raíces, la isoleucina y el ácido isocítrico presentaban unos niveles similares al WT, mientras que otros, como el ácido glicérico y la putrescina, mostraron una tendencia opuesta a la de los mutantes simples (Figura 4.6B y Tabla 4.2).



## 4. RESULTADOS

**Figura 4.6.** Perfil metabólico de los mutantes simples y dobles de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, y *pgdh2-3 pgdh3-1*). (A) Análisis de los componentes principales (PCA) del perfil metabólico de las líneas mutantes en la parte aérea y en las raíces. Los datos del análisis de la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) se evaluaron utilizando el PCA con los dos primeros componentes que representan al menos el 70% de la varianza metabólica total. Los valores entre paréntesis indican la contribución relativa de cada componente a la varianza total observada en el conjunto de datos. (B) Cambios más relevantes en el contenido de metabolitos de la parte aérea y raíces de los mutantes *PGDH* en comparación con la línea silvestre (WT). Los valores del contenido relativo de los metabolitos están representados como un mapa de calor, siendo el color rojo mayor contenido respecto al WT y azul menor contenido respecto al WT. (C) Contenido relativo de serina en las diferentes líneas mutantes *PGDH*. Los valores representan la media  $\pm$  SE,  $n \geq 5$  pools de 40 plantas. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Los resultados más detallados se presentan en las Tablas 4.1 y 4.2.



**Figura 4.7.** Metabolitos que explican las diferencias entre los mutantes simples y dobles de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, y *pgdh2-3 pgdh3-1*) en parte aérea (A) y raíces (B) de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

**Tabla 4.1.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de los mutantes simples y doble de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, *pgdh2-3 pgdh3-1*) comparados con la línea silvestre (WT). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media  $\pm$  SE de al menos 6 determinaciones independientes). Las letras indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Metabolito	WT	<i>pgdh2-3</i>	<i>pgdh3-1</i>	<i>pgdh2-3 pgdh3-1</i>
<b>Aminoácidos</b>				
Ácido aspártico	1 $\pm$ 0,01 b	0,76 $\pm$ 0,02 a	1,33 $\pm$ 0,01 c	1,05 $\pm$ 0,04 b
Alanina	1 $\pm$ 0,02 a	0,98 $\pm$ 0,02 a	1,41 $\pm$ 0,03 c	1,25 $\pm$ 0,03 b
Alanina, $\beta$	1 $\pm$ 0,02 a	1,00 $\pm$ 0,04 a	1,86 $\pm$ 0,04 c	1,16 $\pm$ 0,04 b
Arginina	1 $\pm$ 0,04 ab	1,10 $\pm$ 0,04 b	1,59 $\pm$ 0,05 c	0,84 $\pm$ 0,09 a
Glicina	1 $\pm$ 0,01 c	0,55 $\pm$ 0,02 a	1,03 $\pm$ 0,03 c	0,83 $\pm$ 0,02 b
Isoleucina	1 $\pm$ 0,01 b	0,74 $\pm$ 0,02 a	1,20 $\pm$ 0,03 c	1,20 $\pm$ 0,02 c
Lisina	1 $\pm$ 0,03 a	1,08 $\pm$ 0,05 a	1,52 $\pm$ 0,04 b	0,95 $\pm$ 0,06 a
Metionina	1 $\pm$ 0,02 a	0,90 $\pm$ 0,03 a	1,45 $\pm$ 0,03 b	0,92 $\pm$ 0,04 a
Ornitina	1 $\pm$ 0,03 b	1,22 $\pm$ 0,05 c	1,48 $\pm$ 0,05 d	0,77 $\pm$ 0,05 a
Prolina	1 $\pm$ 0,02 c	0,42 $\pm$ 0,01 a	0,90 $\pm$ 0,01 b	1,37 $\pm$ 0,02 d
Prolina 4-hidroxilada	1 $\pm$ 0,01 b	0,73 $\pm$ 0,01 a	0,98 $\pm$ 0,02 b	1,11 $\pm$ 0,03 c
Serina	1 $\pm$ 0,01 b	0,76 $\pm$ 0,01 a	1,45 $\pm$ 0,01 d	1,12 $\pm$ 0,02 c
Treonina	1 $\pm$ 0,01 b	0,81 $\pm$ 0,02 a	1,34 $\pm$ 0,02 d	1,11 $\pm$ 0,02 c
Valina	1 $\pm$ 0,01 b	0,74 $\pm$ 0,02 a	1,25 $\pm$ 0,02 d	1,12 $\pm$ 0,04 c
<b>Ácidos orgánicos</b>				
Ácido butírico, 4-amino-	1 $\pm$ 0,02 a	0,94 $\pm$ 0,02 a	1,48 $\pm$ 0,04 b	1,51 $\pm$ 0,06 b
Ácido cítrico	1 $\pm$ 0,03 b	0,65 $\pm$ 0,04 a	1,10 $\pm$ 0,03 b	1,34 $\pm$ 0,11 b
Ácido fumárico	1 $\pm$ 0,02 b	0,94 $\pm$ 0,02 ab	0,90 $\pm$ 0,01 a	1,15 $\pm$ 0,02 c
Ácido glicérico	1 $\pm$ 0,02 c	0,78 $\pm$ 0,04 b	0,51 $\pm$ 0,01 a	1,06 $\pm$ 0,05 c
Ácido málico	1 $\pm$ 0,02 b	0,55 $\pm$ 0,02 a	0,96 $\pm$ 0,02 b	1,22 $\pm$ 0,06 c
Ácido pirúvico	1 $\pm$ 0,02 b	0,88 $\pm$ 0,04 a	1,29 $\pm$ 0,04 c	1,31 $\pm$ 0,03 c
Ácido succínico	1 $\pm$ 0,01 b	0,83 $\pm$ 0,02 a	1,65 $\pm$ 0,02 d	1,25 $\pm$ 0,04 c
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>				
Fructosa	1 $\pm$ 0,01 b	0,76 $\pm$ 0,03 a	0,76 $\pm$ 0,02 a	0,83 $\pm$ 0,03 a
Maltosa	1 $\pm$ 0,02 b	0,57 $\pm$ 0,02 a	2,28 $\pm$ 0,05 d	1,32 $\pm$ 0,06 c
Myo-inositol	1 $\pm$ 0,01 b	0,54 $\pm$ 0,02 a	1,15 $\pm$ 0,02 c	1,31 $\pm$ 0,04 d
Rafinosa	1 $\pm$ 0,02 c	0,32 $\pm$ 0,02 a	0,65 $\pm$ 0,02 b	1,25 $\pm$ 0,03 d

#### 4. RESULTADOS

**Tabla 4.2.** Niveles de metabolitos en raíces de los mutantes simples y doble de los genes *PGDH2* y *PGDH3* (*pgdh2-3*, *pgdh3-1*, y *pgdh2-3 pgdh3-1*) comparados con la línea silvestre (WT). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media  $\pm$  SE de al menos 5 determinaciones independientes). Las letras indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Metabolito	WT	<i>pgdh2-3</i>	<i>pgdh3-1</i>	<i>pgdh2-3 pgdh3-1</i>
<b>Aminoácidos</b>				
Ácido Aspártico	1 $\pm$ 0,02 b	0,69 $\pm$ 0,02 a	1,03 $\pm$ 0,02 b	1,10 $\pm$ 0,04 b
Alanina	1 $\pm$ 0,04 b	0,77 $\pm$ 0,04 a	1,21 $\pm$ 0,05 c	1,02 $\pm$ 0,03 b
Alanina, $\beta$	1 $\pm$ 0,02 b	0,72 $\pm$ 0,01 a	1,04 $\pm$ 0,02 b	1,03 $\pm$ 0,03 b
Arginina	1 $\pm$ 0,02 b	0,75 $\pm$ 0,03 a	1,39 $\pm$ 0,05 d	1,17 $\pm$ 0,04 c
Glicina	1 $\pm$ 0,03 b	0,67 $\pm$ 0,03 a	1,04 $\pm$ 0,03 b	1,03 $\pm$ 0,05 b
Glutamina	1 $\pm$ 0,06 b	0,43 $\pm$ 0,06 a	1,24 $\pm$ 0,09 b	1,27 $\pm$ 0,13 b
Isoleucina	1 $\pm$ 0,02 b	1,35 $\pm$ 0,04 d	0,70 $\pm$ 0,02 a	1,13 $\pm$ 0,04 c
Lisina	1 $\pm$ 0,03 b	1,19 $\pm$ 0,02 c	0,80 $\pm$ 0,03 a	1,16 $\pm$ 0,04 c
Prolina	1 $\pm$ 0,02 c	0,31 $\pm$ 0,01 a	0,84 $\pm$ 0,02 b	1,14 $\pm$ 0,03 d
Prolina 4-hidroxilada	1 $\pm$ 0,02 b	0,62 $\pm$ 0,01 a	0,92 $\pm$ 0,02 b	1,10 $\pm$ 0,03 c
Serina	1 $\pm$ 0,03 b	0,55 $\pm$ 0,01 a	1,13 $\pm$ 0,03 c	0,92 $\pm$ 0,03 b
Tirosina	1 $\pm$ 0,03 b	1,03 $\pm$ 0,01 b	0,84 $\pm$ 0,04 a	1,19 $\pm$ 0,04 c
Valina	1 $\pm$ 0,02 b	1,09 $\pm$ 0,03 bc	0,84 $\pm$ 0,02 a	1,13 $\pm$ 0,04 c
<b>Ácidos orgánicos</b>				
Ácido butírico, 4-amino-	1 $\pm$ 0,02 b	0,84 $\pm$ 0,03 a	1,09 $\pm$ 0,03 bc	1,16 $\pm$ 0,04 c
Ácido cítrico	1 $\pm$ 0,03 b	0,49 $\pm$ 0,02 a	0,94 $\pm$ 0,02 b	1,22 $\pm$ 0,05 c
Ácido glicérico	1 $\pm$ 0,02 c	0,86 $\pm$ 0,02 b	0,61 $\pm$ 0,01 a	1,22 $\pm$ 0,04 d
Ácido glutárico, 2-oxo	1 $\pm$ 0,02 b	0,56 $\pm$ 0,02 a	1,09 $\pm$ 0,02 c	1,06 $\pm$ 0,04 bc
Ácido isocítrico	1 $\pm$ 0,04 b	0,50 $\pm$ 0,02 a	1,62 $\pm$ 0,07 c	1,03 $\pm$ 0,07 b
Ácido málico	1 $\pm$ 0,02 c	0,71 $\pm$ 0,02 a	0,83 $\pm$ 0,01 b	1,17 $\pm$ 0,04 d
Ácido succínico	1 $\pm$ 0,02 b	0,56 $\pm$ 0,01 a	1,13 $\pm$ 0,02 c	1,08 $\pm$ 0,03 bc
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>				
Fructosa	1 $\pm$ 0,02 a	0,94 $\pm$ 0,03 a	1,33 $\pm$ 0,03 c	1,10 $\pm$ 0,03 b
<i>Myo</i> -inositol	1 $\pm$ 0,02 b	0,54 $\pm$ 0,01 a	1,08 $\pm$ 0,02 b	1,07 $\pm$ 0,01 b
Rafinosa	1 $\pm$ 0,02 c	0,50 $\pm$ 0,01 a	0,79 $\pm$ 0,02 b	1,16 $\pm$ 0,03 d
<b>Varios</b>				
Ácido fosfórico	1 $\pm$ 0,02 bc	0,97 $\pm$ 0,03 b	1,20 $\pm$ 0,06 c	0,73 $\pm$ 0,02 a
Putrescina	1 $\pm$ 0,05 c	0,70 $\pm$ 0,05 a	0,78 $\pm$ 0,05 b	1,31 $\pm$ 0,04 d

## 4.2 Caracterización fenotípica y metabolómica de los dobles y triples mutantes de la familia PGDH

Para llegar a un conocimiento mayor de la función de los genes de la familia *PGDH* obtuvimos combinaciones de dobles y triples mutantes de los tres genes de la familia (*PGDH1*, *PGDH2* y *PGDH3*) bajo el fondo genético del mutante condicional *c-pgdh1-2*. Obtuvimos dos líneas independientes con fenotipos similares para cada combinación (*c1-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c1-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c1-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*; *c2-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c2-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c2-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*). Los datos de caracterización fenotípica representados en las Figuras 4.8B-D y 4.9B muestran la media de las dos líneas indicadas (*c1* y *c2*) con la nomenclatura siguiente: *c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*.

Las diferentes combinaciones de dobles y triples mutantes condicionales tenían un fenotipo muy drástico de crecimiento en invernadero, en ocasiones morían antes de florecer y producir semillas, y en otras ocasiones la producción era muy limitada. Debido a esto, para el mantenimiento de estas líneas nos apoyamos en líneas dobles y triples homocigotas para el transgén y para los alelos *pgdh2-3* y *pgdh3-1*, mientras que para el alelo mutante del gen *PGDH1* estas líneas eran heterocigotas (*PGDH1pgdh1-2*). A partir de estas plantas heterocigotas para el gen *PGDH1* obteníamos semillas, tras choques térmicos diarios, que eran segregantes para este gen, encontrándose entre ellas las cuádruples homocigotas. Estas se identificaban por su tamaño y por PCR, mostrando siempre que, para cada línea doble o triple, la planta que tenía los dos alelos mutados para el gen *PGDH1* en homocigosis era mucho más pequeña que las que presentaban las combinaciones *PGDH1PGDH1* o *PGDH1pgdh1-2* (este fenotipo enano era inconfundible por sus raíces cortas).

Para la caracterización *in vitro*, las semillas se sembraron en placas cuadradas con medio MS1/5 suplementado con 0,5% de sacarosa, que se colocaron en posición vertical. Después de 7 días de cultivo en una cámara de crecimiento a 22°C, se seleccionaron las plantas que presentaban el fenotipo de raíz corta (dentro de cada línea) y fueron trasplantadas a nuevas placas con el mismo medio junto con la línea WT, para ser posteriormente incubadas hasta los 15-16 días. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo se midió el peso de la parte aérea y la longitud de las raíces, así como también su peso.



También se realizó un experimento de caracterización fenotípica bajo condiciones de invernadero. Al igual que la realizada *in vitro*, las plantas crecidas en invernadero fueron genotipadas para detectar las líneas dobles o triples mutantes homocigotas para todos los genes implicados. Mediante genotipación, se correlacionó que aquellas plantas que presentaban un menor tamaño de roseta eran homocigotas para el genotipo deseado. Puesto que las plantas triples mutantes homocigotas presentaban un crecimiento muy mermado y no eran capaces de desarrollar tallo, después de 24 días de crecimiento en invernadero, se midió el peso fresco de la roseta de todas las líneas.

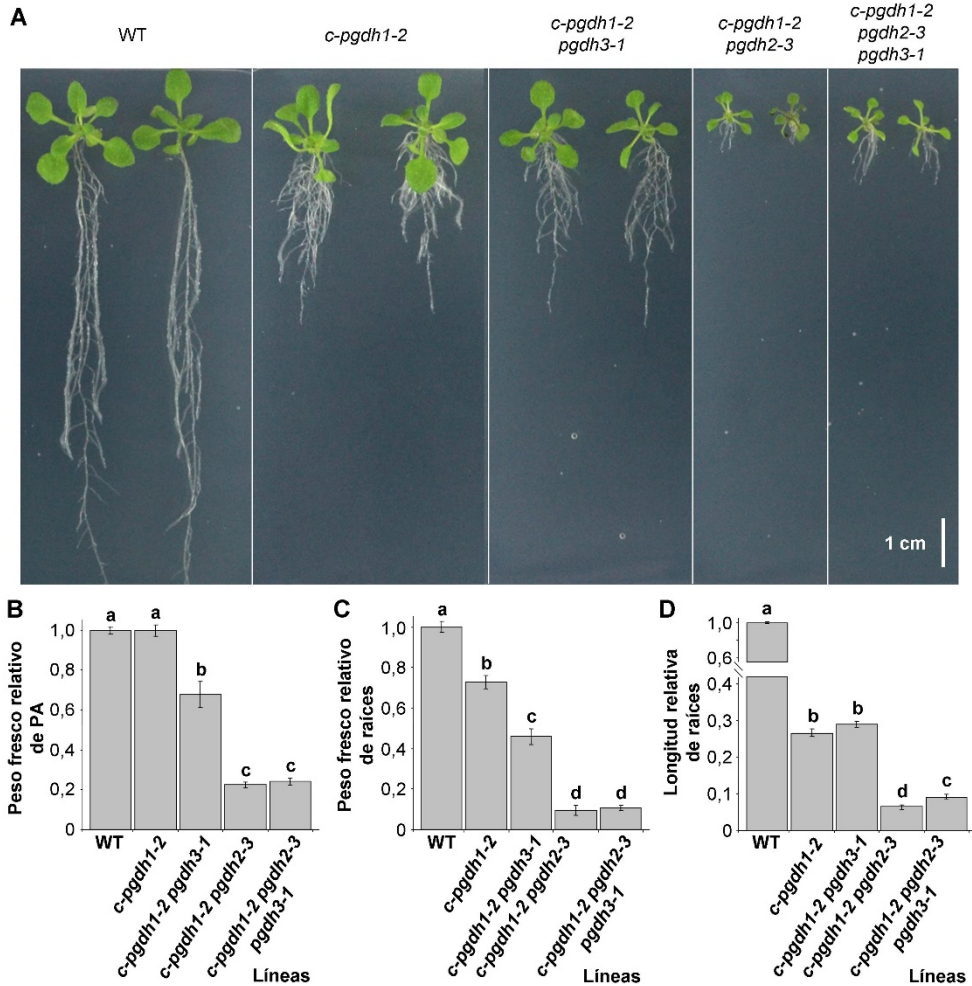
Al realizar el análisis fenotípico de los dobles y triples mutantes *PGDH* pudimos comprobar que tanto *PGDH2* como *PGDH3* tienen un efecto en el crecimiento de las plantas bajo el fondo genético del mutante *c-pgdh1-2*, que las hace más pequeñas que los mutantes simples condicionales *c-pgdh1-2*. Al contrario de lo que se observó bajo un fondo genético silvestre (Figura 4.5), este efecto de reducción fue mucho mayor para el doble mutante del gen *PGDH2* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*) que para el del *PGDH3* (*c-pgdh1-2 pgdh3-1*), en todos los parámetros estudiados (Figuras 4.8 y 4.9). En condiciones *in vitro*, los mutantes *c-pgdh1-2 pgdh2-3* desarrollaron el fenotipo más drástico, siendo semejante a las líneas *c-psp1-1* (Figura 4.4A y 4.8A). En comparación con *c-pgdh1-2 pgdh2-3*, las líneas *c-pgdh1-2 pgdh3-1* presentaron una reducción del crecimiento mucho más débil en el peso fresco de la parte aérea y de la raíz (Figura 4.8B y C). En relación a estos parámetros de crecimiento, el triple mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* no fue significativamente más pequeño que el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* ni en parte aérea ni en raíces (Figura 4.8A-C). Además, el crecimiento de la raíz primaria se vio más afectado en el mutante doble *c-pgdh1-2 pgdh2-3* que en el mutante triple *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* (Figura 4.8A y D), sugiriendo que la mutación de *PGDH3* tiene un efecto positivo en el crecimiento de la raíz primaria cuando los genes *PGDH1* y *PGDH2* también están mutados.

Al realizar los análisis de caracterización fenotípica bajo condiciones de invernadero, el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y el mutante condicional *c-pgdh1-2* fueron los que presentaban un tamaño mayor entre las líneas mutantes, sin embargo, el mutante *c-pgdh1-2* fue más grande que el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh3-1*. Por otro lado, el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* y el triple mutante fueron los que presentaban un fenotipo más drástico, con un tamaño mucho más pequeño que las demás líneas. En este caso, al igual que con los resultados

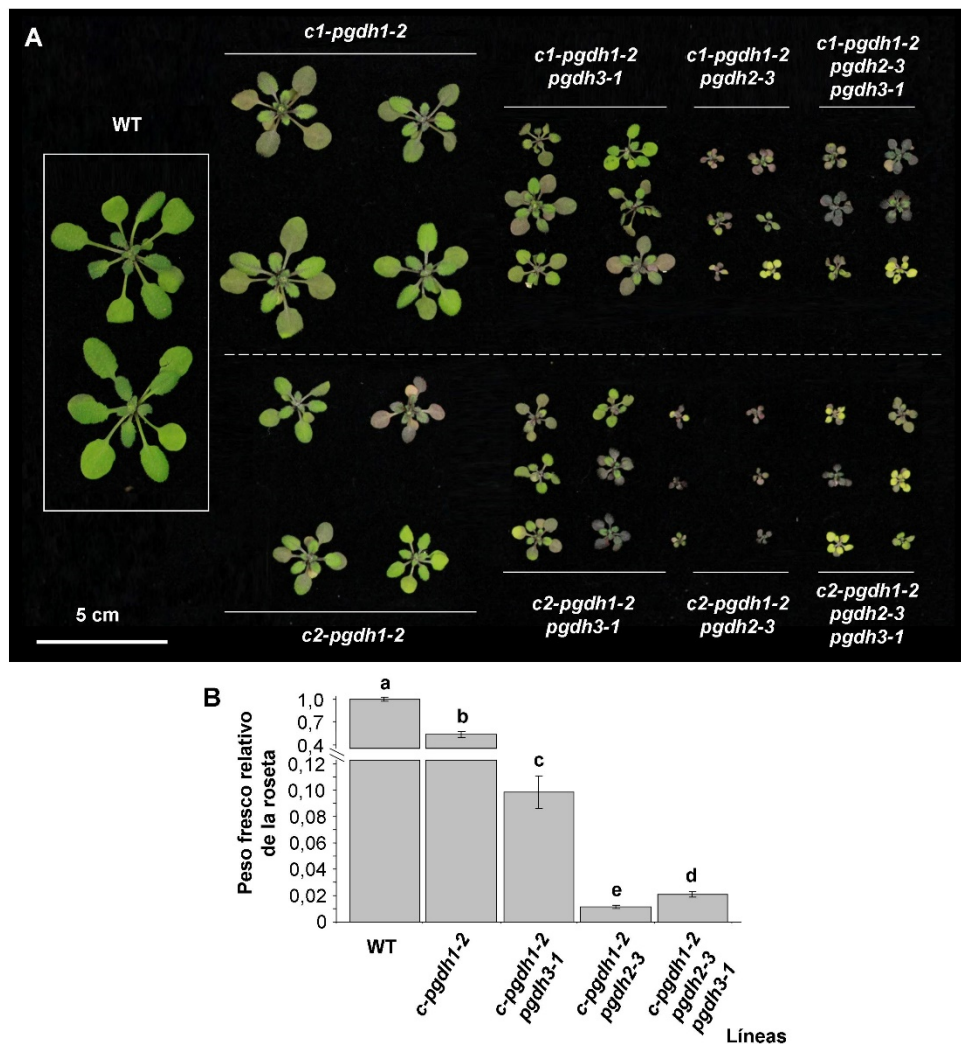
obtenidos *in vitro*, el triple mutante fue ligeramente más grande que el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3*, confirmando el efecto positivo de la mutación en el gen *PGDH3* sobre el crecimiento de la planta (Figura 4.9A y B).

El PCA del perfil metabolómico de los dobles y triples mutantes indicaba que *c-pgdh1-2 pgdh2-3* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* estaban separados respecto a las otras líneas, sobre todo en raíces (Figura 4.10A). Curiosamente, en la parte aérea, el triple mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* tenía un perfil más próximo al WT que el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* (Figura 4.10A). En raíces, sin embargo, el perfil del doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* y el triple mutante fueron muy similares, resultado que está de acuerdo con los bajos niveles de expresión del gen *PGDH3* en este órgano (Figuras 4.1B y 4.10A). Al representar los cambios de los metabolitos en un mapa de calor, se observa que el mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* es la línea donde se produjeron los cambios más drásticos en comparación con el WT, especialmente en la parte aérea (Figura 4.10B y Tablas 4.3 y 4.4).

En general, hubo un incremento de los niveles de metabolitos en los dobles y triples mutantes en la parte aérea. Los metabolitos que mejor explicaban esas diferencias, según el PCA, entre los dobles y triples mutantes en la parte aérea fueron la asparagina, glutamina, glicina y trehalosa (Figura 4.11A). De entre todos los metabolitos analizados, los valores más elevados se encontraron en el mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* y correspondieron a los de la asparagina y glutamina (Tabla 4.3). Estos elevados valores y otros niveles altos del resto de aminoácidos analizados se atenuaron en el mutante triple *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* cuando se compararon con los valores del mutante doble *c-pgdh1-2 pgdh2-3*, especialmente los de glutamina (Figura 4.10B y Tabla 4.3). Los niveles de trehalosa aumentaron en todos los mutantes excepto en el mutante *c-pgdh1-2 pgdh3-1* en el que se redujeron. La mutación en el gen *PGDH3* redujo los niveles de ácido glicérico tanto en el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh3-1* como en el triple *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* en comparación con las otras líneas mutantes donde el gen *PGDH3* era funcional (Tabla 4.3), parecido a lo que ocurría con el mutante simple *pgdh3-1* cuyos valores también eran más bajos cuando se compararon con el resto de mutantes analizados (Tabla 4.1).

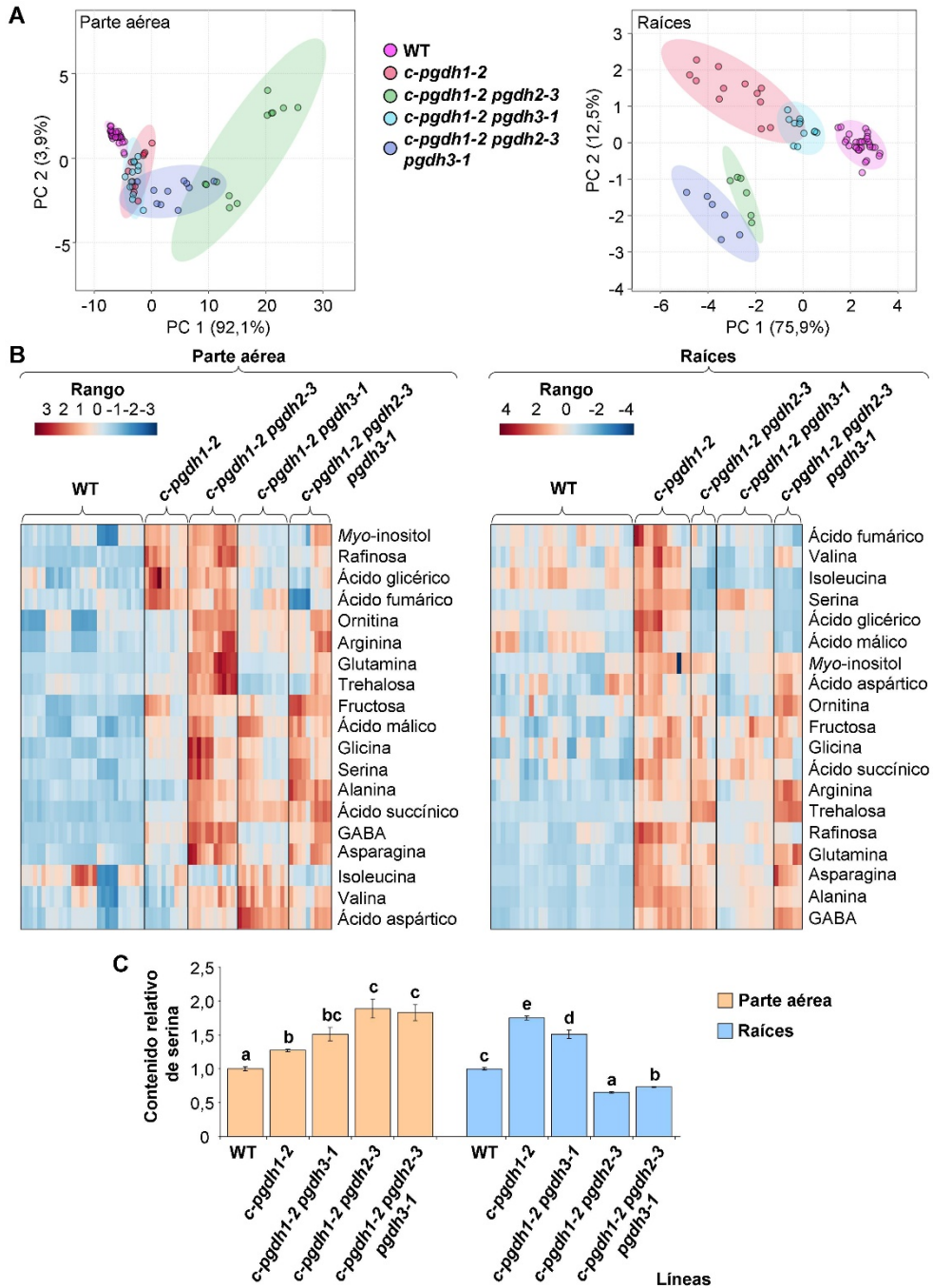


**Figura 4.8.** Caracterización fenotípica de plantas crecidas *in vitro* (durante 15 días) de los dobles y triples mutantes (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*), del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) y de plantas control (WT). (A) Foto de plantas representativas de cada línea crecidas *in vitro*. (B y C) Peso fresco de la parte aérea (PA) y de las raíces de plántulas de las diferentes líneas crecidas en placas en comparación con la línea WT. (D) Longitud de la raíz primaria de plántulas crecidas en placa. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 100$  plantas obtenidas de un pool de las dos líneas independientes de cada genotipo) normalizada respecto al valor de la media del WT. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

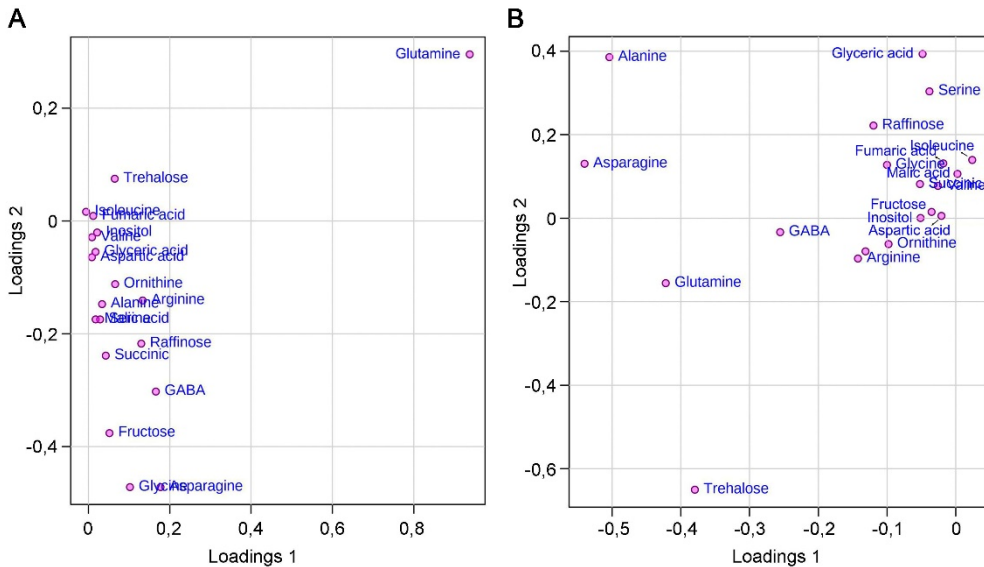


**Figura 4.9.** Caracterización fenotípica de plantas crecidas en condiciones de invernadero (durante 24 días) de los dobles y triples mutantes (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*), del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) y de plantas control (WT). (A) Foto de plantas representativas de cada línea crecidas en condiciones de invernadero. (B) Peso fresco de la roseta de plantas crecidas en invernadero. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 100$  plantas obtenidas de un pool de las dos líneas independientes de cada genotipo) normalizada respecto al valor de la media del WT. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

En raíces, todos los mutantes mostraron un incremento de los niveles de aminoácidos, siendo la alanina, asparagina y glutamina los que experimentaron el mayor aumento. Al contrario que en la parte aérea, el efecto atenuante no se observó en el triple mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* cuando se comparó con el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3*. Los metabolitos que mejor explicaban las diferencias entre líneas fueron la trehalosa y la serina. Los niveles de trehalosa se incrementaron mucho más en las líneas *c-pgdh1-2 pgdh2-3* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* que en los mutantes *c-pgdh1-2* y *c-pgdh1-2 pgdh3-1* como ya se había observado en la parte aérea (Tablas 4.3 y 4.4). Los cambios de serina en los diferentes mutantes fueron especialmente interesantes (Tabla 4.4 y Figura 4.10C). En la parte aérea los niveles de serina, tanto en el mutante condicional simple, como en los dobles y en el triple fueron más altos que en la línea control, especialmente en aquellos que presentaban un fenotipo más drástico (*c-pgdh1-2 pgdh2-3* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*; Figuras 4.8A y 4.10C, y Tabla 4.3). Sin embargo, en las raíces, los niveles de serina fueron más bajos que en el WT en las dos líneas con el fenotipo más drástico de enanismo, mientras que fueron mucho más altos que el control en las líneas *c-pgdh1-2* y *c-pgdh1-2 pgdh3-1* (Figuras 4.8A y 4.10C, y Tabla 4.4).



**Figura 4.10.** Perfil metabolómico de los mutantes dobles y triples de la familia *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*). (A) Análisis de los componentes principales (PCA) de los perfiles metabólicos de los mutantes *PGDH* en parte aérea y raíces. Los datos del análisis de la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) se evaluaron utilizando el PCA con los dos primeros componentes que representan al menos el 88% de la varianza metabólica total. Los valores entre paréntesis indican la contribución relativa de cada componente a la varianza total observada en el conjunto de datos. (B) Cambios más relevantes en el contenido de metabolitos de la parte aérea y raíces de los mutantes *PGDH* en comparación con la línea silvestre (WT). Los valores del contenido relativo de los metabolitos están representados como un mapa de calor. (C) Contenido relativo de serina en las diferentes líneas mutantes *PGDH*. Los valores representan la media  $\text{mean} \pm \text{SE}$ ,  $n \geq 6$  pools de 40 plantas de dos líneas diferentes para cada genotipo. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Los resultados más detallados se presentan en las Tablas 4.3 y 4.4.



**Figura 4.11.** Metabolitos que explican las diferencias entre los mutantes dobles y el triple de los genes *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) en parte aérea (A) y raíces (B) de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

**Tabla 4.3.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de los mutantes dobles y triples PGDH (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) comparados con la línea silvestre (WT). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media  $\pm$  SE de al menos 10 determinaciones independientes). Las letras indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Metabolito	WT	<i>c-pgdh1-2</i>	<i>c-pgdh1-2 pgdh3-1</i>	<i>c-pgdh1-2 pgdh2-3</i>	<i>c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1</i>
<b>Aminoácidos</b>					
Ácido aspártico	1 $\pm$ 0,02 a	1,01 $\pm$ 0,03 a	1,58 $\pm$ 0,04 c	1,25 $\pm$ 0,03 b	1,32 $\pm$ 0,06 b
Alanina	1 $\pm$ 0,02 a	1,02 $\pm$ 0,03 a	1,60 $\pm$ 0,05 b	1,82 $\pm$ 0,06 bc	2,08 $\pm$ 0,07 c
Arginina	1 $\pm$ 0,12 a	1,68 $\pm$ 0,10 b	2,25 $\pm$ 0,11 c	4,07 $\pm$ 0,30 d	3,21 $\pm$ 0,37 cd
Asparagina	1 $\pm$ 0,12 a	1,78 $\pm$ 0,17 b	2,53 $\pm$ 0,22 b	5,17 $\pm$ 0,45 c	4,36 $\pm$ 0,41 c
GABA	1 $\pm$ 0,03 a	2,58 $\pm$ 0,16 c	1,88 $\pm$ 0,07 b	5,16 $\pm$ 0,15 e	3,67 $\pm$ 0,27 d
Glicina	1 $\pm$ 0,06 a	2,17 $\pm$ 0,09 b	2,28 $\pm$ 0,20 bc	4,04 $\pm$ 0,41d	3,07 $\pm$ 0,19cd
Glutamina	1 $\pm$ 0,12 a	3,79 $\pm$ 0,46 b	3,21 $\pm$ 0,23 b	22,48 $\pm$ 1,69 d	9,33 $\pm$ 1,12 c
Isoleucina	1 $\pm$ 0,04 a	0,94 $\pm$ 0,04 ab	1,08 $\pm$ 0,03 b	0,87 $\pm$ 0,03 a	0,87 $\pm$ 0,02 a
Ornitina	1 $\pm$ 0,11 a	1,35 $\pm$ 0,05 b	1,72 $\pm$ 0,05 c	2,58 $\pm$ 0,07 d	2,06 $\pm$ 0,14 c
Serina	1 $\pm$ 0,03 a	1,27 $\pm$ 0,02 b	1,51 $\pm$ 0,10 bc	1,89 $\pm$ 0,14 c	1,83 $\pm$ 0,12 c
Valina	1 $\pm$ 0,03 a	0,99 $\pm$ 0,04 a	1,33 $\pm$ 0,03 b	1,24 $\pm$ 0,03 b	1,20 $\pm$ 0,03 b
<b>Ácidos orgánicos</b>					
Ácido fumárico	1 $\pm$ 0,02 a	1,51 $\pm$ 0,05 c	1,17 $\pm$ 0,05 ab	1,36 $\pm$ 0,04 bc	0,80 $\pm$ 0,09 a
Ácido glicérico	1 $\pm$ 0,05 a	1,70 $\pm$ 0,16 b	1,10 $\pm$ 0,04 a	1,57 $\pm$ 0,05 b	1,12 $\pm$ 0,08 a
Ácido málico	1 $\pm$ 0,03 a	1,41 $\pm$ 0,04 b	1,74 $\pm$ 0,09 c	1,64 $\pm$ 0,10 bc	1,70 $\pm$ 0,08 c
Ácido succínico	1 $\pm$ 0,02 a	1,50 $\pm$ 0,02 b	2,21 $\pm$ 0,03 c	2,16 $\pm$ 0,10 c	2,40 $\pm$ 0,14 c
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>					
Fructosa	1 $\pm$ 0,05 a	2,28 $\pm$ 0,24 bc	1,94 $\pm$ 0,12 b	2,44 $\pm$ 0,08 c	3,22 $\pm$ 0,17 d
Myo-inositol	1 $\pm$ 0,04 a	1,37 $\pm$ 0,04 b	1,12 $\pm$ 0,02 a	1,55 $\pm$ 0,03 c	1,25 $\pm$ 0,09 ab
Rafinosa	1 $\pm$ 0,05 a	3,90 $\pm$ 0,35 c	2,26 $\pm$ 0,18 b	4,47 $\pm$ 0,28 c	2,48 $\pm$ 0,16 b
Trehalosa	1 $\pm$ 0,03 b	1,22 $\pm$ 0,03 c	0,82 $\pm$ 0,04 a	2,44 $\pm$ 0,14 d	1,34 $\pm$ 0,18 abc



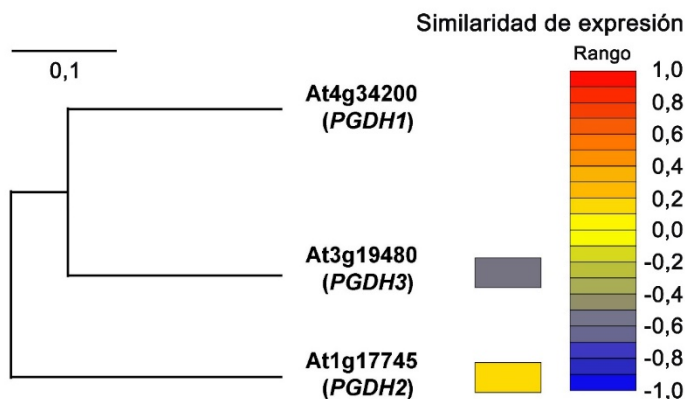
## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.4.** Niveles de metabolitos en raíces de los mutantes dobles y triples *PGDH* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) y del mutante condicional (*c-pgdh1-2*) comparados con la línea silvestre (WT). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media  $\pm$  SE de al menos 6 determinaciones independientes). Las letras indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Metabolito	WT	<i>c-pgdh1-2</i>	<i>c-pgdh1-2 pgdh3-1</i>	<i>c-pgdh1-2 pgdh2-3</i>	<i>c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1</i>
<b>Aminoácidos</b>					
Ácido aspártico	1 $\pm$ 0,02 a	1,11 $\pm$ 0,03 b	0,96 $\pm$ 0,02 a	1,00 $\pm$ 0,02 a	1,16 $\pm$ 0,03 b
Alanina	1 $\pm$ 0,05 a	4,45 $\pm$ 0,14 d	2,62 $\pm$ 0,11 b	3,46 $\pm$ 0,15 c	3,07 $\pm$ 0,12 bc
Arginina	1 $\pm$ 0,03 a	1,61 $\pm$ 0,06 c	1,30 $\pm$ 0,06 b	1,81 $\pm$ 0,04 c	2,12 $\pm$ 0,09 d
Asparagina	1 $\pm$ 0,07 a	3,75 $\pm$ 0,33 c	2,38 $\pm$ 0,11 b	3,26 $\pm$ 0,29 bc	4,35 $\pm$ 0,57 bc
GABA	1 $\pm$ 0,04 a	2,37 $\pm$ 0,10 c	1,60 $\pm$ 0,10 b	2,30 $\pm$ 0,08 c	2,73 $\pm$ 0,12 c
Glicina	1 $\pm$ 0,06 a	1,62 $\pm$ 0,08 b	1,30 $\pm$ 0,07 b	1,38 $\pm$ 0,15 ab	1,46 $\pm$ 0,14 b
Glutamina	1 $\pm$ 0,05 a	3,24 $\pm$ 0,25 c	1,99 $\pm$ 0,12 b	2,87 $\pm$ 0,23 bc	3,92 $\pm$ 0,34 c
Isoleucina	1 $\pm$ 0,02 c	1,10 $\pm$ 0,04 c	0,69 $\pm$ 0,02 b	0,57 $\pm$ 0,02 a	0,64 $\pm$ 0,02 ab
Ornitina	1 $\pm$ 0,04 a	1,41 $\pm$ 0,06 b	0,95 $\pm$ 0,06 a	1,41 $\pm$ 0,07 bc	1,73 $\pm$ 0,06 c
Serina	1 $\pm$ 0,02 c	1,75 $\pm$ 0,03 e	1,51 $\pm$ 0,06 d	0,65 $\pm$ 0,01 a	0,73 $\pm$ 0,01 b
Valina	1 $\pm$ 0,02 b	1,25 $\pm$ 0,05 c	0,88 $\pm$ 0,02 a	0,91 $\pm$ 0,04 ab	1,08 $\pm$ 0,04 b
<b>Ácidos orgánicos</b>					
Ácido fumárico	1 $\pm$ 0,02 bc	1,23 $\pm$ 0,09 c	0,93 $\pm$ 0,02 ab	0,94 $\pm$ 0,07 abc	0,80 $\pm$ 0,04 a
Ácido glicérico	1 $\pm$ 0,04 c	1,88 $\pm$ 0,15 d	1,11 $\pm$ 0,02 c	0,63 $\pm$ 0,02 b	0,53 $\pm$ 0,02 a
Ácido málico	1 $\pm$ 0,03 bc	1,15 $\pm$ 0,05 c	0,96 $\pm$ 0,02 b	0,81 $\pm$ 0,01 a	0,77 $\pm$ 0,02 a
Ácido succínico	1 $\pm$ 0,03 a	1,37 $\pm$ 0,05 c	1,30 $\pm$ 0,02 bc	1,29 $\pm$ 0,04 bc	1,13 $\pm$ 0,05 ab
<b>Azúcares y azúcares alcohóles</b>					
Fructosa	1 $\pm$ 0,02 a	1,20 $\pm$ 0,03 b	1,20 $\pm$ 0,03 b	1,20 $\pm$ 0,05 b	1,21 $\pm$ 0,03 b
Myo-inositol	1 $\pm$ 0,02 a	1,39 $\pm$ 0,02 c	1,09 $\pm$ 0,03 a	1,29 $\pm$ 0,02 b	1,27 $\pm$ 0,02 b
Rafinosa	1 $\pm$ 0,04 a	2,00 $\pm$ 0,09 c	1,28 $\pm$ 0,05 b	1,28 $\pm$ 0,04 b	1,21 $\pm$ 0,05 b
Trehalosa	1 $\pm$ 0,03 a	2,12 $\pm$ 0,09 c	1,64 $\pm$ 0,07 b	4,02 $\pm$ 0,28 d	4,42 $\pm$ 0,08 d

### 4.3 Análisis de expresión de los genes de la familia *PGDH*

Los análisis filogenéticos realizados con los tres genes de la familia *PGDH*, basados en la similitud de secuencias, indican que *PGDH1* y *PGDH3* están más estrechamente relacionados entre ellos que con *PGDH2* (Figura 4.12). Al comparar las secuencias genómicas se observó que el gen *PGDH1* y *PGDH3* presentaban una similitud del 76%, mientras que el gen *PGDH2* presentaba una similitud del 70% y del 68% con el gen *PGDH1* y *PGDH3*, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro grupo por Toujani et al., (2013a), en los que realizaron un análisis de alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los tres genes. La mayor similitud entre secuencias de aminoácidos fue entre las isoformas *PGDH1* y *PGDH3* con un 79% de similitud, mientras que para la isoforma *PGDH2* presentaba una similitud del 77% con *PGDH1* y 74% con *PGDH3*.

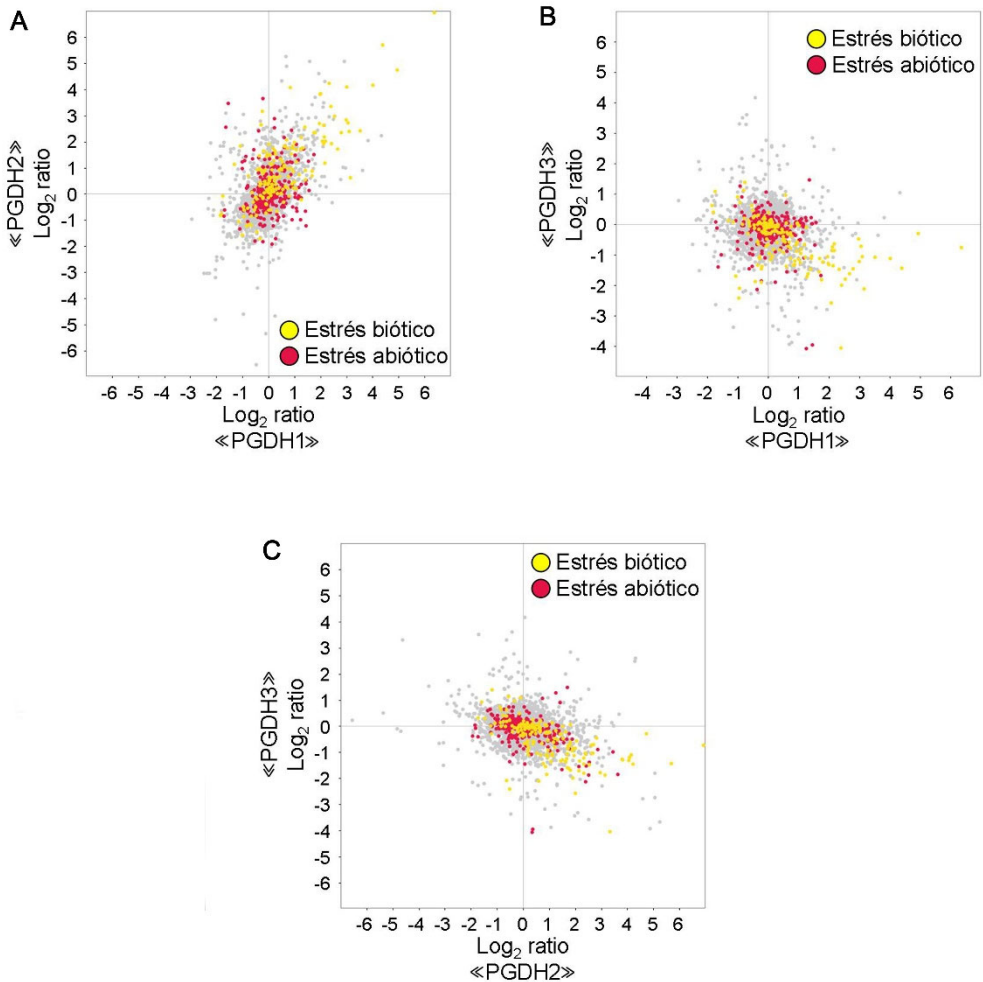


**Figura 4.12.** Análisis filogenético y de expresión de los genes *PGDH* de *Arabidopsis*. El árbol filogenético se realizó con las secuencias nucleotídicas de los genes *PGDH*, como se describe en materiales y métodos (ver Apartado 3.15). Por otro lado, para el análisis de expresión génica se usó la herramienta *expressolog tree viewer* (<http://bar.utoronto.ca/>), representado en un mapa de calor.

A pesar de los resultados anteriores, los análisis del patrón de expresión de los genes *PGDH* a través de los análisis *in silico* (<http://bar.utoronto.ca/>), indicaban que *PGDH1* y *PGDH2* están más relacionados entre sí que con *PGDH3* (Figura 4.12). Los análisis de expresión de los genes *PGDH* usando datos de mRNAseq de la herramienta Geneinvestigator mostraron una correlación positiva entre la expresión

## 4. RESULTADOS

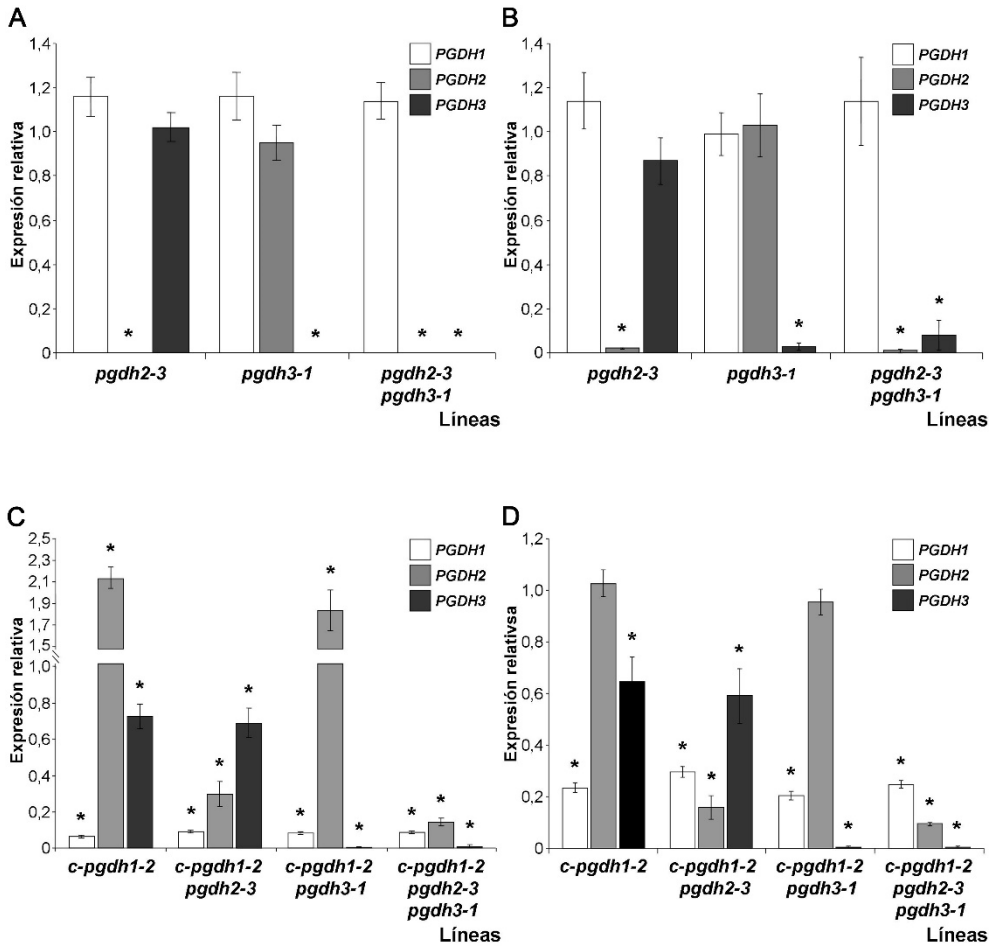
de *PGDH1* y *PGDH2* bajo diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, el gen *PGDH3* mostraba una correlación negativa respecto a los otros dos (Figura 4.13).



**Figura 4.13.** Análisis de correlación de la expresión entre los genes *PGDH1* y *PGDH2* (A), entre *PGDH1* y *PGDH3* (B) y entre *PGDH2* y *PGDH3* (C) durante condiciones de estrés biótico (puntos de color amarillo) o estrés abiótico (puntos de color rojo). Los análisis se realizaron a través de la página web <https://geneinvestigator.com/>.

Para comprender la relación existente entre los genes *PGDH*, llevamos a cabo un análisis de expresión de los tres genes de la familia en los mutantes simples,

dobles y triples. En ellos, se pudo observar que en los mutantes simples *pgdh3-1* y *pgdh2-3* ni el gen *PGDH2* ni el gen *PGDH3* se indujeron, respectivamente (Figura 4.14A y B). Tampoco se observaron cambios significativos en la expresión del gen *PGDH1* en los mutantes simples *pgdh2-3* y *pgdh3-1*, o en el doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1* (Figura 4.14A y B). Por el contrario, cuando está ausente *PGDH1* se pudo observar una inducción del gen *PGDH2* en la parte aérea de la planta (Figura 4.14C). Este efecto de inducción se podía ver tanto en los mutantes simples condicionales *c-pgdh1-2* como en el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh3-1*. Al contrario que *PGDH2*, la expresión de *PGDH3* no se indujo, sino que se reprimió tanto en el mutante condicional *c-pgdh1-2* como en el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* (Figura 4.14C). Estos resultados indican que la ausencia del gen *PGDH1* induce la expresión de *PGDH2*, mientras que la ausencia de *PGDH1* o de *PGDH1* y *PGDH2*, en conjunto, tiene el efecto opuesto en la expresión de *PGDH3* reprimiéndola. Por tanto, el análisis de la expresión génica podría indicar una interacción negativa entre el gen *PGDH3* y los otros dos genes a nivel transcripcional. Por otro lado, en raíces, no se observaron cambios en la expresión de *PGDH2* en los mutantes *c-pgdh1-2* y *c-pgdh1-2 pgdh3-1* (Figura 4.14D). En el caso del gen *PGDH3*, ya se había comentado que este gen se expresa poco en raíces, pero se observó una tendencia clara de reducción de expresión de *PGDH3* en los mutantes *c-pgdh1-2* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3* (Figura 4.14D). Estos resultados apoyarían el antagonismo de *PGDH3* respecto a los genes *PGDH1* y *PGDH2* a nivel transcripcional.



**Figura 4.14.** Análisis de la expresión de los genes de la familia *PGDH* en líneas mutantes crecidas en placas durante 15 días y comparadas con la línea silvestre (WT). (A, B) Análisis de expresión por qRT-PCR en los mutantes *pgdh2-3*, *pgdh3-1* y *pgdh2-3 pgdh3-1* en la parte aérea (A) y en las raíces (B). (C, D) Análisis de expresión por qRT-PCR en los mutantes *c-pgdh1-2*, *c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1* en la parte aérea (C) y raíces (D). Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n > 4$  de un grupo de 30 plantas de dos líneas independientes para cada genotipo) y están normalizados respecto a los valores de expresión para cada gen en el WT en la parte aérea (A y C) y raíces (B y D). \* diferencias significativas respecto al WT (T-test,  $P < 0,05$ ).

## 4.4 Estudio de los parámetros fotosintéticos, conductancia estomática y transpiración en los mutantes *PGDH3*

Hemos visto que los mutantes simples del gen *PGDH3* atenúan los cambios metabólicos y fenotípicos desarrollados por los mutantes de los otros dos genes *PGDH* (ver Tablas 4.3 y 4.4 y Figuras 4.8, 4.10 y 4.11). Esto nos llevó a pensar que la función de *PGDH3* era diferente a la de los genes *PGDH1* y *PGDH2*. Para entender mejor la función del gen *PGDH3* realizamos un estudio de análisis de coexpresión de los tres genes de la familia a través de la aplicación de Geneinvestigator. Encontramos que los 25 genes más correlacionados con *PGDH3* codificaban para proteínas localizadas en el cloroplasto (Tabla 4.5). Estos resultados concuerdan con el patrón de expresión específico de *PGDH3* en los órganos fotosintéticos. Muchos de estos genes están implicados en procesos fotosintéticos, principalmente en reacciones relacionadas con luz. Ocho de ellos, codifican para subunidades del complejo NAD(P)H deshidrogenasa (NDH) presente en la membrana del tilacoide de los cloroplastos (*NDHM*, *NDHN*, *PNSB1*, *NDHU*, *PNSB3*, *PNSL3*, *PNSL1* y *CRR3*). Otros genes correlacionados con *PGDH3* son genes del complejo PGR5 (*PGRL1A*), del complejo ATP sintasa (*ATPD*), o de proteínas implicadas en el ensamblaje de los complejos PSII/PSI (*LHCA6*, *TIC62*, *ZKT/MET1*, o *MPH1*). Por último, algunos genes coexpresados junto a *PGDH3* codifican proteínas que están implicadas en las reacciones de fijación del carbono de la fotosíntesis (*SBPASE*, *GAPB*, o *RBCSB-1B*). Este patrón de expresión relacionado con la fotosíntesis no se observó sin embargo en los genes *PGDH1* y *PGDH2* (Tablas 4.6 y 4.7, respectivamente). De acuerdo con estos resultados preliminares, medimos el efecto de la deficiencia del gen *PGDH3* en la fotosíntesis y en otros parámetros relacionados con este proceso en los mutantes *pgdh3-1* y *pgdh3-2*. Los resultados obtenidos tanto en el mutante *pgdh3-1* como en el *pgdh3-2* presentaron una reducción de la asimilación neta del carbono y de la eficiencia cuántica del PSII, además de una baja conductancia estomática y baja transpiración (Tabla 4.8). Curiosamente, la actividad fotorrespiratoria, que podría explicar los mayores niveles de serina en estos mutantes, no fue mayor en comparación con el control.

## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.5.** Genes coexpresados junto a *PGDH3* de acuerdo con los resultados obtenidos en Genevestigator (<https://genevestigator.com/>). Resultados obtenidos a partir de 799 estudios de RNAseq (At\_RNAseq\_ARABI\_GL-6) relacionados con perturbaciones.

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At1g19150	<i>LHCA6</i>	0,91	ARNm de la proteína de unión a la clorofila a/b de tipo II del PSI (Lhca2*1). Forma el supercomplejo NDH-PSI.
At4g37925	<i>NDHM</i>	0,90	Subunidad NDH-M del complejo NAD(P)H:plastoquinona deshidrogenasa (complejo NDH) presente en la membrana tilacoidal del cloroplasto.
At5g58260	<i>ndhN</i>	0,90	Codifica la subunidad NDH-N del complejo NAD(P)H:plastoquinona deshidrogenasa (complejo NDH) presente en la membrana tilacoidal del cloroplasto.
At1g15980	<i>PNSB1</i>	0,89	Codifica una subunidad del complejo NAD(P)H deshidrogenasa cloroplástica, implicada en el flujo cíclico de electrones alrededor del fotosistema I para producir ATP.
At5g21430	<i>ndhU</i>	0,89	Reducción clororrespiratoria L, CRRL, complejo similar a la NADH deshidrogenasa U, NDHU.
At1g09340	<i>CSP41B</i>	0,88	Codifica la CHLOROPLAST RNA BINDING (CRB), una proteína de unión a ARN. CRB es importante para el buen funcionamiento del cloroplasto.
At3g10060	<i>FKBP16-4</i>	0,88	Proteína cloroplástica con actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa.
At5g23060	<i>CAS</i>	0,87	Proteína localizada en el cloroplasto que modula la concentración citoplasmática de Ca <sup>2+</sup> y es importante para la regulación estomática en respuesta a un aumento externo de Ca <sup>2+</sup> .
At2g01590	<i>CRR3</i>	0,87	Probablemente una subunidad del complejo NAD(P)H deshidrogenasa del cloroplasto, implicada en el transporte cíclico de electrones del PSI.
At3g18890	<i>TIC62</i>	0,87	Translocón 62 en la membrana de la envoltura interna de los cloroplastos.
At1g55480	<i>ZKT</i>	0,87	También llamada MET1, es una proteína TPR asociada al tilacoide que participa en la formación y reparación del supercomplejo del fotosistema II en <i>Arabidopsis</i> .
At3g16250	<i>PNSB3</i>	0,87	Subunidad del complejo NAD(P)H deshidrogenasa del cloroplasto, que participa en el flujo cíclico de electrones alrededor del fotosistema I para producir ATP. Contiene un clúster 4Fe-4S.
At3g55800	<i>SBPASE</i>	0,86	Enzima cloroplástica sedoheptulosa-1-7-bisfosfatasa (SBPasa) implicada en la reducción del carbono en el ciclo de Calvin, concretamente en la fase de regeneración de la ribulosa 1,5 bisfosfato.

**Tabla 4.5.** Continuación

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At5g07020	<i>MPH1</i>	0,86	Proteína integral de la membrana del tilacoide que interactúa con los complejos del núcleo del PSII y contribuye al mantenimiento de la homeostasis del PSII tras la exposición a condiciones de luz fotoinhibitoria, participando en la protección y estabilización del PSII bajo estrés fotoinhibitorio.
At1g49380	<i>CCS1</i>	0,86	Familia de proteínas cloroplásticas de la biogénesis del citocromo c.
At3g63140	<i>CSP41A</i>	0,86	Proteína con actividad ribonucleasa implicada en la maduración del rRNA plastidial.
At3g01440	<i>PNSL3</i>	0,85	Subunidad del complejo NAD(P)H situada en el lumen del tilacoide del cloroplasto.
At4g09650	<i>ATPD</i>	0,85	Subunidad delta de la ATPasa del cloroplasto. El ARNm es móvil de célula a célula.
At4g22890	<i>PGRL1A</i>	0,85	PGRL1A, una proteína transmembrana presente en los tilacoides. Las plantas que carecen de PGRL1 muestran una perturbación del flujo cíclico de electrones, similar a las plantas deficientes en PGR5. PGRL1 y PGR5 interactúan físicamente y se asocian con PSI .
At1g42970	<i>GAPB</i>	0,85	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa localizada en el cloroplasto que puede utilizar tanto NADH como NADPH para reducir el 1,3-difosfato de glicerato.
At5g38430	<i>RBCS-1B</i>	0,85	Miembro de la familia multigénica de la subunidad pequeña de Rubisco (RBCS).
At1g18060	<i>FBN-LIKE</i>	0,85	Localizada en los cloroplastos.
-	<i>PAP12</i>	0,85	Localizada en los cloroplastos. Proteína asociada a los lípidos de los plastos.
At4g28660	<i>PSB28</i>	0,85	Similar a la subunidad PsbW del fotosistema II.
At2g39470	<i>PNSL1</i>	0,85	Proteína similar a la PsbP 2.



## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.6.** Genes coexpresados con *PGDH1* de acuerdo con los resultados obtenidos en Genevestigator (<https://genevestigator.com/>). Resultados obtenidos a partir de 799 estudios de RNAseq (At\_RNAseq\_ARABI\_GL-6) relacionados con perturbaciones.

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At5g08300	-	0,78	Subunidad alfa de la Succinil-CoA ligasa.
At2g20420	-	0,77	Proteína de la familia ATP citrato liasa (ACL).
At2g36530	<i>ENO2</i>	0,75	Participa en la tolerancia al frío dependiente de la luz y codifica una enolasa. La proteína está fosforilada en una tirosina y su estado de fosforilación se modula en respuesta al ABA en las semillas de <i>Arabidopsis</i> .
At3g54110	<i>PUMP1</i>	0,73	Miembro de la familia de proteínas de desacoplamiento PUMP2. Codifica una proteína de desacoplamiento mitocondrial AtUCP1 que participa en el mantenimiento del equilibrio redox de la cadena de transporte de electrones mitocondrial para facilitar el metabolismo fotosintético. La interrupción de UCP1 da lugar a un fenotipo fotosintético. En concreto, se produce una restricción de la fotorrespiración con una disminución de la tasa de oxidación de la glicina fotorrespiratoria en la mitocondria. Este cambio conduce a una reducción asociada de la tasa de asimilación de carbono fotosintético.
At4g24330	<i>DUF1682</i>	0,73	Proteína hipotética (DUF1682).
At1g52410	<i>TSA1</i>	0,72	Contiene una nueva secuencia repetida de unión al calcio. Se une a la proteína TONSOKU (TSK) <i>in vitro</i> . Se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas en las células en interfase. En las células sincronizadas para la división celular, TSA1 y TSK se relocalizan en los extremos de los microtúbulos del huso que están por delante de las cromátidas en separación durante la metafase y la anafase de la mitosis. Puede participar en la mitosis junto con TSK. Se expresa preferentemente en la flor y el ápice del meristemo. Puede formar multímeros.
At2g47510	<i>FUM1</i>	0,72	Codifica una proteína localizada en la mitocondria. El gen <i>FUM1</i> parece ser esencial, lo que sugiere que FUM1 puede desempeñar un papel crucial como fumarasa en el ciclo del ácido tricarbóxico.
At2g45300	-	0,72	Codifica la 1-carboxiviniltransferasa de 3-fosfoshikimato/5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato / EPSP sintasa implicada en la biosíntesis de corismato. El ARNm es móvil de célula a célula.
At4g20360	<i>TUFA</i>	0,71	Factor de elongación de la traducción EF-Tu transcrito nuclearmente y localizado en los plastos. Denominado AtRabE1b en DOI:10.1104/pp.013052. Sin embargo, un uso más amplio en la comunidad científica y más publicaciones asignan el símbolo RabE1b a At5g59840.

**Tabla 4.6.** Continuación

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At1g16300	<i>GAPCP2</i>	0,71	Codifica una de las isoformas de GAPDH localizadas en el cloroplasto/plastos ( <i>GAPCP1/At1g79530</i> y <i>GAPCP2/At1g16300</i> ). Los dobles mutantes <i>gapcp</i> muestran un fenotipo drástico de detención del desarrollo de las raíces, enanismo y esterilidad. Las <i>GAPCP</i> son importantes para la síntesis de serina en las raíces.
At5g13280	<i>AK1</i>	0,71	Asp quinasa inhibida por Lys y S-adenosilmetionina. Contiene dominios reguladores que pertenecen a la familia de dominios ACT, que permiten la unión a una extrema variedad de ligandos. Puede funcionar como monómero o como dímero con la acetohidroxiácido sintasa (HSDH).
At1g07920	<i>A3</i>	0,71	Proteína de la familia del factor de elongación Tu con unión a GTP.
At5g07350	<i>TUDOR1</i>	0,71	Proteína de unión a ARN con actividad nucleasa esencial para la respuesta al estrés. Participa en los mecanismos que actúan sobre los ARNm que entran en la vía secretora. Funcionalmente redundante con <i>TSN2</i> .
At5g26710	-	0,71	Glutamil/glutaminil-tRNA sintetasa, clase Ic.
At1g07920	<i>A3</i>	0,71	Proteína de la familia del factor de elongación Tu con unión a GTP.
At1g16520	<i>NAIP2</i>	0,7	Proteína que interactúa con <i>NAI1</i> , relacionada con el retículo endoplasmático (RE) y en la formación de vesículas.
At3g09820	<i>ADK1</i>	0,7	Participa en la síntesis de adenilatos y en el reciclaje de metilos.
At3g04680	<i>CLPS3</i>	0,7	Codifica una proteína nuclear que funciona en el procesamiento del ARNm. Las mutaciones en este gen causan la letalidad del embrión y la reducción de la transmisión a través del gametofito femenino. La sobreexpresión de una proteína <i>CLPS3:TAP</i> cambia los niveles relativos de dos transcritos <i>FCA</i> procesados alternativamente. También provoca una filotaxia y un desarrollo floral anormales, una floración temprana en días largos y cortos, y un aumento de los niveles de expresión de <i>CUC1</i> y <i>WUS</i>
At2g22250	<i>PAT</i>	0,7	Codifica una aspartato aminotransferasa de tipo procariota con actividad glutamato/aspartato-prefenato aminotransferasa ( <i>PAT</i> )
At2g21160	<i>TRAP</i>	0,7	Proteína asociada al translocon ( <i>TRAP</i> ), subunidad alfa
At5g08690	-	0,7	Codifica la subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial. Esta subunidad está codificada por una familia multigénica de tres miembros ( <i>At5g08670</i> , <i>At5g08680</i> , <i>At5g08690</i> ) que comparten un 98% de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos
At5g55070	-	0,7	Dihidrolipoamida succiniltransferasa
At5g02870	<i>RPL4D</i>	0,7	Familia de proteínas ribosomales L4/L1

**Tabla 4.6.** Continuación

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At1g22840	<i>CYTC-1</i>	0,7	Codifica el citocromo c. Contiene dos elementos de sitio II (TGGGCC/T), que interactúan con un factor de transcripción de dominio TCP, y una repetición telomérica interna aguas abajo, y son necesarios para la expresión del gen <i>Cytc-1</i> . El promotor dirige la expresión preferente en los meristemos de las raíces y los brotes y en las anteras. Los mutantes dobles con <i>CYTC-2</i> acumulan almidón durante el día, tienen un retraso en el crecimiento y el desarrollo y una reducción de las proteínas GA y DELLA que vinculan el metabolismo celular y la homeostasis de GA

**Tabla 4.7.** Genes coexpresados junto a *PGDH2* de acuerdo con los resultados obtenidos en Genevestigator (<https://genevestigator.com/>). Resultados obtenidos a partir de 799 estudios de RNAseq relacionados con perturbaciones (At\_RNAseq\_ARABI\_GL-6).

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At2g17720	<i>P4H5</i>	0,76	Codifica una prolil 4-hidroxilasa que modifica las proteínas extensinas en las células ciliadas de la raíz.
At3g01720	<i>ATSERGT1</i>	0,74	Peptidil serina alfa-galactosiltransferasa.
At2g22480	<i>PFK5</i>	0,73	Fosfofructoquinasa 5.
At5g47730	-	0,73	Proteína de la familia de transferencia de fosfatidilinositol similar a Sec14p.
At3g05050	-	0,72	Proteína de la superfamilia de las quinzas.
At5g08300	-	0,72	Subunidad alfa de la Succinil-CoA ligasa.
At4g26910	-	0,72	Dihidrolipoamida succiniltransferasa.

Tabla 4.7. Continuación

Número AGI	Nombre del gen	Coefficiente de Pearson	Descripción
At1g52410	<i>TSA1</i>	0,72	Contiene una nueva secuencia repetida de unión al calcio. Se une a la proteína TONSOKU (TSK) <i>in vitro</i> . Se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas en las células en interfase. En las células sincronizadas para la división celular, TSA1 y TSK se relocalizan en los extremos de los microtúbulos del huso que están por delante de las cromátidas en separación durante la metafase y la anafase de la mitosis. Puede participar en la mitosis junto con TSK. Se expresa preferentemente en la flor y en el ápice del meristemo. Puede formar multímeros.
At2g36580	-	0,71	Proteína de la familia de la piruvato quinasa.
At3g57630	<i>EXAD</i>	0,70	Codifica una glicoproteína glicosil transferasa ExAD. Los mutantes <i>knockout</i> muestran un fenotipo de pelo radicular truncado.
At4g16155	<i>LPD2</i>	0,70	Dihidrolipoamida deshidrogenasa.
At4g00500	-	0,70	Proteína de la superfamilia alfa/beta-hidrolasas.
At2g30870	<i>GSTF10</i>	0,70	Gen <i>ERD13</i> inducido por la deshidratación temprana, homólogo a las glutatión S-transferasas del tabaco y del maíz. Codifica la glutatión transferasa perteneciente a la clase phi de las GST.
At3g09810	<i>IDH6</i>	0,70	Codifica una subunidad catalítica de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD <sup>+</sup> localizada en la mitocondria.
At5g04930	<i>ALA1</i>	0,69	Codifica una translocasa de aminofosfolípidos (ATPasa de tipo p) implicada en la respuesta al frío. Se dirige a la membrana plasmática tras su asociación en el retículo endoplásmico con una subunidad beta de la proteína ALIS. El ARNm es móvil de célula a célula.
At2g17130	<i>IDH2</i>	0,69	Codifica una subunidad reguladora de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD <sup>+</sup> localizada en la mitocondria.
At3g28480	<i>P4H7</i>	0,69	Probable prolina 4-hidroxilasa 7. Cataliza la formación postraduccional de 4-hidroxiprolina en las secuencias -Xaa-Pro-Gly- de las secuencias peptídicas ricas en prolina de las glicoproteínas vegetales y otras proteínas.
At3g26440	-	0,69	Proteína transmembrana (DUF707).
At5g03630	<i>ATMDAR2</i>	0,68	Proteína de la familia piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa.
At2g20420	-	0,68	Proteína de la familia ATP citrato liasa (ACL).
At2g04400	<i>IGPS</i>	0,68	Actúa durante la biosíntesis del triptófano controlada por ERF109.

**Tabla 4.7.** Continuación

Número AGI	Nombre del gen	Coficiente de Pearson	Descripción
At5g36880	ACS	0,68	Codifica una acetil-coA sintetasa plastidial. Esta enzima interviene en la conversión de acetato en acetil-coA en los plastos.
At1g50360	VIII-A	0,68	Miembro de las proteínas similares a miosina.
At4g00570	NAD-ME2	0,68	Codifica una enzima málica dependiente de NAD (NAD-ME) que no actúa sobre el oxaloacetato, lo que indica que pertenece a la EC 1.1.1.39. Es un miembro de la familia beta de NAD-MEs en las plantas.
At2g20760	CLC1	0,68	Proteína de cadena ligera de clatrina.

**Tabla 4.8.** Parámetros fotosintéticos en plantas crecidas durante 30 días de las líneas de mutantes simples del gen *PGDH3* (*pgdh3-1* y *pgdh3-2*) y de plantas control (WT). Ratio fotosintético ( $A_N$ ;  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ;  $\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ), concentración de  $\text{CO}_2$  subestomática ( $C_i$ ;  $\text{mol}/\text{mol air}$ ), ratio de transpiración ( $E$ ;  $\text{mmol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ), eficiencia fotosintética efectiva del fotosistema II (PhiPS2) y ratio de fotorrespiración (PR;  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  SE ( $n = 10$  determinaciones independientes). Para cada parámetro las letras indican diferencias significativas entre grupos ( $P < 0,05$ ).

Genotipo	$A_N$	$g_s$	$C_i$
WT	$7,14 \pm 0,10$ a	$0,145 \pm 0,004$ a	$313 \pm 2$
<i>pgdh3-1</i>	$5,20 \pm 0,17$ b	$0,102 \pm 0,005$ b	$312 \pm 3$
<i>pgdh3-2</i>	$4,94 \pm 0,16$ b	$0,105 \pm 0,005$ b	$319 \pm 4$
	$E$	PhiPS2	PR
WT	$2,62 \pm 0,06$ a	$0,117 \pm 0,001$ a	$1,15 \pm 0,02$ a
<i>pgdh3-1</i>	$1,85 \pm 0,07$ b	$0,098 \pm 0,003$ b	$1,05 \pm 0,05$ ab
<i>pgdh3-2</i>	$1,89 \pm 0,08$ b	$0,087 \pm 0,002$ b	$0,78 \pm 0,05$ b

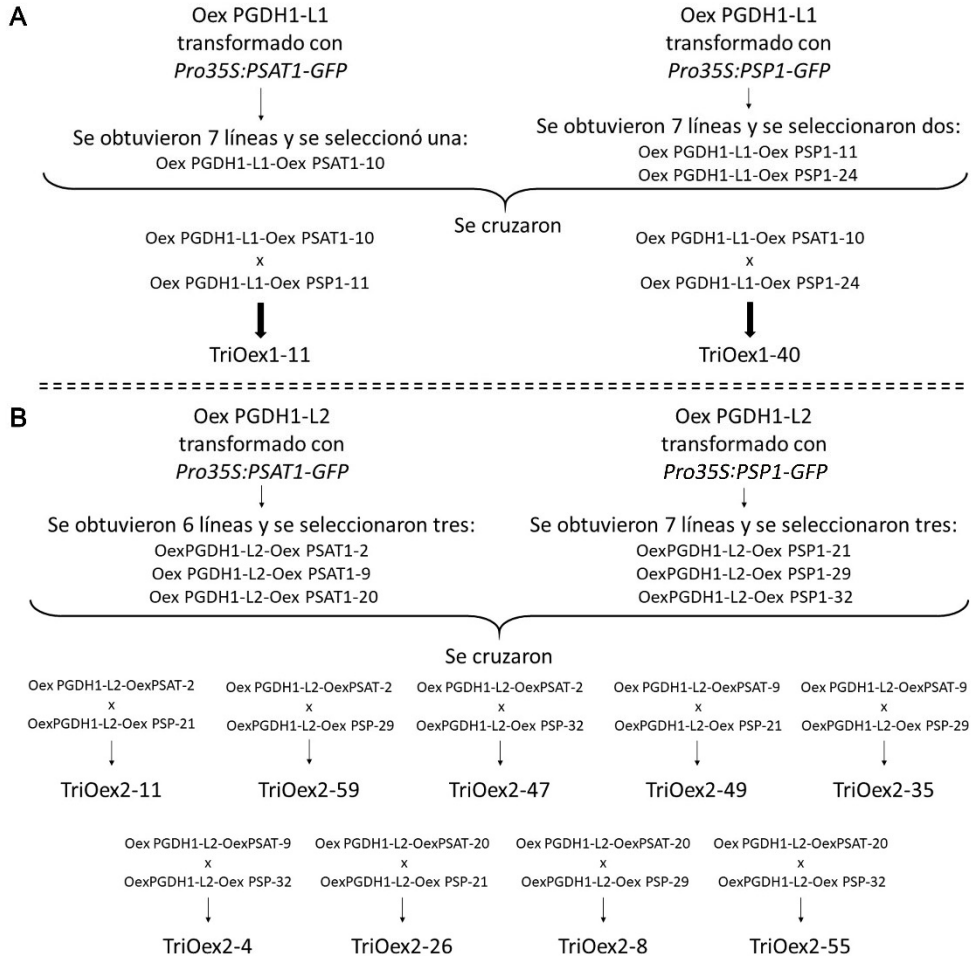
## 4.5 Análisis de expresión de las líneas triples sobreexpresoras de los genes *PGDH1*, *PSAT1* Y *PSP1* de *Arabidopsis thaliana*

Con el objetivo de poder estudiar la implicación de la RFBS y la ruta del Glicolato en el metabolismo del nitrógeno y del carbono se siguió una estrategia de ganancia de función. Para ello, se generaron plantas triples sobreexpresoras de los tres genes principales de esta ruta (ver Apartados 3.7.3, 3.7.4 y 3.8 de Materiales y Métodos). Al realizar la transformación de cada una de las dos líneas Oex *PGDH1* (Oex *PGDH1*-L1 y Oex *PGDH1*-L2) con las construcciones génicas sobreexpresoras del gen *PSAT1* o del gen *PSP1*, se obtuvieron líneas dobles sobreexpresoras independientes (sobreexpresoras para el gen *PGDH1* y *PSAT1* o sobreexpresoras para el gen *PGDH1* y *PSP1*). En la obtención de las plantas sobreexpresoras para los genes *PGDH1* y *PSAT1* procedentes de la línea Oex *PGDH1*-L1 se obtuvieron siete líneas de eventos de transformación independientes, de las cuales se eligió una a partir de los análisis de expresión realizados de los dos genes (únicamente hubo una que tenía sobreexpresión para los dos genes). Para el caso de las sobreexpresoras de los genes *PGDH1* y *PSP1* procedentes de la misma línea Oex *PGDH1* anterior, obtuvimos siete líneas independientes de las cuales se eligieron dos en función de los análisis de expresión para ambos genes (con los mismos criterios de selección aplicados anteriormente). Lo mismo hicimos para obtener las líneas dobles sobreexpresoras procedentes de la línea Oex *PGDH1*-L2, y en este caso, para los genes *PGDH1* y *PSAT1* se obtuvieron seis líneas de las que se eligieron las tres que presentaban mayor sobreexpresión para ambos genes. En el caso de las líneas dobles sobreexpresoras para los genes *PGDH1* y *PSP1* procedentes de las plantas Oex *PGDH1*-L2 obtuvimos siete líneas independientes de las cuales también se eligieron tres (con los mismos criterios) (Figura 4.15).

Una vez elegidas las líneas dobles sobreexpresoras, tanto de los genes *PGDH1* y *PSAT1* o de los genes *PGDH1* y *PSP1*, se realizaron combinaciones de cruces entre plantas dobles sobreexpresoras procedentes de la misma línea Oex *PGDH1*. De esta manera pudimos obtener dos líneas independientes procedentes de los cruces entre líneas dobles sobreexpresoras de origen Oex *PGDH1*-L1 (TriOex1-11 y TriOex1-40) y otras nueve procedentes de los cruces entre líneas dobles sobreexpresoras de origen Oex *PGDH1*-L2 (TriOex2-4, TriOex2-8, TriOex2-

## 4. RESULTADOS

11, TriOex2-26, TriOex2-35, TriOex2-47, TriOex2-49, TriOex2-55 y TriOex2-59) (Figura 4.15).



**Figura 4.15.** Esquema de obtención de las líneas triple sobreexpresoras a partir de la línea Oex PGDH1-L1 (A; llamadas TriOex1) o de la línea Oex PGDH1-L2 (B; llamadas TriOex2) transformadas con las construcciones *Pro35S:PSAT1-GFP* y *Pro35S:PSP1-GFP*.

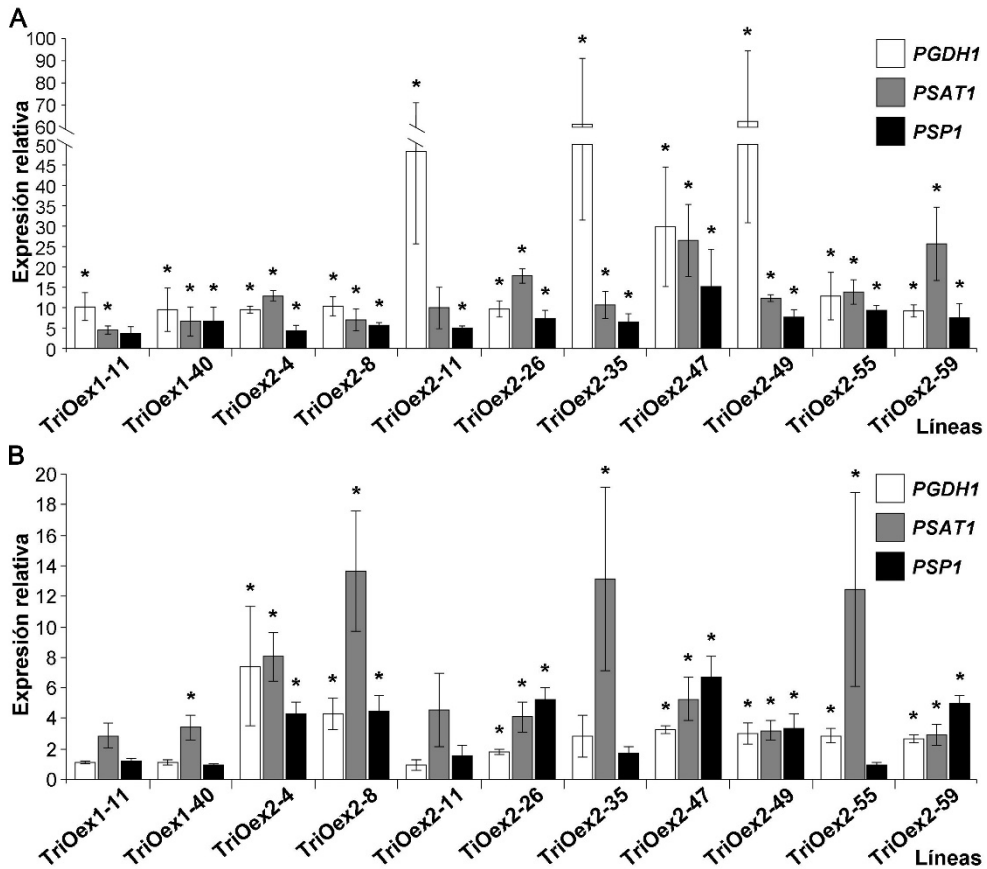
Con las líneas TriOex obtenidas se realizó un ensayo de expresión para analizar el nivel de expresión de los tres genes en cada una de las líneas.

En casi todas las líneas analizadas se observó una sobreexpresión de los tres genes en la parte aérea, sin embargo, el nivel de expresión variaba en función de la línea analizada (Figura 4.16A). Para las líneas TriOex1, en parte aérea, ambas líneas presentaron unos niveles de expresión similares del gen *PGDH1*. En ambas líneas se observó un aumento significativo de expresión para el gen *PSAT1*, pero solamente la TriOex1-40 tuvo un mayor nivel de expresión significativo del gen *PSP1*. En el caso de las líneas TriOex2, la línea con mayor expresión del gen *PGDH1* era TriOex2-49, seguida por la línea TriOex2-35. Por otro lado, la línea que presentaba la mayor expresión del gen *PSAT1* fue la línea TriOex2-47, línea que también tenía el mayor valor de expresión para el gen *PSP1*.

Mientras que en la parte aérea únicamente dos de las líneas ensayadas no tuvieron sobreexpresión para alguno de los genes, en el caso de las raíces nos encontramos con que en 5 de ellas al menos uno de los genes no se sobreexpresaba respecto al control (Figura 4.16). En este órgano, la línea que presentaba un mayor nivel de expresión del gen *PGDH1* fue la línea TriOex2-4. Por otro lado, la línea con mayor expresión del gen *PSAT1* era la línea TriOex2-8 (con un valor algo superior al de las líneas TriOex2-35 y TriOex2-55). Con respecto al gen *PSP1*, la línea con mayor nivel de expresión era la línea TriOex2-47. De las dos líneas TriOex1 obtenidas, en raíces, solo la línea TriOex1-40 presentaba un nivel de expresión mayor al control sólo para el gen *PSAT1* (Figura 4.16B).

En función de los resultados de expresión obtenidos se eligieron las líneas que presentaban una mayor expresión de los tres genes teniendo en cuenta la parte aérea y las raíces. Por lo tanto, para continuar con los experimentos las líneas elegidas fueron TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49 (teniendo estas tres últimas todos los genes sobreexpresados en los dos órganos).





**Figura 4.16.** Análisis qRT-PCR de la expresión los tres genes principales de la RFBS, *PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1* en parte aérea (A) y en raíces (B) en las diferentes líneas triples sobreexpresoras (TriOex) de plantas de 14 días crecidas *in vitro* comparadas con plantas control. Los valores representan la media  $\pm$  SE (n = 3 réplicas biológicas independientes). (\*) Indica diferencias significativas respecto al WT (T-test,  $P < 0,05$ ).

## 4.6 Análisis de expresión de las líneas sobreexpresoras de maíz

Dado que el servicio de transformación de plantas de la Iowa State University, donde se encargó la obtención del maíz transgénico, nos envió las semillas procedentes de las plantas derivadas de los callos transformados y regeneradas por ellos (semillas T1) y no sabíamos el número de inserciones del T-

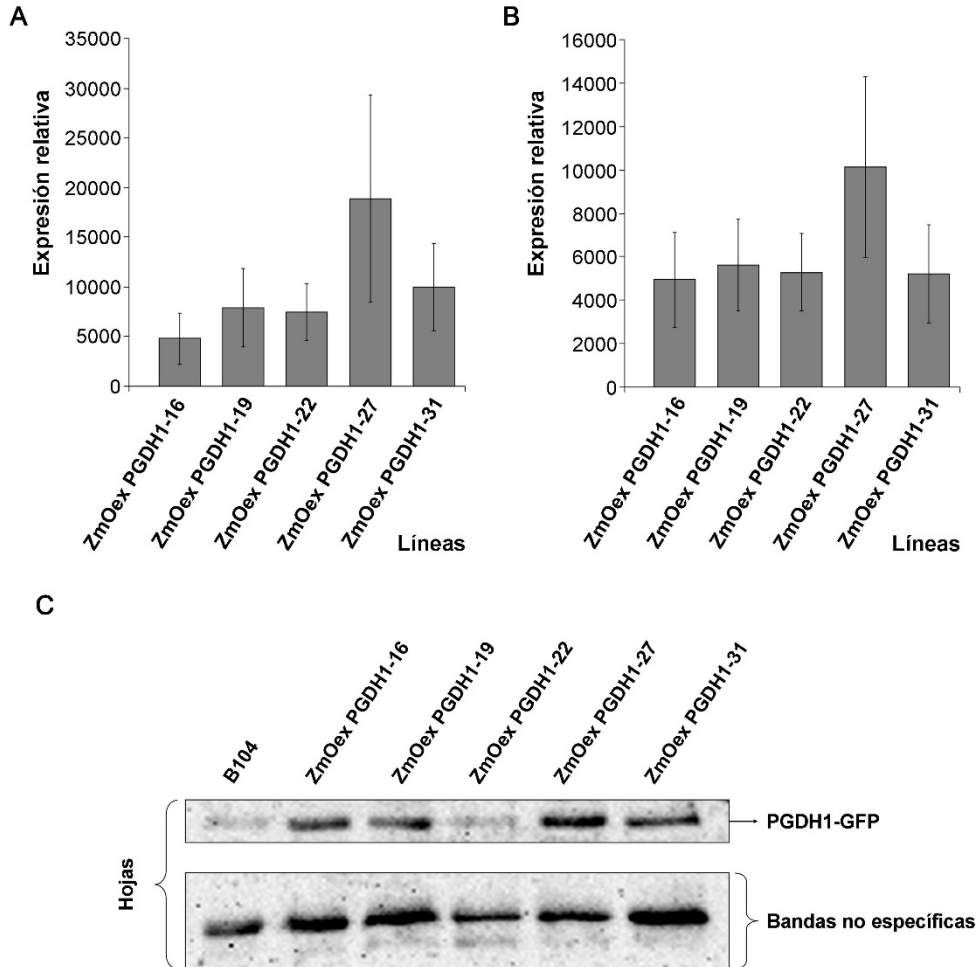
DNA de las plantas transgénicas originales, procedimos a su siembra y autopolinización para poder llegar a tener plantas homocigotas de una inserción.

Recibimos un total de 11 líneas de eventos independientes de transformación (ZmOex PGDH1-9, ZmOex PGDH1-11, ZmOex PGDH1-12, ZmOex PGDH1-16, ZmOex PGDH1-19, ZmOex PGDH1-22, ZmOex PGDH1-23, ZmOex PGDH1-27, ZmOex PGDH1-29, ZmOex PGDH1-31, y ZmOex PGDH1-33) y un control (B104), y de cada una de ellas el número de semillas enviadas fue diferente (desde 17 semillas en la línea 9 a las más de 1000 en la línea 11). Una vez sembradas las semillas y germinadas se procedió a la identificación de las plantas que presentaban el transgén mediante PCR y, también, con un ensayo de tolerancia a BASTA. Mientras que las semillas de las líneas ZmOex PGDH1-12 y ZmOex PGDH1-33 no germinaron, todas las plántulas obtenidas de las líneas ZmOex PGDH1-9 y ZmOex PGDH1-29 fueron negativas para el transgén. En el resto de líneas aparecieron plantas positivas o negativas para la presencia del transgén, y con las positivas se hicieron dos grupos: uno de ellos se utilizó para hacer un análisis de la expresión, y el otro se dejó crecer para autopolinizarse y que nos dieran la siguiente generación.

Con las 7 líneas transgénicas viables se estudió la expresión tanto en hojas como en raíces y en ambos casos casi todas las líneas presentaron una elevada expresión del gen *PGDH1*, a excepción de las líneas ZmOex PGDH1-11 y ZmOex PGDH1-23 que tenían una expresión similar al control. De las líneas sobreexpresoras, la que mayor expresión tenía era la línea ZmOex PGDH1-27 tanto en hojas como en raíces, mientras que la línea con un menor nivel de expresión en ambos órganos fue ZmOex PGDH1-16 (Figura 4.17A y B). Hay que tener en cuenta que el gen introducido y analizado es un gen procedente del genoma de *Arabidopsis* y, por tanto, heterólogo al genoma del maíz. Es por ello que los niveles de expresión son elevados, ya que las plantas silvestres del maíz con las que se comparan no lo tienen y solamente existía una muy baja expresión residual (seguramente de su propio gen endógeno). En paralelo a los estudios de expresión se analizó el nivel de expresión de la proteína PGDH1-GFP en cada una de las líneas transgénicas de maíz junto con la línea control (B104) en hoja (Figura 4.17C). En todas las líneas se observó la banda específica de la proteína PGDH1-GFP con distintas intensidades siendo las líneas ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31 las que mayor señal de banda presentaban (Figura 4.17C). La línea ZmOex PGDH1-22 era la línea con menor intensidad de banda, sin embargo, al observar la carga de la muestra era la que menor carga presentaba (Figura 4.17C). De los estudios de expresión, se

## 4. RESULTADOS

seleccionaron para su posterior caracterización las líneas ZmOex PGDH1-22, ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31.



**Figura 4.17.** Análisis por qRT-PCR en hojas (A) y en raíces (B) de la expresión del gen *PGDH1* de *Arabidopsis* en plantas transgénicas de maíz (ZmOex PGDH1) cultivadas durante 20 días en condiciones de invernadero. Únicamente se muestran las líneas que fueron significativamente diferentes respecto al control B104. Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n = 3$  réplicas biológicas independientes). (C) Análisis por Western blot que muestra la expresión de la proteína de fusión PGDH1-GFP en hojas de maíz de la línea control (B104) y en las líneas transgénicas de maíz sobreexpresoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis*. Las plantas fueron crecidas en invernadero. La señal de una banda no específica se muestra como control de carga de las muestras.

## 4.7 Caracterización de las líneas TriOex de *Arabidopsis thaliana*

Las líneas TriOex seleccionadas a partir de los datos de expresión obtenidos por qRT-PCR se caracterizaron fenotípicamente en condiciones *in vitro* con CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm) y con alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm). Junto con estas líneas TriOex se ensayaron las dos líneas Oex PGDH1.

De las seis líneas sobreexpresoras crecidas *in vitro* en medio MS1/5 y cultivadas en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la parte aérea respecto a la línea control (WT), salvo en la línea triple sobreexpresora TriOex2-49 y la línea Oex PGDH1-L2 de la que deriva, que presentaron un menor crecimiento de la parte aérea (Figura 4.18A).

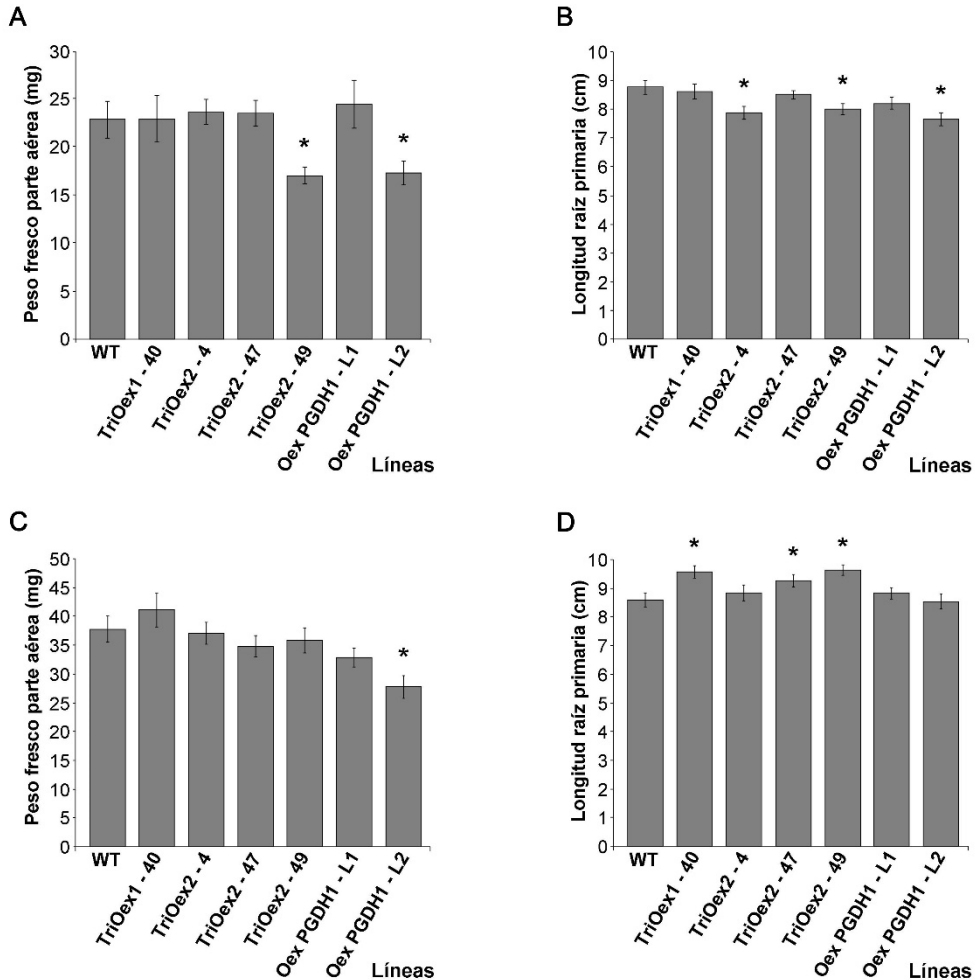
Por otro lado, también se determinó la longitud de la raíz principal en las mismas condiciones indicadas anteriormente, y los resultados obtenidos muestran que la mitad de las líneas analizadas presentaban una longitud menor de la raíz principal al ser comparadas con el WT (esta disminución se encontró en un rango del 10-20%). En concreto, las líneas que presentaban este fenotipo eran dos líneas triples sobreexpresoras (TriOex2-4, TriOex2-49) y la línea Oex PGDH1-L2 de la que derivan (Figura 4.18B).

Los ensayos de caracterización fenotípica *in vitro* también se realizaron en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, para estudiar el papel de la RFBS cuando la ruta del Glicolato, asociada a la fotorrespiración, presenta una menor actividad. Al medir el peso fresco de la parte aérea se observó que era mayor en todas las líneas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (con incrementos entre un 35% hasta incluso más del doble en una de las líneas) comparándolo con ellas mismas en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Figura 4.18A y C). En este ensayo no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la parte aérea en ninguna de las líneas TriOex comparadas con el control. Solo se observó una disminución del peso de la parte aérea entorno a un 25% en la línea Oex PGDH1-L2 (Figura 4.18C).

También se analizó el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de alto CO<sub>2</sub>. En este caso, al contrario de lo que ocurría en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental, sí que se apreció un aumento significativo de la longitud de la raíz primaria en 3

## 4. RESULTADOS

líneas al compararlas con el control. Este fenotipo se presentaba en tres de las cuatro líneas TriOex (TriOex1-40, TriOex2-47 y TriOex2-49) con un incremento entre un 7-12% de la raíz primaria en comparación con el control (Figura 4.18D).



**Figura 4.18.** Caracterización fenotípica de las líneas triple sobreexpresoras (TriOex) y sobreexpresoras del gen *PGDH1* (Oex *PGDH1*) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm) (A y B) y de alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm) (C y D) de plántulas de 14 días crecidas *in vitro*. Para ambas condiciones se midió el peso fresco de la parte aérea (A y C) y la longitud de la raíz primaria (B y D). Los valores representan la media  $\pm$  SE ( $n \geq 100$ ). (\*) indica diferencias significativas respecto al WT (T-test,  $P < 0,05$ ).

## 4.8 Análisis metabólico de las líneas sobreexpresoras de la RFBS en *Arabidopsis thaliana*

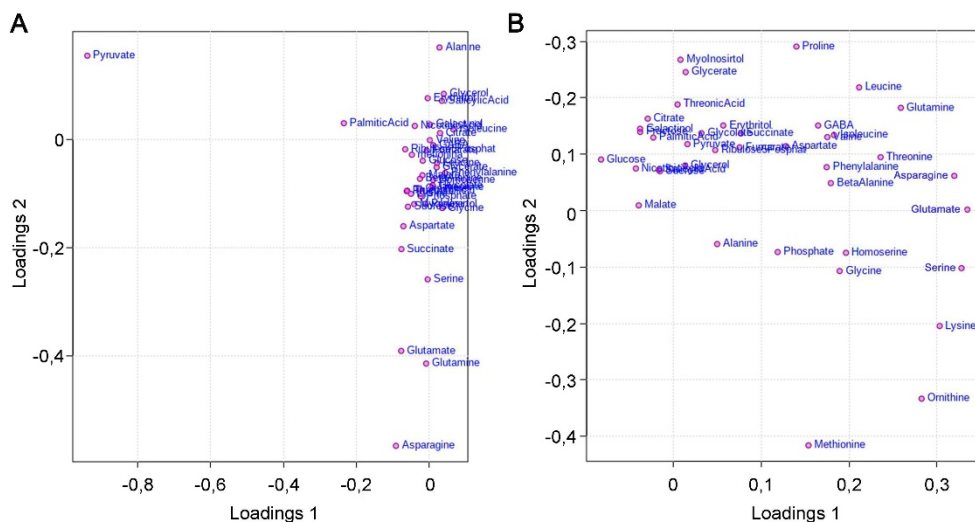
Una vez caracterizados los parámetros de crecimiento de las líneas sobreexpresoras de la RFBS procedimos a estudiar los cambios metabólicos en estas líneas en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental y de alto CO<sub>2</sub>. Al analizar y comparar los valores relativos de los metabolitos en las líneas sobreexpresoras respecto al control, en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental, se observó un aumento en el contenido de aminoácidos a nivel general en la mayoría de las líneas sobreexpresoras, entre los que cabe destacar a la treonina, asparagina, aspartato, glutamato y glutamina, que forman parte del grupo de aminoácidos más abundantes en las plantas (aspartato y glutamato) y son las principales formas de transporte de nitrógeno orgánico (aspartato, glutamato, asparagina, glutamina) (Tabla 4.9). Tras realizar un PCA también pudimos observar que tres de estos metabolitos (asparagina, glutamina y glutamato) eran los responsables principales de estas diferencias respecto al control (Figura 4.19A). Los niveles de estos aminoácidos se incrementaron en la mayoría de las líneas sobreexpresoras, y en el caso de la glutamina y el glutamato este aumento fue significativo en las dos líneas Oex PGDH1 (Oex PGDH1-L1 y L2) y en tres de las cuatro TriOex (TriOex1-40, TriOex2-4 y TriOex2-47). Para la asparagina los cambios fueron significativos en las dos líneas Oex PGDH1 y la línea TriOex2-4 (Tabla 4.9). Al analizar el contenido relativo de serina en las dos líneas Oex PGDH1 y las líneas TriOex, se observó un incremento en todas ellas respecto del control, siendo la línea TriOex1-40 la que menor incremento en el contenido relativo de serina presentaba. Cuando se compararon los niveles de serina entre las líneas TriOex respecto a las líneas Oex PGDH1 lo que se observó a grandes rasgos es que no había diferencias significativas entre ellas, pero con valores algo inferiores (Tabla 4.9 y Figura 4.20A).

También se llevó a cabo un estudio metabólico de estas líneas en condiciones de alto CO<sub>2</sub>. En estas condiciones, en la parte aérea se observaron cambios importantes en los niveles de aminoácidos, presentando un incremento generalizado del contenido de estos respecto del control. Estos cambios son mucho más pronunciados que cuando las plantas crecieron en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Tablas 4.9 y 4.10). Si observamos los metabolitos que explican las diferencias, según el PCA, vemos que en este caso están implicados la mayoría de los aminoácidos, entre ellos la serina (Figura 4.19B). El contenido relativo de serina

de las líneas sobreexpresoras respecto del control fue mayor en todas ellas, siendo nuevamente la línea TriOex1-40 la que presentaba un menor incremento en el contenido de serina (Figura 4.20B). Al igual que ocurría en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental, las líneas TriOex mostraron valores de serina similares a los valores de las líneas Oex PGDH1, a excepción de la TriOex1-40 que mostraba valores significativamente inferiores al resto de las líneas sobreexpresoras (Figura 4.20B). Otro cambio importante observado en las líneas sobreexpresoras y que no se observó cuando las plantas se cultivaron con niveles de CO<sub>2</sub> ambiental, fue la bajada drástica en la mayoría de las líneas sobreexpresoras de los niveles de azúcares solubles fructosa y glucosa, que en algunas líneas llegó a reducirse más del 75% (Tabla 4.10).

Cuando comparamos el incremento del contenido de serina entre condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental y condiciones de alto CO<sub>2</sub> observamos que las diferencias entre las plantas sobreexpresoras y los controles siempre fueron mayores en alto CO<sub>2</sub> (Tablas 4.9 y 4.10 y Figura 4.20A y B). Por ello también comparamos los niveles de metabolitos de las líneas crecidas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> respecto al control cultivado bajo condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Tabla 4.11).

En primer lugar, se observó una disminución en el contenido relativo de más de la mitad de los aminoácidos analizados en las plantas control crecidas con alto CO<sub>2</sub> comparadas con los controles cultivados en CO<sub>2</sub> ambiental, siendo la mayor disminución en la glicina que llegó a reducirse más del 80%. Sin embargo, esta disminución fue menos marcada en las líneas sobreexpresoras que en el control (por ejemplo, homoserina, isoleucina, leucina, lisina u ornitina) e incluso en algunos casos, en lugar de disminuir aumentó, como es el caso de la treonina o de la serina (Tabla 4.11). El nivel de serina en plantas control crecidas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> también fue inferior significativamente (con una reducción cercana a 50%) a su valor en plantas crecidas en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Tabla 4.11 y Figura 4.20C). Cabe destacar que en tres de las seis líneas sobreexpresoras los niveles de este aminoácido fueron incluso más altos que los valores del control crecido en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Figura 4.20C). Resultados similares se obtuvieron con la treonina, con valores inferiores en el control crecido en alto CO<sub>2</sub> y valores superiores en las líneas sobreexpresoras, cuando se comparan con el control crecido en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> (Tabla 4.11).

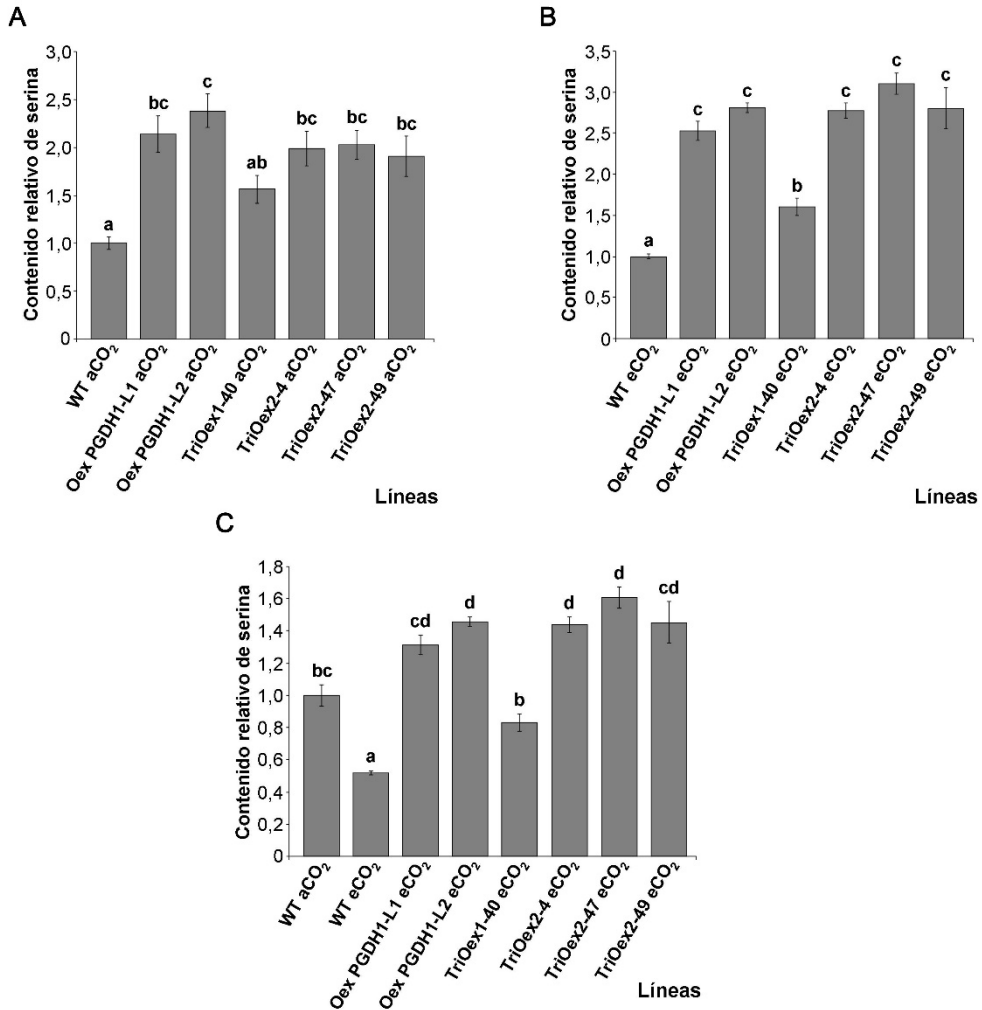


**Figura 4.19.** Metabolitos de la parte aérea que explican las diferencias entre condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm) (A) y condiciones de alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm) (B) de las líneas Oex PGDH1 y TriOex respecto al control de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

Por el contrario, otros aminoácidos como asparagina, aspartato, glutamato y glutamina aumentaron en todas las líneas crecidas en alto CO<sub>2</sub> (incluso en el control) al compararlas con el control crecido en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub>. En estos aminoácidos también se observó que las líneas sobreexpresoras tienen niveles superiores al control crecido en las mismas condiciones (Tabla 4.11).

Por último, otros de los cambios que también se observaron en la parte aérea es un incremento generalizado de los ácidos orgánicos como citrato, fumarato, malato, o succinato que son intermediarios del ciclo de Krebs, y de casi todos los azúcares analizados en condiciones de alto CO<sub>2</sub> respecto a CO<sub>2</sub> ambiental, siendo la fructosa el metabolito con el mayor incremento que se da en todas las líneas, incluido en el control crecido en alto CO<sub>2</sub> (Tabla 4.11). Resaltar que estos cambios se observaron en todas las líneas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> incluidos los controles por lo que no deberían estar relacionadas con la sobreexpresión de los genes de la RFBS sino con las condiciones de cultivo, en este caso condiciones no fotorrespiratorias.





**Figura 4.20.** Contenido relativo de serina en parte aérea en las líneas Oex PGDH1 y TriOex (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49). Los valores están normalizados respecto a la media del control (WT) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm) (A) y en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm) (B). (C) Contenido relativo de serina de las líneas Oex PGDH1 y TriOex en condiciones de eCO<sub>2</sub> respecto al WT en aCO<sub>2</sub> (los valores están normalizados respecto a la media del WT en condiciones de aCO<sub>2</sub>). Los valores representan la media  $\pm$  SE,  $n \geq 6$  pools de 40 plantas para cada genotipo. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Los resultados más detallados se presentan en las Tablas 4.9, 4.10 y 4.11.

**Tabla 4.9.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al WT están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	Oex PGDH1 L1 aCO <sub>2</sub>	Oex PGDH1 L2 aCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 aCO <sub>2</sub>
<b>Aminoácidos</b>							
Ácido aspártico	1±0,06	<b>1,41±0,13</b>	<b>1,65±0,06</b>	<b>1,27±0,07</b>	<b>1,30±0,08</b>	<b>1,36±0,11</b>	<b>1,39±0,15</b>
Alanina	1±0,11	0,80±0,13	1,06±0,19	1,00±0,16	0,84±0,13	0,91±0,17	0,90±0,18
Alanina, β	1±0,03	<b>1,18±0,07</b>	<b>1,34±0,02</b>	<b>1,31±0,08</b>	<b>1,26±0,06</b>	1,15±0,10	1,31±0,14
Asparagina	1±0,19	<b>2,00±0,40</b>	<b>2,62±0,70</b>	1,66±0,32	<b>1,89±0,34</b>	1,94±0,43	1,55±0,31
Fenilalanina	1±0,03	1,08±0,07	1,04±0,03	<b>1,17±0,05</b>	<b>1,12±0,03</b>	1,02±0,05	1,05±0,09
Glicina	1±0,04	<b>1,43±0,08</b>	<b>1,65±0,13</b>	<b>1,33±0,13</b>	1,11±0,05	1,12±0,06	0,88±0,06
Glutamato	1±0,08	<b>1,86±0,23</b>	<b>1,71±0,26</b>	<b>1,50±0,18</b>	<b>1,82±0,25</b>	<b>1,64±0,26</b>	1,34±0,21
Glutamina	1±0,13	<b>2,14±0,22</b>	<b>2,03±0,14</b>	<b>1,96±0,37</b>	<b>2,47±0,12</b>	<b>1,99±0,40</b>	1,45±0,24
Homoserina	1±0,05	1,16±0,10	1,14±0,07	1,17±0,07	1,11±0,05	1,10±0,05	0,94±0,04
Isoleucina	1±0,03	<b>1,15±0,05</b>	<b>1,13±0,03</b>	<b>1,18±0,07</b>	1,09±0,05	0,97±0,04	1,09±0,07
Leucina	1±0,04	1,16±0,08	<b>1,18±0,02</b>	1,12±0,08	1,06±0,05	0,99±0,05	1,07±0,08
Lisina	1±0,08	1,20±0,09	1,01±0,08	1,15±0,12	<b>1,32±0,07</b>	<b>1,29±0,06</b>	1,13±0,11
Metionina	1±0,04	1,14±0,11	0,98±0,04	<b>1,19±0,06</b>	1,23±0,12	<b>1,30±0,12</b>	1,17±0,14
Ornitina	1±0,08	1,27±0,13	1,14±0,16	1,03±0,07	1,20±0,05	<b>1,44±0,13</b>	0,88±0,07
Prolina	1±0,06	1,14±0,12	1,20±0,09	1,26±0,11	1,04±0,07	<b>0,81±0,05</b>	0,99±0,09
Serina	1±0,07	<b>2,14±0,19</b>	<b>2,38±0,18</b>	<b>1,56±0,15</b>	<b>1,99±0,18</b>	<b>2,03±0,15</b>	<b>1,90±0,21</b>
Treonina	1±0,03	<b>1,40±0,08</b>	<b>1,46±0,04</b>	<b>1,33±0,08</b>	<b>1,44±0,07</b>	<b>1,32±0,06</b>	<b>1,33±0,11</b>
Valina	1±0,02	<b>1,18±0,05</b>	<b>1,28±0,02</b>	<b>1,20±0,07</b>	<b>1,17±0,04</b>	1,04±0,08	1,08±0,06

## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.9.** Continuación

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	Oex PGDH1 L1 aCO <sub>2</sub>	Oex PGDH1 L2 aCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 aCO <sub>2</sub>
<b>Ácidos orgánicos</b>							
Ácido nicotínico	1±0,05	<b>0,54±0,06</b>	<b>0,50±0,02</b>	0,80±0,08	<b>0,52±0,04</b>	<b>0,56±0,05</b>	<b>0,60±0,07</b>
Ácido palmítico	1±0,08	<b>1,27±0,09</b>	1,17±0,06	1,42±0,26	1,20±0,14	1,52±0,25	1,85±0,47
Ácido salicílico	1±0,20	1,09±0,17	1,21±0,23	<b>1,87±0,26</b>	1,15±0,15	1,25±0,22	<b>2,27±0,38</b>
Ácido treónico	1±0,07	1,17±0,12	<b>1,26±0,07</b>	1,21±0,09	1,10±0,09	1,10±0,14	1,30±0,17
Citrato	1±0,04	0,94±0,05	<b>1,30±0,06</b>	0,88±0,04	0,86±0,06	0,91±0,06	0,89±0,06
Fumarato	1±0,04	0,89±0,07	0,92±0,13	1,09±0,06	0,94±0,03	<b>0,80±0,06</b>	0,88±0,06
Glicerato	1±0,06	0,85±0,05	1,09±0,09	1,04±0,06	0,94±0,08	0,84±0,05	0,84±0,05
Glicolato	1±0,08	1,10±0,05	<b>1,33±0,11</b>	1,15±0,10	0,99±0,07	0,76±0,18	1,01±0,05
Malato	1±0,04	0,96±0,05	<b>1,40±0,04</b>	1,06±0,05	1,09±0,06	1,00±0,06	1,02±0,09
Piruvato	1±0,32	2,94±1,54	-	1,23±0,60	-	<b>4,11±1,54</b>	2,72±0,74
Succinato	1±0,07	<b>1,40±0,12</b>	<b>1,71±0,06</b>	1,27±0,12	1,26±0,15	1,30±0,20	1,36±0,16
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>							
Eritritol	1±0,04	1,02±0,04	1,03±0,03	1,13±0,07	0,95±0,03	0,90±0,03	1,01±0,02
Fructosa	1±0,06	1,05±0,09	1,15±0,12	1,21±0,10	0,78±0,08	0,94±0,12	1,06±0,08
Galactinol	1±0,04	1,03±0,04	<b>1,12±0,03</b>	1,11±0,11	1,02±0,03	0,95±0,03	1,07±0,04
Glicerol	1±0,14	0,98±0,05	1,10±0,02	1,09±0,14	0,84±0,10	0,84±0,04	0,90±0,04
Glucosa	1±0,05	0,94±0,08	1,13±0,05	<b>1,34±0,12</b>	0,95±0,03	1,02±0,07	<b>1,34±0,11</b>
Myo-Inositol	1±0,05	1,19±0,09	<b>1,31±0,03</b>	<b>1,22±0,05</b>	1,15±0,06	1,01±0,05	1,06±0,06
Ribulosa 5P	1±0,02	1,04±0,04	<b>1,36±0,06</b>	<b>1,30±0,11</b>	<b>1,18±0,07</b>	1,19±0,09	<b>1,27±0,06</b>
Sacarosa	1±0,04	1,03±0,08	<b>1,19±0,07</b>	<b>1,18±0,06</b>	<b>1,29±0,11</b>	1,21±0,09	1,15±0,11
<b>Otros</b>							
Fosfato	1±0,10	1,04±0,14	1,33±0,14	0,79±0,10	<b>0,57±0,07</b>	0,84±0,11	0,73±0,11
GABA	1±0,09	1,10±0,07	1,14±0,11	1,00±0,12	1,04±0,12	0,91±0,09	0,85±0,11

**Tabla 4.10.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al WT están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Metabolito	WT eCO <sub>2</sub>	Oex PGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 eCO <sub>2</sub>
<b>Aminoácidos</b>							
Ácido aspártico	1±0,02	<b>1,74±0,08</b>	<b>1,62±0,07</b>	<b>1,33±0,03</b>	<b>1,45±0,21</b>	<b>1,59±0,08</b>	<b>1,62±0,07</b>
Alanina	1±0,11	0,74±0,16	0,80±0,12	0,92±0,11	<b>0,63±0,09</b>	0,99±0,21	1,14±0,21
Alanina, β	1±0,09	<b>1,47±0,10</b>	<b>1,65±0,07</b>	<b>1,42±0,13</b>	<b>1,77±0,11</b>	<b>1,75±0,22</b>	<b>1,67±0,18</b>
Asparagina	1±0,12	<b>2,10±0,27</b>	<b>1,93±0,24</b>	1,73±0,35	<b>2,91±0,64</b>	<b>2,27±0,41</b>	1,70±0,34
Fenilalanina	1±0,05	<b>1,35±0,13</b>	<b>1,73±0,09</b>	<b>1,51±0,05</b>	<b>2,31±0,36</b>	<b>1,98±0,17</b>	<b>1,53±0,08</b>
Glicina	1±0,05	<b>1,46±0,11</b>	<b>1,77±0,10</b>	<b>1,50±0,14</b>	<b>1,66±0,1</b>	<b>1,79±0,11</b>	<b>1,43±0,16</b>
Glutamato	1±0,05	<b>1,85±0,12</b>	<b>2,11±0,12</b>	<b>1,70±0,17</b>	<b>2,54±0,07</b>	<b>2,20±0,15</b>	<b>1,72±0,20</b>
Glutamina	1±0,13	<b>1,91±0,16</b>	<b>1,61±0,12</b>	<b>1,41±0,10</b>	<b>2,81±0,21</b>	<b>1,79±0,11</b>	1,22±0,18
Homoserina	1±0,05	<b>1,30±0,09</b>	<b>1,62±0,11</b>	<b>1,52±0,18</b>	<b>1,70±0,15</b>	<b>1,89±0,17</b>	1,29±0,19
Isoleucina	1±0,03	<b>1,51±0,09</b>	<b>1,52±0,03</b>	<b>1,39±0,07</b>	<b>1,94±0,11</b>	<b>1,65±0,14</b>	<b>1,68±0,11</b>
Leucina	1±0,03	<b>1,51±0,10</b>	<b>1,53±0,03</b>	<b>1,37±0,05</b>	<b>2,01±0,15</b>	<b>1,71±0,16</b>	<b>1,78±0,13</b>
Lisina	1±0,06	<b>1,37±0,14</b>	<b>1,98±0,16</b>	<b>1,85±0,26</b>	<b>2,60±0,20</b>	<b>2,55±0,33</b>	<b>1,95±0,23</b>
Metionina	1±0,12	1,11±0,15	<b>2,03±0,31</b>	<b>2,08±0,29</b>	1,54±0,41	<b>1,89±0,36</b>	<b>1,91±0,39</b>
Ornitina	1±0,06	1,18±0,12	<b>1,90±0,31</b>	<b>1,97±0,29</b>	<b>2,73±0,24</b>	<b>3,08±0,27</b>	<b>1,69±0,28</b>
Prolina	1±0,02	<b>1,83±0,14</b>	<b>1,38±0,06</b>	<b>1,22±0,05</b>	<b>2,02±0,54</b>	<b>1,26±0,08</b>	<b>1,68±0,23</b>
Serina	1±0,03	<b>2,53±0,12</b>	<b>2,81±0,06</b>	<b>1,61±0,10</b>	<b>2,78±0,10</b>	<b>3,11±0,13</b>	<b>2,80±0,25</b>
Treonina	1±0,02	<b>1,79±0,11</b>	<b>2,02±0,04</b>	<b>1,57±0,08</b>	<b>2,16±0,08</b>	<b>2,21±0,09</b>	<b>2,01±0,15</b>
Valina	1±0,03	<b>1,59±0,08</b>	<b>1,58±0,04</b>	<b>1,33±0,05</b>	<b>1,85±0,10</b>	<b>1,66±0,12</b>	<b>1,57±0,09</b>

Tabla 4.10. Continuación

Metabolito	WT eCO2	Oex PGDH1 L1 eCO2	OexPGDH1 L2 eCO2	TriOex1-40 eCO2	TriOex2-4 eCO2	TriOex2-47 eCO2	TriOex2-49 eCO2
<b>Ácidos orgánicos</b>							
Ácido nicotínico	1±0,07	<b>0,34±0,02</b>	<b>0,31±0,02</b>	1,02±0,04	<b>0,48±0,04</b>	<b>0,38±0,06</b>	<b>0,66±0,07</b>
Ácido palmítico	1±0,17	0,86±0,06	2,38±1,60	0,98±0,19	0,95±0,10	0,96±0,06	1,20±0,19
Ácido salicílico	1±0,21	1,13±0,13	1,06±0,17	0,82±0,13	0,85±0,12	1,00±0,08	1,03±0,14
Ácido treónico	1±0,08	<b>1,51±0,06</b>	1,05±0,11	1,07±0,08	<b>1,28±0,08</b>	1,12±0,08	<b>1,41±0,15</b>
Citrato	1±0,05	1,11±0,06	0,89±0,07	<b>0,80±0,04</b>	<b>1,20±0,05</b>	0,94±0,07	1,01±0,12
Fumarato	1±0,04	1,13±0,04	1,05±0,07	1,04±0,07	0,91±0,23	1,02±0,05	1,13±0,08
Glicerato	1±0,08	0,96±0,09	<b>0,54±0,03</b>	0,81±0,07	0,76±0,06	<b>0,55±0,06</b>	1,60±0,32
Glicolato	1±0,05	1,05±0,05	0,92±0,11	0,96±0,07	0,99±0,11	<b>0,81±0,07</b>	1,04±0,11
Malato	1±0,06	<b>1,17±0,05</b>	1,19±0,12	0,87±0,07	<b>1,56±0,08</b>	1,08±0,05	1,10±0,14
Piruvato	1±0,08	1,13±0,23	1,37±0,22	0,75±0,23	0,89±0,07	<b>0,59±0,15</b>	0,85±0,17
Succinato	1±0,03	<b>1,68±0,07</b>	<b>1,82±0,11</b>	1,07±0,04	<b>1,50±0,06</b>	<b>1,27±0,11</b>	<b>1,38±0,08</b>
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>							
Eritritol	1±0,03	1,13±0,06	1,09±0,05	<b>1,14±0,04</b>	0,92±0,06	0,89±0,14	<b>1,14±0,05</b>
Fructosa	1±0,05	1,04±0,03	<b>0,42±0,09</b>	<b>0,61±0,08</b>	<b>0,55±0,04</b>	<b>0,32±0,03</b>	<b>0,64±0,13</b>
Galactinol	1±0,08	<b>1,29±0,08</b>	0,88±0,09	0,89±0,06	0,92±0,06	0,83±0,04	1,07±0,11
Glicerol	1±0,36	0,68±0,08	0,77±0,13	0,76±0,11	0,67±0,09	0,79±0,10	0,89±0,19
Glucosa	1±0,12	1,04±0,10	<b>0,30±0,08</b>	<b>0,49±0,14</b>	<b>0,35±0,06</b>	<b>0,23±0,03</b>	<b>0,32±0,02</b>
Myo-Inositol	1±0,09	<b>1,98±0,08</b>	1,03±0,15	0,94±0,11	<b>1,43±0,13</b>	1,01±0,06	1,35±0,21
Ribulosa 5P	1±0,05	<b>1,33±0,07</b>	<b>1,31±0,04</b>	1,26±0,12	<b>1,22±0,05</b>	<b>1,58±0,14</b>	<b>1,55±0,09</b>
Sacarosa	1±0,02	<b>1,21±0,05</b>	1,00±0,05	1,09±0,05	<b>1,21±0,05</b>	<b>1,08±0,03</b>	<b>1,29±0,08</b>
<b>Otros</b>							
Fosfato	1±0,04	<b>1,16±0,05</b>	1,43±0,22	1,23±0,20	1,13±0,10	<b>1,31±0,06</b>	<b>1,34±0,14</b>
GABA	1±0,07	<b>1,35±0,10</b>	0,98±0,06	<b>1,24±0,06</b>	<b>2,02±0,15</b>	<b>1,44±0,10</b>	<b>1,22±0,06</b>

**Tabla 4.11.** Niveles de metabolitos en la parte aérea de la línea control (WT), las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm) comparados con el WT crecido en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT en CO<sub>2</sub> ambiental (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al WT están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	WT eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 eCO <sub>2</sub>
Aminoácidos								
Ácido aspártico	1±0,06	<b>1,19±0,03</b>	<b>2,06±0,09</b>	<b>1,92±0,08</b>	<b>1,58±0,04</b>	<b>1,72±0,26</b>	<b>1,88±0,10</b>	<b>1,92±0,08</b>
Alanina	1±0,11	0,75±0,08	<b>0,55±0,12</b>	<b>0,60±0,09</b>	0,69±0,08	<b>0,47±0,07</b>	0,74±0,16	0,85±0,16
Alanina, β	1±0,03	0,85±0,07	<b>1,26±0,08</b>	<b>1,41±0,06</b>	1,21±0,11	<b>1,51±0,10</b>	<b>1,49±0,19</b>	<b>1,42±0,15</b>
Asparagina	1±0,19	<b>1,74±0,20</b>	<b>3,65±0,48</b>	<b>3,35±0,42</b>	<b>3,01±0,62</b>	<b>5,05±1,12</b>	<b>3,94±0,71</b>	<b>2,96±0,59</b>
Fenilalanina	1±0,03	<b>0,70±0,04</b>	0,94±0,09	<b>1,21±0,07</b>	1,06±0,03	<b>1,61±0,25</b>	<b>1,38±0,12</b>	1,07±0,05
Glicina	1±0,04	<b>0,17±0,01</b>	<b>0,25±0,02</b>	<b>0,31±0,02</b>	<b>0,26±0,02</b>	<b>0,29±0,02</b>	<b>0,31±0,02</b>	<b>0,25±0,03</b>
Glutamato	1±0,08	<b>1,19±0,06</b>	<b>2,19±0,14</b>	<b>2,50±0,14</b>	<b>2,02±0,21</b>	<b>3,02±0,09</b>	<b>2,61±0,18</b>	<b>2,05±0,23</b>
Glutamina	1±0,13	<b>6,92±0,88</b>	<b>13,22±1,11</b>	<b>9,73±1,55</b>	<b>9,73±0,70</b>	<b>19,43±1,48</b>	<b>12,41±0,74</b>	<b>8,42±1,22</b>
Homoserina	1±0,05	<b>0,59±0,03</b>	<b>0,76±0,05</b>	0,95±0,07	0,89±0,11	1,00±0,09	1,11±0,10	0,76±0,11
Isoleucina	1±0,03	<b>0,55±0,02</b>	<b>0,83±0,05</b>	<b>0,84±0,02</b>	<b>0,77±0,04</b>	1,07±0,06	0,91±0,08	0,93±0,06
Leucina	1±0,04	<b>0,51±0,02</b>	<b>0,78±0,05</b>	<b>0,78±0,02</b>	<b>0,70±0,03</b>	1,03±0,08	0,88±0,08	0,91±0,06
Lisina	1±0,08	<b>0,42±0,02</b>	<b>0,57±0,06</b>	0,82±0,07	0,77±0,11	0,91±0,18	1,06±0,14	0,81±0,10
Metionina	1±0,04	0,40±0,05	<b>0,44±0,06</b>	0,80±0,12	0,83±0,12	<b>0,61±0,16</b>	0,75±0,14	0,76±0,15
Ornitina	1±0,08	<b>0,39±0,02</b>	<b>0,46±0,05</b>	0,74±0,12	0,77±0,11	1,06±0,09	1,20±0,10	<b>0,66±0,11</b>
Prolina	1±0,06	<b>0,24±0,01</b>	<b>0,45±0,03</b>	<b>0,34±0,01</b>	<b>0,30±0,01</b>	<b>0,49±0,13</b>	<b>0,31±0,02</b>	<b>0,41±0,06</b>
Serina	1±0,07	<b>0,52±0,01</b>	<b>1,31±0,06</b>	<b>1,46±0,03</b>	0,83±0,05	<b>1,44±0,05</b>	<b>1,61±0,07</b>	<b>1,45±0,13</b>
Treonina	1±0,03	<b>0,63±0,02</b>	1,12±0,07	<b>1,27±0,02</b>	0,98±0,05	<b>1,36±0,05</b>	<b>1,39±0,06</b>	<b>1,26±0,09</b>
Valina	1±0,02	<b>0,63±0,02</b>	1,01±0,05	1,01±0,02	<b>0,85±0,03</b>	<b>1,17±0,06</b>	1,05±0,07	1,00±0,06

## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.11.** Continuación

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	WT eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 eCO <sub>2</sub>
<b>Ácidos orgánicos</b>								
Ácido nicotínico	1±0,05	<b>1,48±0,10</b>	<b>0,51±0,03</b>	<b>0,45±0,03</b>	<b>1,51±0,07</b>	<b>0,7±0,06</b>	<b>0,57±0,09</b>	0,97±0,10
Ácido palmítico	1±0,08	1,21±0,20	1,03±0,08	0,94±0,08	1,18±0,23	1,14±0,12	1,16±0,07	1,44±0,23
Ácido salicílico	1±0,20	1,33±0,29	1,51±0,17	1,41±0,23	1,09±0,17	1,14±0,15	1,34±0,11	1,37±0,18
Ácido treónico	1±0,07	<b>1,57±0,12</b>	<b>2,36±0,09</b>	<b>1,65±0,17</b>	<b>1,68±0,12</b>	<b>2,01±0,13</b>	<b>1,76±0,12</b>	<b>2,20±0,23</b>
Citrato	1±0,04	<b>2,20±0,10</b>	<b>2,45±0,13</b>	<b>1,96±0,15</b>	<b>1,76±0,10</b>	<b>2,65±0,12</b>	<b>2,06±0,16</b>	<b>2,22±0,27</b>
Fumarato	1±0,04	<b>2,26±0,10</b>	<b>2,55±0,10</b>	<b>2,38±0,17</b>	<b>2,36±0,15</b>	<b>2,57±0,10</b>	<b>2,30±0,11</b>	<b>2,56±0,19</b>
Glicerato	1±0,06	<b>2,11±0,17</b>	<b>2,02±0,18</b>	1,14±0,07	<b>1,72±0,15</b>	<b>1,61±0,13</b>	1,17±0,12	<b>3,37±0,67</b>
Glicolato	1±0,08	<b>1,29±0,06</b>	<b>1,36±0,06</b>	1,18±0,14	1,24±0,09	1,28±0,15	1,05±0,09	1,34±0,14
Malato	1±0,04	<b>2,33±0,14</b>	<b>2,74±0,12</b>	<b>2,77±0,27</b>	<b>2,02±0,17</b>	<b>3,64±0,18</b>	<b>2,53±0,12</b>	<b>2,57±0,33</b>
Piruvato	1±0,32	<b>2,44±0,20</b>	<b>3,15±0,50</b>	<b>3,35±0,54</b>	1,84±0,57	<b>2,16±0,17</b>	1,44±0,37	2,09±0,41
Succinato	1±0,07	<b>1,34±0,04</b>	<b>2,25±0,10</b>	<b>2,43±0,15</b>	<b>1,43±0,06</b>	<b>2,01±0,08</b>	<b>1,70±0,15</b>	<b>1,84±0,10</b>
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>								
Eritritol	1±0,04	<b>0,49±0,02</b>	<b>0,55±0,03</b>	<b>0,53±0,03</b>	<b>0,56±0,02</b>	<b>0,45±0,03</b>	<b>0,43±0,07</b>	<b>0,56±0,02</b>
Fructosa	1±0,06	<b>9,42±0,43</b>	<b>9,80±0,27</b>	<b>3,96±0,85</b>	<b>5,78±0,77</b>	<b>5,15±0,36</b>	<b>3,04±0,25</b>	<b>6,00±1,21</b>
Galactinol	1±0,04	<b>1,27±0,10</b>	<b>1,63±0,10</b>	1,12±0,11	1,13±0,07	1,16±0,08	1,05±0,05	<b>1,36±0,14</b>
Glicerol	1±0,14	1,18±0,42	0,80±0,10	0,91±0,15	0,90±0,13	0,79±0,10	0,94±0,12	1,05±0,22
Glucosa	1±0,05	<b>4,51±0,55</b>	<b>4,7±0,43</b>	0,82±0,08	<b>1,36±0,14</b>	1,60±0,28	1,02±0,13	<b>1,44±0,08</b>
<i>Myo</i> -Inositol	1±0,05	<b>1,31±0,11</b>	<b>2,59±0,10</b>	1,35±0,19	1,23±0,14	<b>1,86±0,17</b>	<b>1,32±0,08</b>	<b>1,76±0,28</b>
Ribulosa 5P	1±0,02	<b>0,54±0,03</b>	<b>0,72±0,04</b>	<b>0,71±0,02</b>	<b>0,68±0,06</b>	<b>0,66±0,03</b>	0,85±0,08	<b>0,83±0,05</b>
Sacarosa	1±0,04	1,00±0,02	<b>1,22±0,05</b>	1,00±0,06	1,10±0,05	<b>1,22±0,05</b>	1,09±0,03	<b>1,30±0,08</b>
<b>Otros</b>								
Fosfato	1±0,10	<b>0,16±0,01</b>	<b>0,18±0,01</b>	<b>0,22±0,03</b>	<b>0,19±0,03</b>	<b>0,18±0,02</b>	<b>0,20±0,01</b>	<b>0,21±0,02</b>
GABA	1±0,09	<b>2,12±0,15</b>	<b>2,86±0,21</b>	<b>2,08±0,13</b>	<b>2,62±0,13</b>	<b>4,28±0,32</b>	<b>3,06±0,21</b>	<b>2,58±0,13</b>

Además de los análisis realizados con la parte aérea en las diferentes líneas ensayadas, también se realizó un análisis metabólico de las raíces en las dos condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> con las mismas líneas.

En condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental se observó nuevamente, al igual que ocurría en la parte aérea, que los mayores cambios que se apreciaban se producían en el contenido relativo de aminoácidos, en el que se observó un aumento generalizado de estos en las líneas sobreexpresoras (Tablas 4.9 y 4.12). Según el

PCA, los metabolitos que mejor explicaban las diferencias entre las líneas eran la glutamina, asparagina, alanina, treonina y serina (Figura 4.21A). Los niveles de glutamina y asparagina aumentaron en las dos líneas Oex PGDH1 y en las líneas TriOex2-4 y TriOex2-47 respecto a la línea control, mientras que los niveles de treonina y serina aumentaron en todas las líneas analizadas (con el mayor aumento en el contenido relativo de serina; Tabla 4.12). En el caso de la serina, todas las líneas presentaron un mayor contenido de este aminoácido, respecto del control, siendo la línea TriOex1-40 la que menores niveles presentó, al igual que ocurrió con la parte aérea (Figuras 4.20A y 4.22A, y Tablas 4.9 y 4.12). Al igual que lo que se observó en la parte aérea las líneas TriOex no presentaron un mayor contenido de serina que las Oex PGDH1. Cuando se compararon los niveles de serina entre las líneas TriOex respecto a las líneas Oex PGDH1 se observó que no había diferencias significativas entre ellas, a excepción de la línea TriOex1-40 que mostró valores más bajos en serina (pero superiores al WT; Tabla 4.12 y Figura 4.22A). También se observaron cambios de otros metabolitos en todas las líneas como el aumento del citrato y de la fructosa (Tabla 4.12).

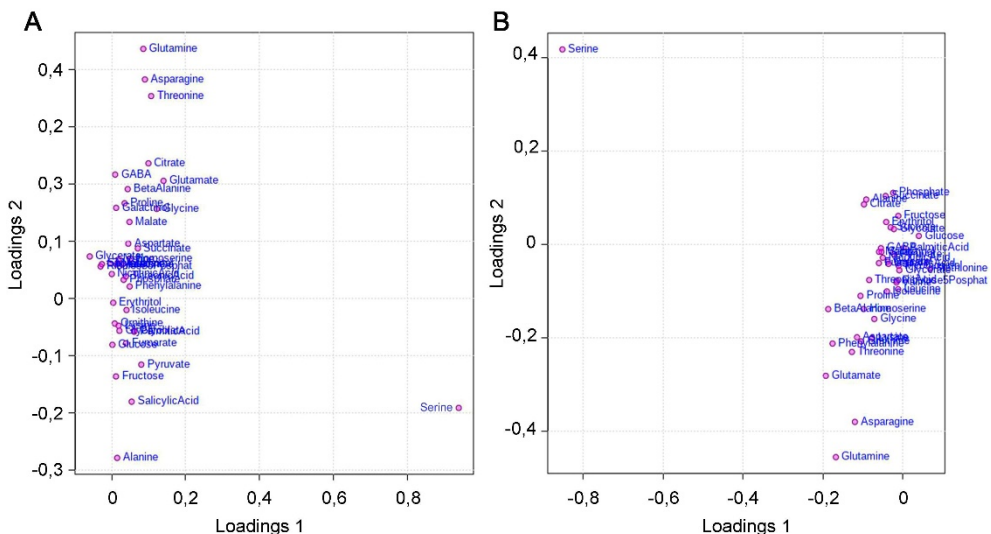
Al comparar el análisis metabolómico de las raíces en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> también se observaron los mayores cambios en el contenido relativo de aminoácidos. Sin embargo, este cambio no fue tan generalizado como ocurría en la parte aérea no observándose patrones tan conservados entre líneas como en dicho órgano (Tablas 4.10 y 4.13), tampoco se evidenciaron diferencias tan claras entre los perfiles de aminoácidos en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental y en alto CO<sub>2</sub>, tal y como se había observado en la parte aérea (Figuras 4.19 y 4.21). Según el PCA los metabolitos que explicaban mejor las diferencias entre líneas eran la glutamina, la asparagina y sobre todo la serina, al contrario de la parte aérea donde numerosos aminoácidos eran responsables de las diferencias (Figura 4.21B). En estos tres aminoácidos se produjo un aumento significativo del contenido relativo en casi todas las líneas, siendo especialmente interesante el incremento de serina que se observó en todas las líneas sobreexpresoras comparadas con el control (Tabla 4.13 y Figura 4.22B). De nuevo, el contenido de serina entre las líneas Oex PGDH1 y las líneas TriOex fue bastante similar a excepción de la línea TriOex1-40 (que volvió a dar valores más bajos que el resto, pero superiores al valor del WT; Tabla 4.13 y Figura 4.22B).

Por último, cuando comparamos las líneas en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> respecto al control crecido en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental se observó un cambio



## 4. RESULTADOS

en la gran mayoría de metabolitos analizados, tanto en las líneas sobreexpresoras como en el control. Al contrario de lo observado en la parte aérea en la que se produjo una disminución del contenido de aminoácidos cuando las plantas crecen en elevado  $\text{CO}_2$  si las comparamos con el control crecido en  $\text{CO}_2$  ambiental, en raíces se observó una tendencia opuesta, dándose un incremento generalizado de los niveles relativos de estos. Cabe destacar nuevamente el incremento significativo de asparagina, glutamato y glutamina, donde se observó un incremento tanto en el control como en las líneas sobreexpresoras, siendo mayor este aumento en estas últimas. Respecto a los niveles de serina se observó que mientras el control no varió su contenido independientemente de la dosis de  $\text{CO}_2$  utilizada, todas las líneas sobreexpresoras presentaban mayor contenido de este aminoácido cuando se comparaban sus niveles con el valor de serina del control crecido en condiciones de  $\text{CO}_2$  ambiental (Figura 4.22C). La glicina, a diferencia de lo que ocurre en la parte aérea, no se redujo en el WT con  $\text{CO}_2$  con respecto al control cultivado en condiciones ambientales. En las líneas sobreexpresoras los niveles de glicina se vieron incluso aumentados con respecto al control sin  $\text{CO}_2$ . También se observaron cambios generalizados en otros metabolitos asociados al cultivo en condiciones de elevado  $\text{CO}_2$ , tanto en plantas control como sobreexpresoras, como por ejemplo los altos niveles de glicerato o de azúcares solubles (glucosa y sobre todo fructosa).



**Figura 4.21.** Metabolitos que explican las diferencias en raíces en condiciones de  $\text{CO}_2$  ambiental (400 ppm) (A) y en condiciones de alto  $\text{CO}_2$  (2500 ppm) (B) de las líneas Oex PGDH1 y TriOex respecto al control de acuerdo al análisis realizado en el PCA.

**Tabla 4.12.** Niveles de metabolitos en raíces de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al WT están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 aCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 aCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 aCO <sub>2</sub>
Aminoácidos							
Ácido aspártico	1±0,08	<b>1,26±0,08</b>	<b>1,23±0,03</b>	1,05±0,04	1,17±0,04	<b>1,31±0,04</b>	1,15±0,05
Alanina	1±0,10	0,90±0,12	1,12±0,22	1,14±0,17	1,04±0,15	1,01±0,16	1,08±0,16
Alanina, β	1±0,08	1,16±0,07	1,19±0,08	1,07±0,06	1,23±0,08	1,23±0,07	1,01±0,08
Asparagina	1±0,10	<b>1,80±0,23</b>	<b>1,77±0,19</b>	1,32±0,10	<b>1,85±0,17</b>	<b>2,01±0,24</b>	1,59±0,25
Fenilalanina	1±0,09	<b>1,48±0,07</b>	<b>1,29±0,02</b>	1,16±0,06	<b>1,58±0,05</b>	<b>1,69±0,06</b>	<b>1,49±0,07</b>
Glicina	1±0,03	<b>1,59±0,06</b>	<b>1,67±0,05</b>	1,07±0,06	<b>1,51±0,04</b>	<b>1,77±0,08</b>	<b>1,32±0,05</b>
Glutamato	1±0,17	<b>1,61±0,19</b>	<b>1,57±0,17</b>	1,16±0,09	1,48±0,14	<b>1,79±0,13</b>	1,41±0,17
Glutamina	1±0,13	<b>1,82±0,15</b>	<b>2,09±0,1</b>	1,26±0,10	<b>1,70±0,10</b>	<b>2,06±0,16</b>	1,41±0,19
Homoserina	1±0,04	<b>1,32±0,06</b>	<b>1,29±0,06</b>	1,16±0,08	<b>1,17±0,04</b>	<b>1,43±0,03</b>	<b>1,19±0,06</b>
Isoleucina	1±0,04	1,02±0,02	0,92±0,02	1,04±0,04	0,98±0,01	1,10±0,03	0,99±0,03
Leucina	1±0,04	<b>1,12±0,02</b>	1,04±0,02	1,09±0,04	1,09±0,02	<b>1,15±0,03</b>	1,02±0,02
Lisina	1±0,07	0,97±0,02	0,84±0,03	0,88±0,05	0,95±0,04	1,12±0,05	0,88±0,04
Metionina	1±0,07	1,05±0,04	1,16±0,07	1,07±0,09	1,06±0,06	<b>1,33±0,09</b>	1,19±0,07
Ornitina	1±0,12	1,01±0,08	0,95±0,08	1,00±0,07	1,01±0,06	1,31±0,10	1,09±0,12
Prolina	1±0,05	1,02±0,08	1,02±0,02	0,98±0,03	1,06±0,05	0,95±0,04	<b>0,87±0,02</b>
Serina	1±0,05	<b>5,43±0,18</b>	<b>5,06±0,10</b>	<b>1,49±0,08</b>	<b>4,74±0,13</b>	<b>5,99±0,23</b>	<b>4,50±0,21</b>
Treonina	1±0,05	<b>1,58±0,07</b>	<b>1,54±0,03</b>	<b>1,19±0,06</b>	<b>1,69±0,03</b>	<b>1,87±0,05</b>	<b>1,54±0,08</b>
Valina	1±0,04	<b>1,19±0,03</b>	<b>1,10±0,01</b>	1,09±0,04	<b>1,17±0,02</b>	<b>1,25±0,03</b>	<b>1,11±0,03</b>

## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.12.** Continuación

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 aCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 aCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 aCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 aCO <sub>2</sub>
<b>Ácidos orgánicos</b>							
Ácido nicotínico	1±0,03	1,01±0,02	0,95±0,02	<b>1,11±0,01</b>	<b>1,13±0,01</b>	1,04±0,01	<b>1,09±0,02</b>
Ácido palmítico	1±0,04	1,12±0,06	0,98±0,03	1,10±0,07	1,13±0,07	<b>1,34±0,11</b>	<b>1,35±0,11</b>
Ácido salicílico	1±0,08	<b>1,35±0,08</b>	1,11±0,13	1,07±0,09	1,11±0,10	1,20±0,08	1,25±0,14
Ácido treónico	1±0,09	1,20±0,11	1,14±0,04	1,10±0,02	1,10±0,06	1,18±0,05	1,12±0,05
Citrato	1±0,05	<b>1,58±0,12</b>	<b>2,27±0,26</b>	<b>1,17±0,03</b>	<b>1,21±0,06</b>	<b>1,54±0,08</b>	<b>1,23±0,05</b>
Fumarato	1±0,08	1,03±0,09	1,15±0,11	1,12±0,08	1,03±0,12	1,22±0,13	1,13±0,09
Glicerato	1±0,08	0,99±0,03	<b>0,71±0,05</b>	1,14±0,05	<b>1,23±0,04</b>	0,85±0,02	1,20±0,13
Glicolato	1±0,05	1,19±0,08	<b>1,36±0,09</b>	<b>1,45±0,06</b>	1,08±0,04	<b>1,31±0,06</b>	<b>1,35±0,05</b>
Malato	1±0,03	1,03±0,05	<b>1,19±0,06</b>	1,05±0,04	<b>0,84±0,02</b>	1,00±0,02	1,02±0,06
Piruvato	1±0,15	1,14±0,10	1,31±0,09	1,00±0,14	1,08±0,05	1,55±0,20	1,47±0,17
Succinato	1±0,04	<b>1,29±0,08</b>	<b>1,76±0,09</b>	<b>1,45±0,06</b>	1,14±0,07	<b>1,33±0,05</b>	<b>1,41±0,09</b>
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>							
Eritritol	1±0,06	1,14±0,04	<b>1,24±0,05</b>	<b>1,28±0,03</b>	1,07±0,01	<b>1,28±0,08</b>	<b>1,26±0,03</b>
Fructosa	1±0,03	0,98±0,05	<b>1,24±0,09</b>	<b>1,41±0,10</b>	<b>1,27±0,07</b>	<b>1,48±0,10</b>	<b>1,46±0,07</b>
Galactinol	1±0,03	<b>1,17±0,03</b>	<b>1,21±0,02</b>	<b>1,12±0,04</b>	<b>1,19±0,02</b>	<b>1,20±0,04</b>	<b>1,17±0,04</b>
Glicerol	1±0,14	1,06±0,15	1,08±0,18	1,05±0,21	1,27±0,22	1,50±0,40	1,09±0,14
Glucosa	1±0,05	<b>0,8±0,04</b>	0,89±0,06	1,07±0,06	0,97±0,03	1,02±0,04	1,09±0,08
Myo-Inositol	1±0,03	<b>1,11±0,03</b>	1,04±0,02	<b>1,23±0,05</b>	<b>1,31±0,05</b>	1,20±0,09	<b>1,19±0,04</b>
Ribulosa 5P	1±0,10	<b>1,48±0,09</b>	<b>1,49±0,05</b>	<b>1,33±0,06</b>	<b>1,50±0,13</b>	<b>1,60±0,07</b>	<b>1,62±0,09</b>
Sacarosa	1±0,02	1,09±0,04	1,07±0,03	<b>1,07±0,02</b>	<b>1,25±0,03</b>	<b>1,19±0,02</b>	<b>1,21±0,03</b>
<b>Otros</b>							
Fosfato	1±0,04	<b>1,31±0,04</b>	<b>1,42±0,02</b>	<b>1,25±0,04</b>	<b>1,25±0,03</b>	<b>1,24±0,07</b>	<b>1,28±0,05</b>
GABA	1±0,09	1,08±0,12	<b>1,42±0,10</b>	0,96±0,09	1,08±0,09	0,97±0,11	0,77±0,07

**Tabla 4.13.** Niveles de metabolitos en raíces de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea silvestre (WT) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al WT están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Metabolito	WT eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 eCO <sub>2</sub>
Aminoácidos							
Ácido aspártico	1±0,04	<b>1,39±0,04</b>	1,03±0,03	1,01±0,06	<b>1,68±0,06</b>	<b>1,30±0,06</b>	1,12±0,07
Alanina	1±0,15	1,40±0,19	0,93±0,16	0,81±0,14	1,05±0,15	0,83±0,13	0,96±0,22
Alanina, β	1±0,02	<b>1,71±0,07</b>	<b>1,38±0,06</b>	<b>1,16±0,05</b>	<b>1,90±0,07</b>	<b>1,57±0,07</b>	<b>1,34±0,05</b>
Asparagina	1±0,03	<b>1,77±0,13</b>	1,15±0,09	1,06±0,12	<b>2,51±0,27</b>	<b>1,60±0,17</b>	<b>1,26±0,08</b>
Fenilalanina	1±0,06	<b>1,93±0,10</b>	<b>1,43±0,04</b>	<b>1,27±0,04</b>	<b>2,33±0,15</b>	<b>1,71±0,06</b>	<b>1,33±0,09</b>
Glicina	1±0,02	<b>1,59±0,04</b>	<b>1,41±0,04</b>	<b>1,18±0,03</b>	<b>1,84±0,06</b>	<b>1,73±0,05</b>	<b>1,34±0,06</b>
Glutamato	1±0,03	<b>1,65±0,08</b>	<b>1,17±0,06</b>	1,02±0,05	<b>2,35±0,13</b>	<b>1,61±0,11</b>	<b>1,32±0,09</b>
Glutamina	1±0,05	<b>1,91±0,09</b>	<b>1,34±0,08</b>	1,12±0,05	<b>2,78±0,15</b>	<b>1,77±0,09</b>	<b>1,44±0,10</b>
Homoserina	1±0,02	<b>1,44±0,02</b>	<b>1,15±0,04</b>	1,08±0,06	<b>1,56±0,06</b>	<b>1,38±0,04</b>	1,03±0,14
Isoleucina	1±0,07	1,06±0,02	0,86±0,04	1,01±0,02	<b>1,43±0,03</b>	1,15±0,04	0,93±0,09
Leucina	1±0,06	<b>1,16±0,03</b>	0,95±0,05	1,07±0,02	<b>1,62±0,05</b>	<b>1,30±0,04</b>	1,02±0,08
Lisina	1±0,05	<b>1,30±0,05</b>	0,98±0,05	1,16±0,09	<b>1,81±0,07</b>	<b>1,50±0,07</b>	0,99±0,14
Metionina	1±0,07	1,12±0,06	1,18±0,06	1,06±0,09	<b>1,42±0,09</b>	<b>1,27±0,10</b>	1,03±0,09
Ornitina	1±0,11	1,06±0,05	0,81±0,05	1,03±0,07	<b>1,81±0,06</b>	<b>1,49±0,10</b>	0,96±0,16
Prolina	1±0,04	<b>1,84±0,08</b>	0,93±0,04	0,97±0,02	<b>1,65±0,07</b>	<b>1,17±0,04</b>	1,10±0,07
Serina	1±0,04	<b>4,58±0,12</b>	<b>3,43±0,10</b>	<b>1,37±0,05</b>	<b>4,37±0,11</b>	<b>4,54±0,15</b>	<b>3,47±0,15</b>
Treonina	1±0,06	<b>1,65±0,03</b>	<b>1,23±0,06</b>	1,11±0,04	<b>2,18±0,06</b>	<b>1,63±0,05</b>	<b>1,35±0,10</b>
Valina	1±0,06	<b>1,23±0,02</b>	0,96±0,04	1,03±0,03	<b>1,58±0,04</b>	<b>1,25±0,03</b>	1,02±0,08

**Tabla 4.13.** Continuación

Metabolito	WT eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex2-49 eCO <sub>2</sub>
<b>Ácidos orgánicos</b>							
Ácido nicotínico	1±0,01	<b>1,16±0,03</b>	1,04±0,04	<b>1,14±0,06</b>	<b>1,16±0,05</b>	<b>1,10±0,03</b>	<b>1,17±0,07</b>
Ácido palmítico	1±0,11	0,90±0,03	0,89±0,03	1,03±0,08	0,92±0,02	1,07±0,11	1,08±0,05
Ácido salicílico	1±0,10	<b>1,40±0,07</b>	1,03±0,12	1,02±0,08	0,98±0,04	1,12±0,07	1,17±0,12
Ácido treónico	1±0,03	<b>1,39±0,03</b>	1,00±0,03	1,06±0,05	<b>1,30±0,04</b>	<b>1,12±0,04</b>	1,12±0,06
Citrato	1±0,05	<b>1,48±0,05</b>	1,01±0,03	<b>0,78±0,06</b>	1,06±0,02	1,03±0,08	0,95±0,06
Fumarato	1±0,04	<b>1,48±0,13</b>	1,07±0,03	1,01±0,05	<b>1,18±0,06</b>	1,07±0,06	1,22±0,09
Glicerato	1±0,06	1,01±0,08	<b>0,64±0,07</b>	<b>0,78±0,07</b>	1,02±0,05	<b>0,70±0,03</b>	0,88±0,11
Glicolato	1±0,04	<b>1,23±0,07</b>	1,07±0,04	1,05±0,06	0,99±0,04	1,09±0,05	1,12±0,08
Malato	1±0,02	1,11±0,06	<b>0,86±0,05</b>	<b>0,77±0,04</b>	0,92±0,04	<b>0,80±0,02</b>	0,91±0,06
Piruvato	1±0,08	1,04±0,07	0,96±0,05	0,87±0,06	0,89±0,05	0,90±0,10	0,98±0,13
Succinato	1±0,02	<b>2,07±0,19</b>	<b>1,36±0,08</b>	0,85±0,06	1,06±0,07	1,05±0,07	<b>1,41±0,06</b>
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>							
Eritritol	1±0,04	<b>1,21±0,06</b>	<b>1,32±0,07</b>	<b>1,31±0,08</b>	1,03±0,04	<b>1,25±0,04</b>	1,14±0,09
Fructosa	1±0,04	<b>1,16±0,02</b>	<b>0,75±0,08</b>	0,95±0,02	<b>0,80±0,02</b>	<b>0,82±0,02</b>	<b>1,15±0,06</b>
Galactinol	1±0,05	<b>1,24±0,07</b>	1,08±0,04	1,15±0,05	1,13±0,04	1,10±0,06	<b>1,21±0,06</b>
Glicerol	1±0,07	1,10±0,06	1,23±0,07	1,13±0,11	1,14±0,15	<b>1,48±0,18</b>	1,29±0,27
Glucosa	1±0,03	<b>0,77±0,03</b>	<b>0,59±0,05</b>	0,94±0,03	<b>0,56±0,02</b>	<b>0,63±0,02</b>	0,92±0,03
Myo-Inositol	1±0,02	<b>1,25±0,02</b>	0,95±0,03	1,06±0,03	<b>1,10±0,03</b>	1,08±0,04	<b>1,22±0,04</b>
Ribulosa 5P	1±0,07	1,28±0,13	1,35±0,17	1,15±0,12	1,25±0,09	1,18±0,07	1,24±0,31
Sacarosa	1±0,02	<b>1,15±0,01</b>	0,99±0,03	<b>1,13±0,03</b>	<b>1,21±0,03</b>	<b>1,11±0,04</b>	<b>1,19±0,04</b>
<b>Otros</b>							
Fosfato	1±0,02	<b>1,21±0,04</b>	<b>1,23±0,05</b>	0,93±0,05	<b>0,91±0,02</b>	1,00±0,05	1,01±0,06
GABA	1±0,08	<b>1,77±0,25</b>	1,04±0,09	<b>1,25±0,07</b>	<b>1,41±0,04</b>	1,06±0,06	1,24±0,15

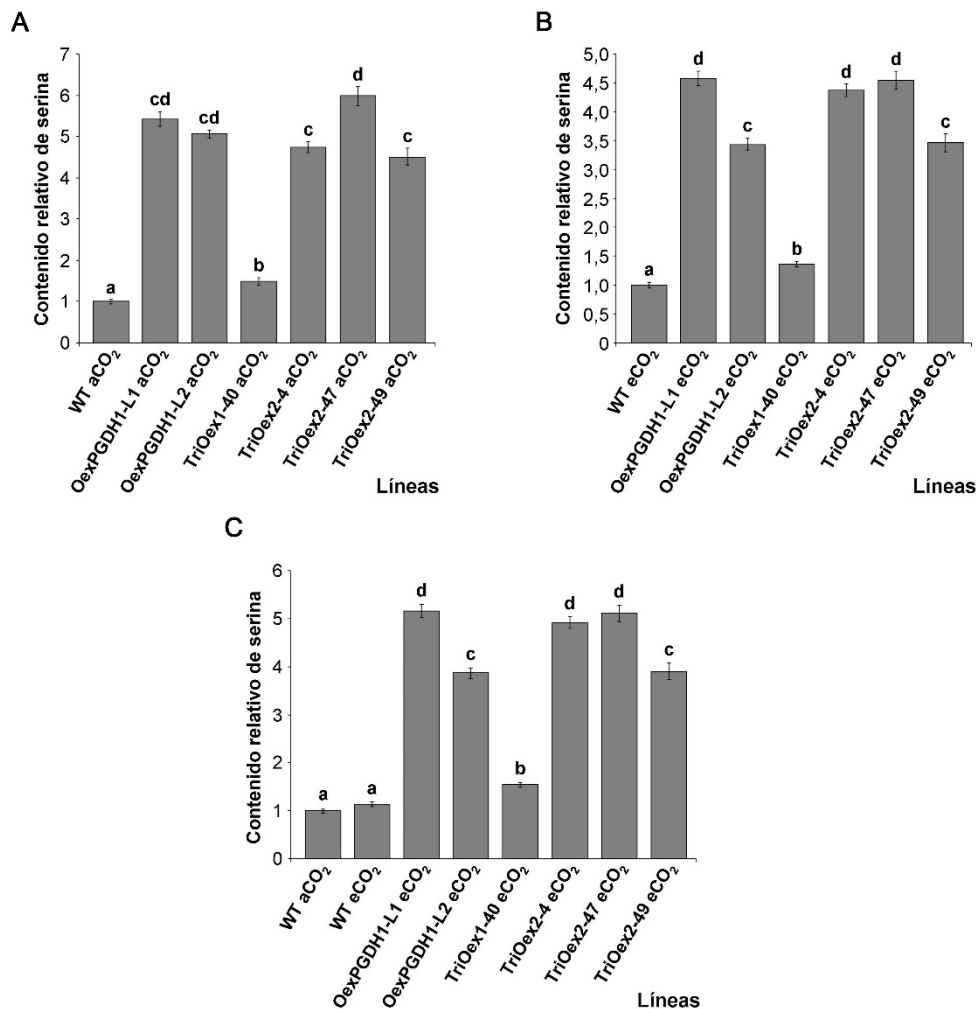
**Tabla 4.14.** Niveles de metabolitos en raíces de la línea control (WT), de las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm) comparados con el WT en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT en CO<sub>2</sub> ambiental (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al WT están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	WT eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex 1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex 2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex 2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex 2-49 eCO <sub>2</sub>
Aminoácidos								
Ácido aspártico	1±0,08	<b>1,42±0,05</b>	<b>1,98±0,05</b>	<b>1,46±0,05</b>	<b>1,43±0,09</b>	<b>2,40±0,09</b>	<b>1,85±0,09</b>	<b>1,59±0,1</b>
Alanina	1±0,10	<b>3,27±0,50</b>	<b>4,57±0,62</b>	<b>3,03±0,54</b>	<b>2,66±0,47</b>	<b>3,44±0,50</b>	<b>2,70±0,41</b>	<b>3,14±0,73</b>
Alanina, β	1±0,08	1,08±0,02	<b>1,84±0,08</b>	<b>1,48±0,07</b>	<b>1,25±0,05</b>	<b>2,05±0,07</b>	<b>1,69±0,08</b>	<b>1,44±0,06</b>
Asparagina	1±0,10	<b>2,89±0,10</b>	<b>5,10±0,38</b>	<b>3,32±0,26</b>	<b>3,06±0,34</b>	<b>7,24±0,79</b>	<b>4,63±0,51</b>	<b>3,65±0,23</b>
Fenilalanina	1±0,09	0,85±0,05	<b>1,64±0,08</b>	<b>1,22±0,03</b>	1,08±0,04	<b>1,98±0,13</b>	<b>1,45±0,05</b>	1,13±0,08
Glicina	1±0,03	<b>1,09±0,02</b>	<b>1,74±0,05</b>	<b>1,54±0,05</b>	<b>1,29±0,03</b>	<b>2,01±0,06</b>	<b>1,89±0,05</b>	<b>1,46±0,07</b>
Glutamato	1±0,17	<b>1,89±0,05</b>	<b>3,11±0,16</b>	<b>2,22±0,11</b>	<b>1,93±0,10</b>	<b>4,43±0,24</b>	<b>3,04±0,21</b>	<b>2,49±0,17</b>
Glutamina	1±0,13	<b>2,60±0,12</b>	<b>4,95±0,23</b>	<b>3,47±0,20</b>	<b>2,90±0,12</b>	<b>7,23±0,38</b>	<b>4,58±0,24</b>	<b>3,73±0,26</b>
Homoserina	1±0,04	<b>1,56±0,03</b>	<b>2,25±0,03</b>	<b>1,79±0,06</b>	<b>1,69±0,09</b>	<b>2,43±0,10</b>	<b>2,15±0,07</b>	<b>1,61±0,22</b>
Isoleucina	1±0,04	<b>1,69±0,12</b>	<b>1,79±0,04</b>	<b>1,46±0,07</b>	<b>1,72±0,04</b>	<b>2,42±0,05</b>	<b>1,94±0,07</b>	<b>1,58±0,15</b>
Leucina	1±0,04	<b>1,82±0,12</b>	<b>2,11±0,05</b>	<b>1,72±0,09</b>	<b>1,95±0,04</b>	<b>2,95±0,09</b>	<b>2,37±0,07</b>	<b>1,85±0,15</b>
Lisina	1±0,07	1,18±0,06	<b>1,54±0,06</b>	1,16±0,06	<b>1,37±0,11</b>	<b>2,14±0,08</b>	<b>1,78±0,09</b>	1,17±0,17
Metionina	1±0,07	1,12±0,07	<b>1,25±0,07</b>	<b>1,33±0,06</b>	1,19±0,10	<b>1,59±0,10</b>	<b>1,42±0,11</b>	1,16±0,1
Ornitina	1±0,12	1,22±0,14	<b>1,30±0,06</b>	0,99±0,06	1,26±0,09	<b>2,21±0,08</b>	<b>1,82±0,12</b>	1,17±0,2
Prolina	1±0,05	<b>1,44±0,06</b>	<b>2,65±0,12</b>	<b>1,34±0,06</b>	<b>1,40±0,04</b>	<b>2,39±0,10</b>	<b>1,69±0,06</b>	<b>1,59±0,1</b>
Serina	1±0,05	1,13±0,05	<b>5,15±0,14</b>	<b>3,86±0,11</b>	<b>1,54±0,06</b>	<b>4,92±0,12</b>	<b>5,11±0,17</b>	<b>3,9±0,17</b>
Treonina	1±0,05	<b>1,75±0,10</b>	<b>2,88±0,06</b>	<b>2,15±0,10</b>	<b>1,95±0,07</b>	<b>3,82±0,11</b>	<b>2,85±0,09</b>	<b>2,36±0,18</b>
Valina	1±0,04	<b>1,61±0,09</b>	<b>1,98±0,04</b>	<b>1,55±0,06</b>	<b>1,66±0,04</b>	<b>2,55±0,06</b>	<b>2,00±0,05</b>	<b>1,64±0,12</b>

## 4. RESULTADOS

**Tabla 4.14.** Continuación

Metabolito	WT aCO <sub>2</sub>	WT eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L1 eCO <sub>2</sub>	OexPGDH1 L2 eCO <sub>2</sub>	TriOex 1-40 eCO <sub>2</sub>	TriOex 2-4 eCO <sub>2</sub>	TriOex 2-47 eCO <sub>2</sub>	TriOex 2-49 eCO <sub>2</sub>
<b>Ácidos orgánicos</b>								
Ácido nicotínico	1±0,03	<b>0,77±0,01</b>	<b>0,90±0,03</b>	<b>0,80±0,03</b>	<b>0,88±0,04</b>	0,90±0,04	<b>0,85±0,02</b>	0,9±0,05
Ácido palmítico	1±0,04	0,82±0,09	<b>0,74±0,03</b>	<b>0,73±0,02</b>	0,84±0,06	<b>0,75±0,02</b>	0,88±0,09	0,89±0,04
Ácido salicílico	1±0,08	1,25±0,12	<b>1,75±0,09</b>	1,28±0,15	1,27±0,10	<b>1,23±0,05</b>	<b>1,40±0,09</b>	<b>1,46±0,15</b>
Ácido treónico	1±0,09	<b>1,26±0,04</b>	<b>1,75±0,04</b>	<b>1,26±0,04</b>	<b>1,34±0,07</b>	<b>1,64±0,04</b>	<b>1,42±0,05</b>	<b>1,41±0,08</b>
Citrato	1±0,05	<b>2,04±0,09</b>	<b>3,03±0,11</b>	<b>2,06±0,07</b>	<b>1,58±0,13</b>	<b>2,16±0,03</b>	<b>2,09±0,17</b>	<b>1,95±0,12</b>
Fumarato	1±0,08	<b>1,26±0,05</b>	<b>1,85±0,17</b>	<b>1,35±0,04</b>	<b>1,27±0,06</b>	<b>1,48±0,08</b>	<b>1,34±0,07</b>	<b>1,53±0,12</b>
Glicerato	1±0,08	<b>11,09±0,72</b>	<b>11,18±0,92</b>	<b>7,11±0,79</b>	<b>8,61±0,72</b>	<b>11,36±0,53</b>	<b>7,81±0,32</b>	<b>9,76±1,22</b>
Glicolato	1±0,05	<b>1,25±0,05</b>	<b>1,54±0,08</b>	<b>1,34±0,05</b>	<b>1,32±0,07</b>	<b>1,24±0,05</b>	<b>1,36±0,06</b>	<b>1,39±0,1</b>
Malato	1±0,03	<b>1,64±0,04</b>	<b>1,82±0,09</b>	<b>1,42±0,08</b>	<b>1,27±0,07</b>	<b>1,51±0,06</b>	<b>1,31±0,04</b>	<b>1,49±0,09</b>
Piruvato	1±0,15	1,32±0,11	1,37±0,09	1,27±0,07	1,15±0,08	1,18±0,07	1,19±0,13	1,3±0,17
Succinato	1±0,04	<b>2,48±0,04</b>	<b>5,13±0,47</b>	<b>3,36±0,20</b>	<b>2,12±0,16</b>	<b>2,62±0,18</b>	<b>2,61±0,18</b>	<b>3,48±0,14</b>
<b>Azúcares y azúcares alcoholes</b>								
Eritritol	1±0,06	<b>0,41±0,02</b>	<b>0,49±0,02</b>	<b>0,53±0,03</b>	<b>0,53±0,03</b>	<b>0,42±0,01</b>	<b>0,51±0,02</b>	<b>0,46±0,04</b>
Fructosa	1±0,03	<b>3,41±0,12</b>	<b>3,97±0,08</b>	<b>2,55±0,26</b>	<b>3,23±0,06</b>	<b>2,73±0,06</b>	<b>2,81±0,07</b>	<b>3,92±0,19</b>
Galactinol	1±0,03	1,08±0,05	<b>1,34±0,08</b>	<b>1,17±0,04</b>	<b>1,24±0,05</b>	<b>1,23±0,05</b>	<b>1,19±0,07</b>	<b>1,31±0,07</b>
Glicerol	1±0,14	0,83±0,06	0,92±0,05	1,02±0,06	0,94±0,10	0,95±0,12	1,23±0,15	1,07±0,22
Glucosa	1±0,05	<b>2,22±0,07</b>	<b>1,71±0,07</b>	<b>1,31±0,10</b>	<b>2,09±0,06</b>	<b>1,25±0,04</b>	<b>1,39±0,04</b>	<b>2,05±0,06</b>
Myo-Inositol	1±0,03	<b>1,67±0,04</b>	<b>2,09±0,04</b>	<b>1,59±0,05</b>	<b>1,76±0,04</b>	<b>1,83±0,05</b>	<b>1,80±0,06</b>	<b>2,03±0,06</b>
Ribulosa 5P	1±0,10	<b>0,62±0,05</b>	0,79±0,08	0,84±0,10	<b>0,71±0,07</b>	0,77±0,06	<b>0,73±0,04</b>	0,77±0,19
Sacarosa	1±0,02	<b>1,17±0,03</b>	<b>1,35±0,02</b>	<b>1,16±0,03</b>	<b>1,33±0,04</b>	<b>1,42±0,04</b>	<b>1,30±0,05</b>	<b>1,39±0,04</b>
<b>Otros</b>								
Fosfato	1±0,04	<b>0,72±0,01</b>	<b>0,87±0,03</b>	0,89±0,04	<b>0,67±0,04</b>	<b>0,66±0,01</b>	<b>0,72±0,03</b>	<b>0,73±0,05</b>
GABA	1±0,09	1,29±0,11	<b>2,29±0,32</b>	<b>1,34±0,11</b>	<b>1,61±0,09</b>	<b>1,83±0,05</b>	<b>1,37±0,08</b>	<b>1,61±0,2</b>



**Figura 4.22.** Contenido relativo de serina en raíces en las líneas Oex PGDH1 y TriOex (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49). Los valores están normalizados respecto a la media del control (WT) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (aCO<sub>2</sub>; 400 ppm) (A) y en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>; 2500 ppm) (B). (C) Contenido relativo de serina del WT y de las líneas Oex PGDH1 y TriOex en eCO<sub>2</sub> respecto al WT en aCO<sub>2</sub> (los valores están normalizados respecto a la media del WT en condiciones de aCO<sub>2</sub>). Los valores representan la media mean ± SE, n ≥ 6 pools de 40 plantas para cada genotipo. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas (ANOVA, P < 0,05). Los resultados más detallados se presentan en las Tablas 4.12, 4.13 y 4.14.



### 4.9 Análisis proteico y de almidón de las líneas sobreexpresoras de la RFBS en *Arabidopsis thaliana* y maíz

Los análisis de contenido proteico y de almidón se realizaron en *Arabidopsis* con las líneas TriOex y con las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1*, y dichos análisis fueron realizados tanto en condiciones con CO<sub>2</sub> ambiental como con alto CO<sub>2</sub>.

En condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental se observó un incremento significativo en el contenido de almidón, respecto del control, en dos de las cuatro líneas TriOex (TriOex2-47 y TriOex1-40) y en las dos líneas Oex PGDH1 (Figura 4.23A). En raíces, sin embargo, no se vieron cambios significativos en el contenido de almidón respecto al control en estas condiciones (Figura 4.23B).

Al analizar el contenido de almidón en condiciones de alto CO<sub>2</sub> se observó un incremento generalizado de este en todas las líneas tanto sobreexpresoras como controles, y tanto en la parte aérea como en raíces, comparado con los resultados obtenidos en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental. En estas condiciones ambientales enriquecidas en CO<sub>2</sub>, el contenido de almidón en la parte aérea de todas las líneas sobreexpresoras fue significativamente superior al control, mientras que, en raíces, no se apreciaron diferencias significativas en ninguna línea (Figura 4.23A y B).

Los resultados obtenidos con el almidón tanto para las líneas TriOex como Oex PGDH1, nos muestran como la RFBS afecta al metabolismo del carbono. Por otro lado, se han demostrado en trabajos previos que esta ruta está conectada con el metabolismo del nitrógeno y, además, la serina formada por esta ruta es esencial para la síntesis, entre otros componentes celulares, de las proteínas (Ros et al., 2014; Zimmermann et al., 2021a). Por esta razón, no solo se evaluó el contenido de almidón, sino que también se analizó el contenido en proteínas totales de cada una de las líneas en las dos condiciones de CO<sub>2</sub>.

En condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental se pudo observar que existía un mayor contenido de proteína en la parte aérea, tanto de las líneas TriOex como de las Oex PGDH1 cuando se compararon con el control. Lo mismo ocurre en raíces, donde

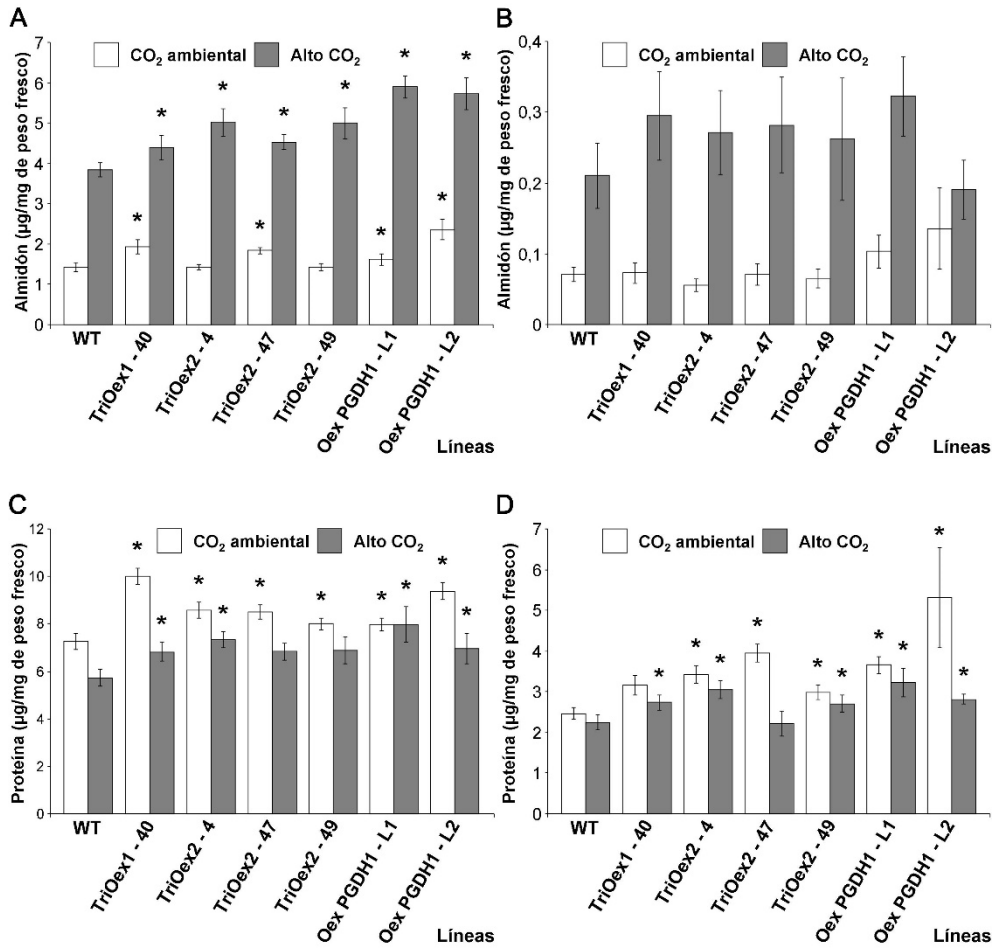
cinco de las seis líneas presentaban un incremento significativo del contenido total de proteínas (Figura 4.23C y D).

Mientras que el contenido en almidón aumentó en condiciones de alto CO<sub>2</sub> respecto a las condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> en todas las líneas estudiadas (Figura 4.23A y B), en el caso de las proteínas este efecto se invirtió, mostrando un contenido menor en alto CO<sub>2</sub> respecto a las condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> (Figura 4.23C y D). En estas condiciones, sin embargo, cuatro líneas sobreexpresoras incrementaron los niveles de proteínas en parte aérea con respecto a los controles (Figura 4.23C). En el caso de las raíces, todas las líneas salvo una (TriOex2-47) incrementaron su contenido proteico respecto al WT (Figura 4.23D). Por ello, a pesar de la disminución del contenido de proteínas con respecto a condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental, el contenido proteico en las líneas sobreexpresoras en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> fue similar o incluso superior al valor del control en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Figura 4.23C y D).

Teniendo en cuenta que *Arabidopsis* es una planta con metabolismo C<sub>3</sub>, quisimos conocer el efecto de la RFBS en el metabolismo del carbono y del nitrógeno en una especie con metabolismo C<sub>4</sub>, como es el maíz, con una menor tasa de fotorrespiración. Para ello analizamos el contenido de almidón y proteínas en plantas transgénicas de maíz sobreexpresoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis* (ZmOex PGDH1). En este caso, no solo se obtuvieron resultados de las hojas y raíces, sino que también se midieron los contenidos en los tallos de tres líneas ZmOex PGDH1 (ZmOex PGDH1-L22, ZmOex PGDH1-L27 y ZmOex PGDH1-L31) junto con la línea control (B104). Estos análisis solamente se realizaron en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental.

Respecto al contenido en almidón, las líneas ZmOex PGDH1-L22 y ZmOex PGDH1-L27 aumentaron de manera significativa su contenido tanto en hojas como en tallos comparado con el control B104 (Figura 4.24A y B). La línea ZmOex PGDH1-L31 solo aumentó significativamente el contenido de almidón en tallos. Sin embargo, haciendo un análisis estadístico en conjunto de los datos de las tres líneas, las líneas sobreexpresoras presentan mayor contenido de almidón en hojas y tallos que el control (análisis estadístico no mostrado). En raíces, por el contrario, no se observaron diferencias significativas respecto a B104 (Figura 4.24C).

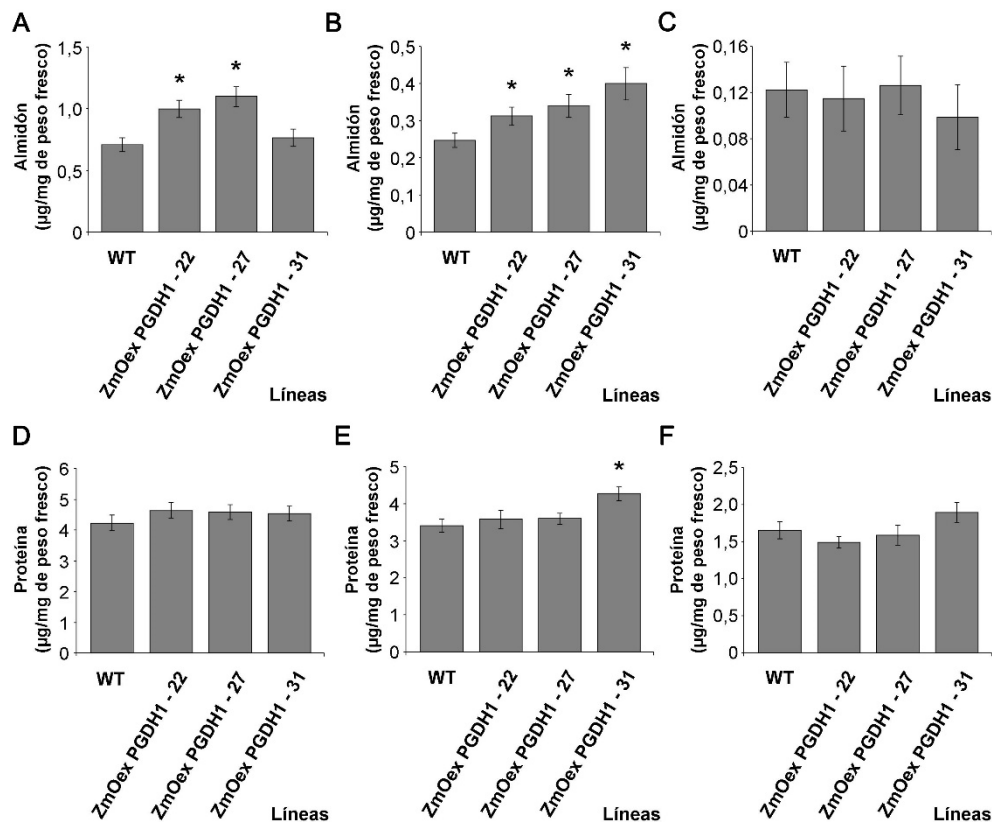
## 4. RESULTADOS



**Figura 4.23.** Análisis del contenido de almidón (A y B) y proteínas (C y D) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (400 ppm; barras blancas) y alto CO<sub>2</sub> (2500 ppm; barras grises) en la parte aérea (A y C) y en las raíces (B y D) para plantas TriOex y Oex PGDH1 de 14 días crecidas *in vitro*. Los valores representan la media ± SE (n = 12). (\*) representa diferencias significativas respecto al control (WT; T-test, P < 0,05).

Dado que los resultados obtenidos en el contenido de proteínas de las líneas TriOex de *Arabidopsis* mostraban un incremento al sobreexpresar la RFBS (Figura 4.23C y D), se analizó el contenido de proteína total en las líneas ZmOex PGDH1. En este caso no se apreció un incremento significativo del contenido

proteico al compararlo con el control, con la única excepción de la línea ZmOex PGDH1-31 en al que sí que se observó un aumento significativo en el tallo (Figura 4.24D-F).



**Figura 4.24.** Análisis del contenido de almidón (A, B y C) y proteínas (D, E y F) en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental en hojas (A y D), tallos (B y E) y raíces (C y F) en plantas ZmOex PGDH1 de 20 días crecidas en invernadero. Los valores representan la media ± SE (n = 12). (\*) representa diferencias significativas respecto al control B104 (WT; T-test, P < 0,05).

## 5. DISCUSIÓN



## 5.1 *PGDH2* y *PGDH3* contribuyen al crecimiento de la planta

El análisis de caracterización fenotípica de los mutantes condicionales para los genes *PGDH1* y *PSP1* ha demostrado que el fenotipo de crecimiento de los mutantes *c-pgdh1* es menos drástico que el de los mutantes *c-psp1-1* en todas las líneas estudiadas (Figura 4.2B). Estos resultados nos indican que es improbable que las diferencias observadas se deban a una expresión génica o actividad enzimática residual diferente en los dos mutantes condicionales, y por tanto el fenotipo observado se correlaciona con el genotipo. Las diferencias observadas en el fenotipo entre *c-pgdh1* y *c-psp1* indicarían que los genes *PGDH2* y *PGDH3* podrían tener un papel en el desarrollo de la planta, y que por tanto explicarían que el fenotipo de un triple mutante *pgdh* fuera similar al fenotipo del mutante *psp*. Cuando estudiamos el fenotipo de mutantes simples *pgdh2* o *pgdh3* pudimos comprobar que este último mostró un crecimiento reducido cuando se cultivó *in vitro* o en condiciones de invernadero, mientras que los mutantes simples para el gen *PGDH2* sólo mostraron un crecimiento reducido en condiciones de invernadero (Figura 4.5). Estos resultados podrían sugerir que la deficiencia del gen *PGDH3* afecta más al crecimiento de la planta que la falta de *PGDH2*, o, por el contrario, que la actividad del gen *PGDH1* puede compensar mejor la función del gen *PGDH2* en el crecimiento que la del gen *PGDH3*. En apoyo de esta última idea están los fenotipos observados en las líneas mutantes que tenían el fondo genético mutante *c-pgdh1* (*c1-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c1-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c1-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*; *c2-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c2-pgdh1-2 pgdh3-1*, *c2-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*), donde la deficiencia del gen *PGDH2* condujo a fenotipos de crecimiento reducidos más drásticos que la deficiencia del gen *PGDH3* en todas las condiciones ensayadas (cultivo *in vitro* o en invernadero; Figuras 4.8 y 4.9). Por lo tanto, concluimos que la actividad del gen *PGDH1* puede compensar mejor los fenotipos de crecimiento asociados a *PGDH2* que los asociados a la deficiencia de *PGDH3*. También concluimos que *PGDH1* es el gen de la familia *PGDH* que más contribuye al crecimiento vegetativo de las plantas, como ya se ha estudiado en otros trabajos, siendo importante para el desarrollo del embrión y del gametofito masculino (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013a).

## 5.2 *PGDH1* y *PGDH2* están más relacionados funcionalmente entre sí que con *PGDH3*

Los análisis filogenéticos de los genes de la familia *PGDH* revelan que los genes *PGDH1* y *PGDH3* son los que están más estrechamente relacionados. Sin embargo, cuando analizamos el patrón de expresión de los tres genes se observaron diferencias, no solo a nivel de órgano, tejido y célula, sino también bajo diferentes condiciones ambientales (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013a). Tanto el gen *PGDH1* como *PGDH2* están altamente expresados en tejidos heterotróficos, especialmente en los haces vasculares, mientras que *PGDH3* se expresa casi exclusivamente en tejidos fotosintéticos. Los fenotipos de crecimiento más drásticos de los mutantes *PGDH1* observados en otros estudios podrían estar relacionados con su función en tipos celulares específicos como son los meristemos (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013a).

Los perfiles metabolómicos de *pgdh2-3* y *pgdh3-1* fueron claramente diferentes al de la línea control, lo que indica que ambos genes son metabolómicamente funcionales en plantas. Además, estos dos perfiles también eran diferentes entre sí (Figura 4.6 y Tablas 4.1 y 4.2). Los cambios metabolómicos en el mutante *pgdh3-1* fueron más pronunciados en la parte aérea que en las raíces, mientras que en el mutante *pgdh2-3* se observó una tendencia opuesta. Por ejemplo, en la parte aérea del mutante *pgdh3-1*, el 68% de los metabolitos cambiaron en más de un 25% en comparación con la línea control, mientras que solo un 20% de ellos cambiaron más de un 25% en raíces. Por el contrario, en la parte aérea el mutante *pgdh2-3*, solo el 40% de los metabolitos analizados cambiaron más de un 25% mientras que en raíces ese porcentaje se incrementó hasta el 64%. Estos resultados nos podrían indicar que la función del gen *PGDH3* es más importante en la parte aérea, mientras que la del gen *PGDH2* sería más importante en raíces tal y como sugieren los análisis de expresión génica (Figura 4.1). Estos resultados también nos podrían indicar que los genes *PGDH2* y *PGDH3* están implicados en procesos diferentes. Curiosamente, el PCA del perfil metabolómico obtenido del doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1* mostró un solapamiento parcial con el perfil metabolómico del control (Figura 4.6A), lo que podría sugerir que la doble mutación de ambos genes conduce a una compensación metabólica parcial.



La comparación del perfil metabólico de los mutantes dobles obtenidos por combinación de *PGDH1* con *PGDH2* o con *PGDH3* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*, *c-pgdh1-2 pgdh3-1*) y el mutante triple (*c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*) mostró un aumento generalizado del nivel de metabolitos en comparación con los controles, especialmente de aminoácidos (Figura 4.10 y Tablas 4.3 y 4.4). Este incremento generalizado no solo podría estar relacionado con las funciones de los genes *PGDH* sino también con la drástica reducción del crecimiento observada en estos mutantes (Figuras 4.8 y 4.9). Curiosamente, la ausencia de los genes *PGDH1* y *PGDH2* produjo más diferencias en la parte aérea que las observadas en el mutante triple, lo que apoyaría la idea de que el gen *PGDH3* tiene un papel compensatorio a los otros dos genes de la familia *PGDH*.

Los análisis de expresión génica muestran que cuando el gen *PGDH1* está activo, no hay cambios en la expresión de los genes *PGDH2* o *PGDH3* en los mutantes simples *pgdh3-1* o *pgdh2-3*, respectivamente. Sin embargo, una reducción de la expresión del gen *PGDH1* (en un fondo genético *c-pgdh1-2*) afecta a la expresión de los otros dos genes de manera diferente, lo que apoya que el gen *PGDH1* es el principal gen de la familia *PGDH*. De acuerdo con esto, la expresión de *PGDH3* se reprimió tanto en el mutante simple condicional del gen *PGDH1* (*c-pgdh1-2*) como en el mutante doble *PGDH1/PGDH2* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*) lo que apoyaría el patrón de expresión opuesto del gen *PGDH3* a los otros dos genes (Figura 4.14). Estudios previos también apoyaban un patrón de expresión opuesto del gen *PGDH3* a los genes *PGDH1* y *PGDH2*. Por ejemplo, se observó que bajo condiciones a estrés por salinidad los genes *PGDH1* y *PGDH2* se inducían, mientras que por el contrario *PGDH3* se reprimía (Rosa-Téllez et al., 2020). En este mismo estudio se observó que en líneas que sobreexpresaban *PGDH1* el gen *PGDH3* se reprimía, especialmente en condiciones a estrés salino (Rosa-Téllez et al., 2020). Sin embargo, los genes *PGDH1* y *PGDH2* sólo se reprimían en las plantas que sobreexpresaban *PGDH3* en condiciones estándar, pero no en condiciones de estrés salino. Por otro lado, también se ha visto que el comportamiento bioquímico de las isoformas *PGDH2* y *PGDH3* es diferente, siendo la *PGDH3* muy sensible a la inhibición por retroalimentación por serina mientras que la actividad de la *PGDH2* es completamente insensible a este aminoácido (Benstein et al., 2013; Okamura y Hirai, 2017).

Los fenotipos de crecimiento de los mutantes dobles y triple indican que el mutante doble *c-pgdh1-2 pgdh2-3* mostró la reducción más drástica del

crecimiento, incluso más que el triple mutante (Figuras 4.8 y 4.9). Además, la actividad del gen *PGDH3* en la parte aérea, que es donde se expresa mayoritariamente, es de alguna manera perjudicial en el mutante doble *c-pgdh1-2 pgdh2-3*, pero no en el mutante simple *c-pgdh1-2*, lo que demuestra que *PGDH3* compensa específicamente la función de *PGDH2* en el crecimiento, como ya se había visto en el doble mutante *pgdh2-3 pgdh3-1* (Figura 4.5).

Nuestros resultados indican que los genes *PGDH1* y *PGDH2* son parcialmente redundantes, al menos en la parte aérea, donde *PGDH2* se induce en el mutante *c-pgdh1-2* (Figura 4.14C). El análisis de la expresión génica *in silico*, muestran una correlación positiva entre *PGDH1* y *PGDH2* (Figura 4.13). Esta correlación positiva no solo se encuentra a nivel transcripcional, sino que de acuerdo con el mapa de interacción en *Arabidopsis*, se observa una interacción física entre *PGDH1* y *PGDH2* (<https://genemania.org/>; AIMP, 2011; Casatejada-Anchel et al., 2021). La falta de un fenotipo de crecimiento en el mutante *pgdh2-3* junto con los fenotipos mostrados por el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* con una reducción mucho más drástica que el mutante simple *c-pgdh1-2* (Figuras 4.5, 4.8 y 4.9), nos llevan a postular que las actividades de *PGDH1* y *PGDH2* se requieren probablemente para aportar serina para procesos similares. *PGDH2* podría cooperar junto con *PGDH1* en determinadas condiciones. Por ejemplo, *PGDH2* se induce su expresión en condiciones de estrés [bióticos o abióticos; (<https://genevestigator.com/>)] donde podría ser necesario un aporte adicional de serina.

Por otro lado, el mutante doble *c-pgdh1-2 pgdh3-1* también mostró un mayor fenotipo de crecimiento que el mutante simple *c-pgdh1-2*, lo que podría sugerir que *PGDH1* y *PGDH3* son parcialmente redundantes (Figuras 4.8 y 4.9). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los mutantes simples *c-pgdh1-2* y *pgdh3-1* ya muestran fenotipos de crecimiento (Figuras 4.5, 4.8 y 4.9) y, por lo tanto, el fenotipo más fuerte del doble mutante no indica necesariamente una redundancia, sino un efecto aditivo de cada fenotipo individual del mutante. De hecho, *PGDH3* se reprime en el mutante *c-pgdh1-2* en lugar de inducirse su expresión (Figura 4.14C y D), lo que apoyaría esta última idea.

Tras revisar los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica y del análisis metabolómico (Figuras 4.8, 4.9 y 4.10, y Tablas 4.3 y 4.4) podemos observar que existe una correlación negativa entre la inhibición del crecimiento y los niveles

de serina en la parte aérea. Los niveles más altos de serina en la parte aérea se encontraron en el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3* y en el triple mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*. Los altos niveles de serina de estas líneas podrían deberse a un aumento general del contenido de aminoácidos asociado a la reducción drástica del crecimiento. Sin embargo, también podría deberse al aumento de la actividad de la ruta del Glicolato en la parte aérea y al posterior transporte de serina a las raíces. En trabajos previos, se ha sugerido que hay una interacción entre la RFBS y la ruta del Glicolato para mantener la homeostasis de la serina en la planta (Anoman et al., 2019). Esto implicaría la inducción de la biosíntesis de serina en los órganos fotosintéticos y su transporte a los órganos heterótrofos, como las raíces.

Al contrario que en la parte aérea, las líneas que mostraron la reducción más drástica de crecimiento presentaron los niveles más bajos de serina en raíces (Figuras 4.8, 4.9 y 4.10, y Tablas 4.3 y 4.4). El gen *PGDH2* parece desempeñar un papel crucial en el suministro de serina a través de la RFBS que, en su conjunto, podría ser cuantitativamente más importante que el papel del gen *PGDH1*. La mutación de *PGDH2* (tanto en un fondo genético silvestre como en *c-pgdh1-2*) redujo el pool de serina en raíces, incluso a pesar de la drástica reducción del crecimiento de estas. Sin embargo, no se vio una reducción del contenido en serina en los mutantes simples *c-pgdh1-2*, probablemente, debido a la inducción de *PGDH2* (Figura 4.14C). El hecho, de que *PGDH2* es la única isoforma no sensible a la inhibición por retroalimentación por serina (hecho que sí que ocurre con *PGDH1* y *PGDH3*) podría apoyar esta hipótesis (Benstein et al., 2013; Okamura y Hirai, 2017). En cuanto *PGDH3*, la falta de esta isoforma en la parte aérea, donde es mayoritariamente activa, no dio lugar a una reducción de los niveles de serina ni en un fondo genético silvestre, ni en un fondo genético mutante *c-pgdh1-2* o en el triple mutante (Figura 4.10C y Tabla 4.3). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los genes *PGDH1* y *PGDH2* cooperan en la RFBS para aportar serina a órganos específicos de la planta y que *PGDH3* podría tener otras funciones en tipos celulares específicos que podrían estar relacionados o no con el aporte de serina. En este sentido, *PGDH1* y *PGDH2* interactúan transcripcionalmente con otros genes de la RFBS como *PSAT1* o *PSAT2*, pero todos ellos se encuentran en una red transcripcional diferente a la de *PGDH3* (<https://genemania.org/>; AIMP, 2011; Casatejada-Anchel et al., 2021). Además, el hecho de que *PGDH3* sea la isoforma cuya actividad es más sensible a la inhibición por retroalimentación por serina también estaría de acuerdo con esta hipótesis (Benstein et al., 2013; Okamura y

Hirai, 2017). En consecuencia, el fenotipo de crecimiento de los mutantes *c-psp1-1*, en los que la RFBS está completamente bloqueada, es similar a los de los mutantes dobles *PGDH1/PGDH2* (*c-pgdh1-2 pgdh2-3*), lo que de nuevo indicaría que PGDH1 y PGDH2 son las principales enzimas que proporcionan sustratos a PSP1 a través de la RFBS.

### 5.3 Función fisiológica de *PGDH3*

Para intentar averiguar la función de PGDH3 en la planta realizamos experimentos de coexpresión, y pudimos encontrar en ellos que la mayoría de los genes coexpresados junto al gen *PGDH3* estaban relacionados con la fotosíntesis, especialmente con las reacciones dependientes de la luz (Tabla 4.5). Este patrón, sin embargo, no se observó cuando realizamos los mismos análisis con los genes *PGDH1* o *PGDH2* (Tablas 4.6 y 4.7). En angiospermas, hay dos rutas implicadas en el transporte cíclico de electrones del PSI, la ruta resistente a antimicina A dependiente de PGR5 (Proton Gradient Regulation 5, de sus siglas en inglés) y del complejo PGRL1 (PGR5-like Photosynthesis Phenotype 1) (Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008; Sugimoto et al., 2013; Shikanai, 2016) y la ruta NDH-dependiente (Ifuku et al., 2011; Shikanai, 2016). Los mutantes de la ruta resistente a antimicina A, *pgr5*, tienen reducida su habilidad para disipar el exceso de energía luminosa del PSII, por lo que se ha concluido que el complejo que contiene PGR5/PGRL1 está implicado en el cambio entre el transporte lineal y cíclico de electrones (Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008; Shikanai, 2016). *PGRL1A* se expresa junto a *PGDH3*, lo que sugiere que podría interactuar de alguna manera con la actividad del PSII. Otros genes relacionados con el PSII también se coexpresan junto con el gen *PGDH3*, como son *ZKT/MET* o *MPH1*. MET1 es una proteína asociada al tilacoide implicada en la formación y reparación del supercomplejo PSII en *Arabidopsis* (Bhuiyan et al., 2015). Por otro lado, se ha sugerido que el papel de MPH1 podría estar implicado en la protección y estabilización del PSII bajo altas intensidades de luz (Liu y Last, 2015). Los resultados de estos análisis de coexpresión obtenidos para el gen *PGDH3* están apoyados por el hecho de que los mutantes *PGDH3* presentan una eficiencia cuántica reducida del PSII (Tabla 4.8).

También vimos que muchos de los componentes de la ruta NDH-dependiente (*NDHM*, *NDHN*, *PNSB1*, *NDHU*, *PNSB3*, *PNSL3*, *PNSL1*, *CRR3*, *LHCA6*) se coexpresaban junto con el gen *PGDH3*. El complejo NDH del cloroplasto está

asociado al PSI formando el supercomplejo NDH-PSI (Shikanai, 2016). Este complejo NDH reduce el pool de plastoquinonas en el flujo cíclico de electrones alrededor del PSI, suministrando, junto con la ruta resistente a la antimicina A, ATP extra y compensando la producción de ATP/NADPH, particularmente bajo condiciones de estrés ambiental (Shikanai, 2016). Sabemos que la actividad de PGDH está acoplada a la producción de NADH (Benstein et al., 2013; Ros et al., 2014). Por ello planteamos que la actividad de PGDH3 está estrechamente asociada o interactúa con el flujo fotosintético de electrones, probablemente por la vía de producción de NADH. Sugerimos que la mutación de *PGDH3* podría perturbar el equilibrio entre ATP/NAD(P)H necesario para el metabolismo del plasto, perjudicando de esta manera el flujo de electrones en la fotosíntesis.

Un estudio muy reciente y que va de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, arroja una posible función de *PGDH3* (Höhner et al., 2021). En este trabajo los autores asociaron el gen *PGDH3* a la fotosíntesis. Observaron cómo mutantes de *pgdh3* presentaban mayor “nonphotochemical quenching”, un mecanismo de protección en plantas para protegerse de los efectos nocivos de la alta intensidad de luz cuando el proceso de absorción de la energía luminosa supera a la capacidad de uso de esa energía. Además, la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> disminuía en estos mutantes. La función propuesta por este trabajo a *PGDH3* es que, esta isoforma estaría implicada en el balance redox del estroma del tilacoide transfiriendo la energía redox formada en forma de NADPH, por las reacciones fotosintéticas, en forma de NADH a través de la reacción catalizada por la actividad PGDH, para usar el 3-PGA que se forma en el ciclo de Calvin y formar NADH. Este NADH, posteriormente podría dejar el cloroplasto a través de la bomba de malato específica de NADH.

Además de la eficiencia cuántica del PSII, otros parámetros fotosintéticos como la asimilación neta de CO<sub>2</sub> o la apertura estomática también se vieron afectados en los mutantes simples del gen *PGDH3* (Tabla 4.8). Estas alteraciones podrían deberse a la reducción de la eficiencia cuántica del PSII en estos mutantes, pero no se puede descartar una interacción directa de la actividad PGDH3 con estos procesos fotosintéticos. En este sentido, encontramos algunos genes coexpresados junto a *PGDH3* que participan en las reacciones de fijación del carbono de la fotosíntesis (*SBPASE*, *GAPB*, *RBCSB-1B*) o en la regulación estomática como es el caso de *CAS*, una proteína cloroplástica importante en la correcta regulación estomática en respuesta a incrementos externos de Ca<sup>2+</sup>.

El estudio metabólico realizado en esta tesis doctoral puede estar sesgado en el sentido de que no se detectaron metabolitos fotosintéticos, ya que la mayoría de ellos están fosforilados y no pueden ser determinados con precisión por el método de cromatografía de gases-espectrometría de masas utilizado. Sin embargo, uno de los cambios metabólicos más importantes que distinguen a los mutantes *PGDH3*, es el ácido glicérico (Tablas 4.1 y 4.3). Este metabolito se redujo en el mutante *pgdh3-1* mucho más que en el mutante *pgdh2-3*, mientras que en la línea doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh3-1* y el triple mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3 pgdh3-1*, los niveles de ácido glicérico siempre fueron más bajos comparados con el mutante simple *c-pgdh1-2* y el doble mutante *c-pgdh1-2 pgdh2-3*. El ácido glicérico podría sintetizarse a partir del 3-PGA, el sustrato de la enzima PGDH, en una reacción catalizada por la PGAP. El 3-PGA es también el primer producto del ciclo de Calvin, y dado que hemos visto que los mutantes *pgdh3-1* muestran una reducción del ratio fotosintético, el contenido de 3-PGA podría estar disminuido en este mutante lo que, a su vez, repercutiría en los niveles de ácido glicérico medidos en este estudio.

Nuestros resultados sugieren que la familia de genes *PGDH* sufrió una divergencia evolutiva de la función probablemente asociada a su localización celular específica. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que *PGDH3* se expresa en las células fotosintéticas activas de las hojas adultas, donde coexiste con la ruta del Glicolato. Esta idea podría otorgar una nueva función para *PGDH3* no relacionada con la biosíntesis de serina. Además, *PGDH3* es la única isoforma de *PGDH* que se acumula en condiciones fluctuantes de luz (Schneider et al., 2019; Niedermaier et al., 2020).

Otra cuestión importante que queda por aclarar es porqué la mutación en *PGDH3* mejora el crecimiento respecto a los otros mutantes *PGDH*. Dado que esta mejora en el crecimiento no se observó en un fondo genético silvestre, la explicación más plausible es que la reducción de la actividad fotosintética pueda ser beneficiosa para los mutantes *PGDH*. Las líneas de *Arabidopsis* con una reducción de la actividad de la RFBS acumulan aminoácidos y azúcares que no pueden ser usados para el crecimiento (Cascales-Miñana et al., 2013). Lo más probable es que una actividad fotosintética reducida pueda modular y/o equilibrar la homeostasis entre los carbohidratos y los aminoácidos, lo que puede beneficiar la recuperación del crecimiento.

## 5.4 La sobreexpresión de la RFBS no afecta positivamente al crecimiento de la planta en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental

En los estudios con mutantes de *PGDH1* hemos demostrado que una deficiencia en esta ruta puede afectar al crecimiento vegetativo de la planta. Estos resultados corroboran estudios previos que mostraron que el crecimiento de líneas silenciadas del gen *PGDH1* o del gen *PSAT1*, o líneas mutantes condicionales para el gen *PSP1* mostraron una reducción del área foliar o del peso de la parte aérea, y sobre todo un menor crecimiento de la raíz (Benstein et al., 2013; Cascales-Miñana et al., 2013; Wulfert y Krueger, 2018). Nuestro estudio junto con el resto de trabajos confirman que, a pesar de la magnitud de la ruta del Glicolato, la RFBS es la ruta determinante en el crecimiento de la planta.

Los análisis de la caracterización fenotípica de líneas triples sobreexpresoras (TriOex) en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub>, muestran que un incremento de la expresión de los tres genes principales de la RFBS no produce un mayor crecimiento, al contrario de lo que cabría esperar al observar la disminución de crecimiento en los mutantes (Figuras 4.16A y 4.18A; Benstein et al., 2013; Cascales-Miñana et al., 2013; Wulfert y Krueger, 2018). En este sentido, observamos que, o no existen cambios o se produce una disminución del crecimiento de algunas líneas (Figura 4.18A). Otros estudios con plantas sobreexpresoras de genes de la RFBS muestran un menor crecimiento de la parte aérea en plantas sobreexpresoras del gen *PGDH1* crecidas *in vitro* en condiciones estándar (Rosa-Téllez et al., 2020), resultados que hemos podido comprobar al menos en una de las líneas Oex PGDH1 ensayadas (Figura 4.18A).

El fenotipo más claro de mutantes deficientes de la RFBS es la reducción del crecimiento de la raíz (Benstein et al., 2013; Cascales-Miñana et al., 2013; Toujani et al., 2013a; Wulfert y Krueger, 2018). En trabajos previos donde se analizaron líneas sobreexpresoras del gen *PSP1*, no hubo un incremento en el crecimiento de la raíz respecto al WT (Cascales-Miñana et al., 2013). En nuestro caso, un aumento de la expresión de la RFBS en condiciones ambientales en las cuales es activa la ruta fotorrespiratoria no tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de la raíz (Figuras 4.16B y 4.18B). Aunque dos de las cuatro líneas TriOex presentan una disminución en el crecimiento respecto de la línea control, no se apreció una tendencia clara de

crecimiento diferencial de la raíz de las líneas TriOex respecto al control. Por otro lado, las líneas que sobreexpresan el gen *PGDH1*, solo una de ellas presentaba una ligera disminución en la longitud de la raíz. Es muy probable que la reducción del crecimiento de algunas líneas sobreexpresoras esté relacionado con un efecto dosis de expresión del transgen, de manera que solo observamos reducción del crecimiento en las líneas con muy altos niveles de expresión de *PGDH1*, como son las líneas TriOex2-49 y la Oex *PGDH1*-L2 de la que deriva.

Tomando en conjunto los datos de la parte aérea y de la raíz de las líneas triples sobreexpresoras de la RFBS, concluimos que la sobreexpresión de la ruta tanto a nivel del gen *PGDH1*, como a nivel de los tres genes principales de la ruta (*PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1*) no afecta de una forma clara al crecimiento vegetativo de la planta en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental, aunque un exceso de expresión podría tener un efecto negativo sobre el crecimiento.

## 5.5 La sobreexpresión de la RFBS puede tener un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta en condiciones de CO<sub>2</sub> elevado

El incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> asociado al cambio climático puede afectar a la nutrición, al desarrollo y al metabolismo de vegetal (Takatani et al., 2014; Gamage et al., 2018). Es por ello que en este trabajo también se ha estudiado el efecto de concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> en el metabolismo y crecimiento de las líneas TriOex y Oex *PGDH1*, y qué cambios se producen como consecuencia de ello. Como ya se ha comentado anteriormente, estas condiciones inhiben en mayor medida la ruta de síntesis de serina asociada a la fotorrespiración.

Se han realizado pocos estudios sobre el papel de la RFBS en condiciones de elevada concentración de CO<sub>2</sub> ambiental. Solo se han publicado algunos relacionados con mutantes silenciados del *PSAT1* o del *PGDH1*, en los que se comprobó que al crecer estas líneas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> se produce una mayor inhibición del crecimiento que en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Benstein et al., 2013; Wulfert y Krueger, 2018). Con estos resultados se concluyó que, aunque la RFBS es la ruta que más afecta al crecimiento vegetal, la ruta del Glicolato también contribuye a mantener el crecimiento de la planta.



En el caso de nuestras líneas sobreexpresoras y del WT, al comparar los pesos frescos de la parte aérea entre las líneas crecidas en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> y esas mismas líneas en condiciones ambientales, observamos un incremento de la biomasa aérea (Figura 4.18A y C). Este incremento de la biomasa ya se ha asociado en la literatura a una exposición de elevados niveles de CO<sub>2</sub>, ya que bajo estas condiciones se ha observado que hay una mejora del ratio fotosintético de la carboxilación de la Rubisco junto con un aumento de la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis o con el metabolismo del carbono (Gamage et al., 2018). Por otra parte, estos resultados confirman que la RFBS es suficiente para mantener el crecimiento de las plantas, incluso en condiciones de elevado CO<sub>2</sub>, donde la actividad fotorrespiratoria es mínima.

Cuando cultivamos las plantas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> y comparamos las líneas sobreexpresoras con las plantas control, la respuesta es diferente si analizamos la parte aérea o las raíces (Figura 4.18C y D). No se observaron cambios significativos de crecimiento de la parte aérea respecto al control en la mayoría de las líneas sobreexpresoras. Sin embargo, sí que se pudo observar una mejora significativa en el crecimiento de la longitud de la raíz primaria en las líneas TriOex al compararlas con las raíces de las plantas control. Una tendencia similar se observó también en una de las líneas sobreexpresoras Oex PGDH1, aunque no fue significativa (Figura 4.18D).

Los resultados de metabolómica mostraron que en todas las líneas sobreexpresoras (tanto las TriOex como las Oex PGDH1) existe un mayor contenido relativo de serina respecto al WT en las raíces, mayor incluso que el control en condiciones ambientales (Figura 4.22C y Tabla 4.14). Es posible que este mayor contenido de serina pueda explicar en parte las diferencias de crecimiento de la raíz entre TriOex y WT, pero no puede explicar el mayor crecimiento de las TriOex con respecto a las Oex PGDH1. Por ello, pensamos que en este mayor efecto sobre el crecimiento de la raíz observado en las líneas TriOex estén implicados varios factores relacionados con el metabolismo en estas líneas.

## 5.6 La sobreexpresión de la RFBS afecta al metabolismo de aminoácidos

Los datos de metabolómica obtenidos con las líneas sobreexpresoras permiten concluir que la sobreexpresión de la RFBS aumenta fundamentalmente el contenido de aminoácidos tanto en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental como en alto CO<sub>2</sub> y tanto en parte aérea como en raíces, aunque el efecto es más evidente en parte aérea y sobre todo en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (Tablas 4.9, 4.10, 4.12 y 4.13).

Resultados previos de nuestro grupo utilizando líneas Oex PGDH1 ya habían observado un incremento del contenido de aminoácidos en las líneas Oex PGDH1 cultivadas en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> (Rosa-Téllez et al., 2020). Además, en otro trabajo realizado con plantas sobreexpresoras del gen *PSP1* también se observó un incremento generalizado de los niveles de aminoácidos en plantas cultivadas en CO<sub>2</sub> ambiental (Cascales-Miñana et al., 2013).

Al comparar los perfiles metabolómicos de las plantas cultivadas en elevado CO<sub>2</sub> con los de las cultivadas en condiciones ambientales, pudimos apreciar que existe una disminución del contenido en un gran número de aminoácidos en la parte aérea (Tabla 4.11), siendo esta disminución mucho más drástica en el control que en las líneas sobreexpresoras (Oex PGDH1 y TriOex). Así, en las plantas control más del 50% de los aminoácidos analizados redujeron sus niveles al compararlos con los niveles en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental. Cabe destacar la bajada drástica de los niveles de glicina (casi el 80%) y de serina (aproximadamente el 50%), aminoácidos derivados directamente del ciclo fotorrespiratorio. Sin embargo, esta reducción fue atenuada en las plantas sobreexpresoras lo que confirma que la RFBS puede compensar en gran medida la reducción del contenido en aminoácidos asociados a la baja actividad fotorrespiratoria.

No todos los aminoácidos disminuyen cuando se cultivan las plantas en alto CO<sub>2</sub>. En estas condiciones se observó también un aumento del contenido de algunos aminoácidos como asparagina, aspartato, glutamato y glutamina, aumentando en todas las líneas, incluso en el control, al compararlas con el control cultivado en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> (Tabla 4.11). De todos estos aminoácidos, el glutamato es el único que está directamente asociado con la actividad fotorrespiratoria. A través de la actividad de la glutamato-glioxilato amino

transferasa, el glutamato cede su grupo amino al glioxilato para formar glicina. Si se reduce la actividad fotorrespiratoria, disminuye el contenido de glicina y se acumula glutamato tal como se observa en el perfil metabólico de las líneas cultivadas en alto CO<sub>2</sub>. Además, el glutamato es el precursor del resto de aminoácidos que aumentan bajo estas condiciones. El glutamato es el dador del grupo amino para la formación de aspartato en la reacción catalizada por la aspartato aminotransferasa, otro aminoácido que se acumula en alto CO<sub>2</sub>. A su vez, la asparagina deriva del aspartato en una reacción catalizada por la asparagina sintasa. Por otro lado, el aminoácido que más se acumula en condiciones de alto CO<sub>2</sub> es la glutamina. Este aminoácido también deriva del glutamato en la reacción catalizada por la GS. Por tanto, la mayor acumulación de glutamato y aspartato en las líneas sobreexpresoras puede indicar una mayor reducción del flujo fotorrespiratorio en estas, tanto en condiciones fotorrespiratorias como no fotorrespiratorias asociado a la mayor actividad de la RFBS, o bien que la RFBS puede regular los niveles de estos aminoácidos por vías distintas a las fotorrespiratorias. Estos resultados apoyarían por tanto trabajos previos en los que conectan a la RFBS con el metabolismo del azufre y del nitrógeno (Anoman et al., 2019; Zimmermann et al., 2021a).

En otros trabajos en *Arabidopsis* también se ha mostrado un aumento de los aminoácidos derivados de glutamato bajo condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (Watanabe et al., 2014). Estos aminoácidos son la principal forma de transporte de nitrógeno reducido por la planta. También se ha comprobado que se encuentran en mayor proporción cuando se activa el catabolismo de las proteínas, para movilizar el nitrógeno disponible cuando la planta presenta un déficit de este elemento (Tegeder y Masclaux-Daubresse, 2018). Estudios realizados con plantas bajo condiciones no fotorrespiratorias muestran que en estas existe una disminución en el contenido de nitrógeno principalmente en las hojas (Tabla 4.11; Takatani et al., 2014; Gamage et al., 2018), que podría estar relacionado con el menor contenido proteico observado bajo estas condiciones. Por tanto, el aumento de los aminoácidos derivados del glutamato en altas concentraciones de CO<sub>2</sub> podría ser una respuesta a la deficiencia en el contenido total de nitrógeno en la planta en estas condiciones. En condiciones de baja actividad fotorrespiratoria, el nitrógeno se estaría movilizando en forma de asparagina, aspartato, glutamato y glutamina para su distribución y transporte en aquellos órganos donde fuera necesario. El aumento sobre todo de la glutamina y asparagina es mayor en las líneas sobreexpresoras que en el control cuando se comparan con el control cultivado en

condiciones ambientales (Tabla 4.11), lo que podría indicarnos que en estas líneas la respuesta a la deficiencia de nitrógeno es mayor que en el control, lo que explicaría además, que la disminución del contenido de aminoácidos no sea tan drástica como en el control y que, por lo tanto, el contenido proteico, aunque baja en alto CO<sub>2</sub>, se mantiene en niveles de la línea silvestre en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Figura 4.23C y D).

Nuestros resultados demuestran que el metabolismo de aminoácidos en general no está activado en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> sino solo los derivados del glutamato lo que podría afectar a la síntesis proteica por déficit de algunos de ellos. Es decir, la menor disponibilidad de algunos aminoácidos en las plantas cultivadas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> podría, a su vez, ser una de las causas de la reducción del contenido proteico.

En estudios anteriores a esta tesis realizados con las líneas sobreexpresoras del gen *PGDH1* se observó que estas líneas conseguían tener unos niveles de serina superiores al control en condiciones ambientales (Toujani et al., 2013a; Rosa-Téllez et al., 2020). En nuestro caso, las líneas Oex PGDH1 y las TriOex presentan un incremento de los niveles de serina tanto en la parte aérea como en las raíces, en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental y elevado CO<sub>2</sub>, comparándolas con la línea control (Figuras 4.20A y B y 4.22A y B). En este sentido, se puede observar como en la parte aérea de las líneas controles disminuye de manera significativa el contenido de serina en alto CO<sub>2</sub> al compararlo con el contenido obtenido en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> (Figura 4.20C). Es importante señalar que los niveles de serina en la parte aérea de las líneas sobreexpresoras cultivadas en alto CO<sub>2</sub> se mantienen incluso por encima de los valores de los controles cultivados en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental. El mantenimiento de estos niveles altos de serina en la parte aérea podría ser la causa de la atenuación de la caída de los niveles de los otros aminoácidos en estas líneas, sobre todo los derivados del glutamato, ya que se ha demostrado una implicación de la RFBS en el metabolismo del nitrógeno (Zimmermann et al., 2021a). Si esto es así, nuestros datos sugieren que los niveles de serina son esenciales para controlar la homeostasis del resto de aminoácidos en la planta, y por tanto de los procesos que lleva asociados, fundamentalmente la síntesis proteica.

La reducción de los niveles de algunos aminoácidos en condiciones no fotorrespiratorias estaría relacionada también con la acumulación de

intermediarios del ciclo de Krebs y sobre todo de carbohidratos solubles, que son los que proporcionan esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos. De acuerdo con esto, encontramos que las plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub>, poseen menores niveles de proteínas y mayor nivel de carbohidratos (solubles o almidón), como discutiremos a continuación. En las líneas sobreexpresoras, los mayores niveles de aminoácidos comparados con los controles cultivados en las mismas condiciones están asociados a una reducción drástica de azúcares solubles en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (Tabla 4.10). Esta reducción apoyaría la mayor demanda de esqueletos carbonados en las líneas sobreexpresoras que en las líneas control para la síntesis de aminoácidos. No obstante, esta reducción también podría estar relacionada con la mayor acumulación de almidón en estas líneas que reduciría el pool de azúcares solubles como se discute posteriormente.

A diferencia de la parte aérea, en raíces, no se produjo la bajada de los niveles de algunos aminoácidos al cultivar las plantas en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, incluidos la glicina y la serina (Tablas 4.11 y 4.14, y Figura 4.22C). Esto podría indicar que el metabolismo de aminoácidos en raíces no se ve tan afectado por la actividad de la ruta fotorrespiratoria. Por el contrario, sí que encontramos aumentos de los niveles de glutamina, glutamato, asparagina y aspartato al igual que ocurría en la parte aérea (Tablas 4.11 y 4.14). Como ya se ha indicado, estos aminoácidos son formas de transporte de nitrógeno reducido por los haces vasculares y por tanto podrían provenir de la parte aérea.

Otro aspecto importante que discutir sobre los resultados obtenidos en las líneas sobreexpresoras es que al sobreexpresar la RFBS, a nivel de los tres genes principales (*PGDH1*, *PSAT1* y *PSP1*), no se consiguen mayores niveles de serina que cuando solamente sobreexpresamos un gen (*PGDH1*). Nuestros estudios muestran una correlación clara entre los niveles de serina y la expresión de *PGDH1*, siendo los menores niveles de serina observados en la línea TriOex1-40 asociados con menores niveles de expresión de este gen. Por otra parte, algunos estudios relacionados con la actividad de las tres isoformas PGDH muestran que tienen una sensibilidad diferencial a la regulación de la actividad por retroalimentación por serina, siendo las isoformas PGDH1 y PGDH3 inhibidas por este aminoácido, mientras que PGDH2 es insensible a la inhibición por serina (Benstein et al., 2013; Okamura y Hirai, 2017). Esto podría hacer que, aunque el gen *PGDH1* se sobreexpresa, la inhibición de la actividad de PGDH1 por el producto final de la RFBS, que es la serina, esté generando un cuello de botella en la primera reacción

de la ruta que impide que el flujo hacia la síntesis de serina sea todavía mayor. Nuestro trabajo confirma que el paso limitante en la RFBS es PGDH1 tanto a nivel transcripcional como postraducciona.

## 5.7 Las líneas TriOex incrementan el contenido de almidón y proteínas

La RFBS es un punto de conexión entre el metabolismo del carbono, del nitrógeno y del azufre (Cascales-Miñana et al., 2013; Ros et al., 2014; Anoman et al., 2015; Wulfert y Krueger, 2018; Anoman et al., 2019; Zimmermann et al., 2021a). Debido al papel central de esta ruta se analizó el contenido de almidón y proteínas en las líneas sobreexpresoras de la RFBS.

En primer lugar, se observó un incremento del contenido de almidón en alto CO<sub>2</sub> respecto a condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental tanto en las líneas sobreexpresoras como en los controles. Esto último también se ha documentado en otros trabajos, en plantas de patata o *Arabidopsis*, donde se observó un incremento del contenido de almidón al crecer las plantas en condiciones no fotorrespiratorias (Katny et al., 2005; Teng et al., 2006; Watanabe et al., 2014). Estos resultados están relacionados con que en un ambiente rico en CO<sub>2</sub> se incrementa el ratio de carboxilación de la enzima Rubisco respecto de la actividad oxigenasa, incrementando por tanto el flujo del carbono fijado por la Rubisco hacia la producción de carbohidratos y una mayor tasa neta de fotosíntesis en plantas con metabolismo C<sub>3</sub> (Drake et al., 1997; Takatani et al., 2014; Gamage et al., 2018). Además, existe un mejor rendimiento fotosintético, ya que al haber una menor tasa fotorrespiratoria no se pierde carbono en forma de CO<sub>2</sub> en la ruta fotorrespiratoria. Esto mismo se puede ver en el incremento significativo que se observa en los niveles de fructosa en la parte aérea en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, siendo un aumento del orden de hasta 10 veces más en todas las líneas incluido el control respecto del control en condiciones normales. Además de esto, también se observa un incremento generalizado de los ácidos orgánicos lo que muestra una inducción del metabolismo del carbono en elevado CO<sub>2</sub> (Tabla 4.11).

Trabajos con mutantes del gen *PGDH1* o del gen *PSP1* o bien sobreexpresoras para uno de estos dos genes por separado mostraron que modificando la actividad de la RFBS puede afectar al metabolismo del carbono

generando cambios a nivel de la glucólisis o en el contenido de azúcares y ácidos orgánicos (Cascales-Miñana et al., 2013; Toujani et al., 2013a). Al comparar el contenido de almidón en la parte aérea de las líneas sobreexpresoras de la RFBS con los controles observamos un incremento significativo de almidón en casi todas las líneas tanto en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental como en alto CO<sub>2</sub> (Figura 4.23A). En ambas condiciones no se observaron grandes cambios en el contenido de ácidos orgánicos, pero sí se observó un incremento de los niveles de sacarosa en algunas de las líneas sobreexpresoras (Tablas 4.9 y 4.10). Por tanto, las líneas sobreexpresoras acumulan mayor cantidad de las dos principales formas de reserva de carbono en las plantas, sacarosa y almidón. Estos resultados indican que la mayor producción de serina en las líneas sobreexpresoras podría ser suficiente para su contribución en el metabolismo vegetal y por lo tanto para su uso en la síntesis de otros componentes celulares. Así, la mayor síntesis de serina por la RFBS en las líneas sobreexpresoras permitiría una menor salida de la serina del ciclo fotorrespiratorio y por tanto una mayor regeneración del 3-PGA para su incorporación en el ciclo de Calvin, acumulándose más carbohidratos en forma de almidón y sacarosa.

En segundo lugar, también se ha demostrado una conexión de la RFBS con el metabolismo del nitrógeno y del azufre que podría afectar a la síntesis de proteínas. Trabajos con líneas deficientes en la RFBS mostraron una perturbación en la homeostasis del azufre y una mayor acumulación de aminoácidos relacionados con el metabolismo del nitrógeno asociado con un menor “turnover”, todo lo cual podría estar relacionado con una menor síntesis de proteínas en estas plantas (Anoman et al., 2019; Zimmermann et al., 2021a).

Cuando se analizaron los contenidos en proteínas totales en las plantas ensayadas pudimos comprobar que las líneas TriOex presentaban un incremento generalizado del contenido total de proteínas, tanto en la parte aérea como en las raíces, cuando fueron comparadas con los valores del control en las mismas condiciones de CO<sub>2</sub> (Figura 4.23C y D). Tomando en conjunto estos datos junto con los datos de metabolómica obtenidos se observa un cambio en el metabolismo del nitrógeno reflejado por un incremento del contenido de aminoácidos, incluida la serina, y este aumento iría asociado a un incremento en el contenido proteico (Figuras 4.20, 4.22 y 4.23C y D, y Tablas 4.9 a 4.14). Estos resultados sugieren que la mayor disponibilidad de serina en las líneas sobreexpresoras estimularía el

metabolismo del nitrógeno y del azufre para la síntesis de otros aminoácidos, y finalmente, para la síntesis proteica.

Nuestros resultados también mostraron que el contenido de proteínas de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> disminuye respecto a las condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental en todas las líneas (Figura 4.23C y D). Otros trabajos ya han asociado una disminución del contenido proteico a un aumento en los niveles de CO<sub>2</sub> (Taub et al., 2008; Wieser et al., 2008; Medek et al., 2017) lo que tiene un efecto negativo sobre la calidad nutricional de los cultivos agrícolas. Se han apuntado varias causas para explicar esta disminución del contenido proteico al aumentar los niveles de CO<sub>2</sub>. Se sabe que el aumento de este gas cambia la homeostasis del contenido del nitrógeno en la planta, ya que cambia el ratio carbono/nitrógeno (Gamage et al., 2018). Algunos estudios han demostrado que la asimilación del nitrógeno disminuye significativamente cuando las plantas se encuentran en un ambiente rico en CO<sub>2</sub>, lo que puede conducir a una disminución de la producción de nitrógeno orgánico (como por ejemplo proteínas; Rachmilevitch et al., 2004; Bloom et al., 2010). Otros autores explican que otra de las posibles causas de la disminución del contenido de nitrógeno en plantas podría relacionarse con la dilución del contenido de este al incrementarse el crecimiento de la planta y aumentar el contenido de carbohidratos a expensas de las proteínas (Gamage et al., 2018).

Independientemente del mecanismo por el cual se disminuye el contenido proteico en condiciones de altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, en las líneas sobreexpresoras se consiguió mantener un nivel de proteínas similar al control en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Figura 4.23C y D). Como ya se ha comentado, el cultivo de las plantas en alto CO<sub>2</sub> afecta a la homeostasis del metabolismo de los aminoácidos habiendo una disminución generalizada de estos. Sin embargo, esta disminución es mucho menor en las líneas sobreexpresoras. Por ello, nuestra hipótesis es que el nivel de síntesis proteica en condiciones de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> se puede mantener en las líneas sobreexpresoras en niveles similares a los de los controles cultivados en CO<sub>2</sub> ambiental gracias a los altos niveles de aminoácidos medidos en estas líneas.

Teniendo en cuenta los datos del contenido de almidón y contenido de proteínas de las líneas Oex PGDH1 y TriOex, podemos concluir que las líneas sobreexpresoras poseen mayores niveles de ambos con respecto al control sin que se afecte al crecimiento de la planta. Por tanto, la RFBS podría contribuir a la



homeostasis carbohidratos/proteínas especialmente en condiciones de cambio climático. Estos resultados tienen un claro interés biotecnológico y sugieren que la ingeniería genética de la RFBS podría utilizarse como estrategia para aumentar la calidad nutricional de las plantas en especial en condiciones de actividad fotorrespiratoria reducida asociada al cambio climático.

### 5.8 Plantas de maíz sobreexpresoras de la RFBS contienen más almidón

Los análisis realizados con plantas triples sobreexpresoras de la RFBS de *Arabidopsis*, una planta con metabolismo  $C_3$ , también se llevaron a cabo en una planta con metabolismo  $C_4$ , el maíz, donde la ruta fotorrespiratoria tiene una menor contribución a la síntesis de serina. Para ello utilizamos plantas transgénicas de maíz que sobreexpresan el gen *PGDH1* de *Arabidopsis* (ZmOex PGDH1). En estas líneas se observó un aumento del contenido de almidón de todas las líneas a excepción de la línea ZmOex PGDH1-31 en hojas (Figura 4.24A y B). Al igual que ocurre con las líneas sobreexpresoras en *Arabidopsis*, el aumento de almidón solo se observó en la parte aérea de la planta (Figura 4.23A y 4.24A y B). En relación al contenido en proteínas, solo se observó un aumento significativo del contenido proteico en el tallo de solo una de las líneas (Figura 4.24E). Los análisis realizados en maíz fueron en condiciones de  $CO_2$  ambiental, y a pesar de que es una planta  $C_4$  con un sistema propio de concentración de  $CO_2$  en las inmediaciones de la enzima Rubisco, sería interesante realizar más análisis en condiciones de alto  $CO_2$ . Por otra parte, hay que tener en cuenta que el gen *PGDH1* de *Arabidopsis* es un gen exógeno a la planta del maíz. Esta consideración es importante porque es posible que el expresar un gen exógeno no tenga la misma contribución que sobreexpresar un gen endógeno propio, en este caso del maíz. Sería interesante, por tanto, realizar futuros estudios sobreexpresando los genes propios de maíz.

No obstante, el aumento del contenido de almidón observado en plantas de maíz sobreexpresoras de la PGDH1, podría tener efectos prácticos muy beneficiosos, ya que el maíz es una planta muy importante no solo por su utilización agroalimentaria sino también para la producción de bioetanol como combustible.



## 6. CONCLUSIONES



Las conclusiones obtenidas de esa tesis doctoral son las siguientes:

1. La actividad del gen *PGDH1* puede compensar mejor los fenotipos de crecimiento asociados a *PGDH2* que los asociados a la deficiencia de *PGDH3*. También concluimos que *PGDH1* es el gen de la familia *PGDH* que más contribuye al crecimiento vegetativo de las plantas, como ya se había observado en otros trabajos, siendo importante para el desarrollo del embrión y del gametofito masculino.
2. Nuestros resultados sugieren que la familia de genes *PGDH* sufrió una divergencia evolutiva de la función probablemente asociada a su localización celular específica. Los genes *PGDH1* y *PGDH2* son parcialmente redundantes y cooperan en la RFBS para aportar serina a órganos específicos de la planta mientras que *PGDH3* podría tener otras funciones en tipos celulares específicos que podrían estar relacionados o no con el aporte de serina. Hipotetizamos que la actividad de *PGDH3* está estrechamente asociada con el flujo fotosintético de electrones, probablemente por la vía de producción de NADH contribuyendo al balance redox del estroma.
3. El cultivo en alto CO<sub>2</sub> reduce los niveles de la mayoría de aminoácidos y aumenta los niveles de ácidos orgánicos implicados en el ciclo de Krebs, así como los niveles de azúcares, es decir menor relación C/N. Esto conduce a la acumulación de almidón y a la reducción del contenido total de proteínas.
4. La sobreexpresión de las enzimas de la RFBS aumentó los niveles de serina tanto en raíces como en parte aérea. La sobreexpresión de las enzimas PSAT y PSP junto con *PGDH1* no aporta un mayor contenido de serina que la sobreexpresión únicamente de *PGDH1*. Por tanto, la enzima *PGDH1* es la limitante en la RFBS.
5. El mayor contenido de serina en las líneas sobreexpresoras tiene un efecto positivo sobre los niveles de la mayoría de aminoácidos en especial en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, donde su biosíntesis se ve comprometida. Así, en las líneas sobreexpresoras se atenúa la reducción de los niveles de

aminoácidos en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, aumentando los niveles de la mayoría de ellos e incluso manteniendo en algunos casos niveles similares a los de las plantas control cultivadas en condiciones de CO<sub>2</sub> ambiental. El mantenimiento de niveles altos de serina en la parte aérea podría ser la causa de la atenuación de la caída de los niveles de los otros aminoácidos en estas líneas. Si esto es así, nuestros datos sugieren que los niveles de serina son esenciales para controlar la homeostasis del resto de aminoácidos en la planta, y por tanto de los procesos que lleva asociados, fundamentalmente la síntesis proteica.

6. El efecto mitigador de la sobreexpresión de la RFBS sobre el metabolismo de los aminoácidos implica a su vez un aumento del contenido proteico en las líneas de *Arabidopsis* sobreexpresoras y, sorprendentemente, un mayor contenido de almidón con respecto al control sin que afecte al crecimiento de la planta. Por una parte, el mayor contenido de serina de la RFBS puede estimular la síntesis del resto de aminoácidos. Por otra parte, el mayor contenido de serina de la RFBS implicaría que un menor contenido de la serina fotorrespiratoria salga del ciclo y que se recicle de nuevo a 3-PGA, aumentando de este modo la asimilación de azúcares y finalmente almacenándose en forma de almidón.
7. Los cambios en los niveles de almidón al sobreexpresar la RFBS en *Arabidopsis* pudieron confirmarse en plantas de maíz sobreexpresoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis*, no siendo así con el contenido de proteínas. Puesto que los cambios más drásticos asociados a la RFBS, se observaron en condiciones de cultivo en alto CO<sub>2</sub>, se necesitará repetir estos experimentos en dichas condiciones.
8. A pesar de que la RFBS se expresa mayoritariamente en raíces y de observarse niveles mucho más elevados de serina en las líneas sobreexpresoras que en los controles, los efectos observados sobre el metabolismo fueron menos evidentes en este órgano. Los cambios más importantes en las líneas sobreexpresoras de la RFBS en *Arabidopsis* con respecto a los controles, se encontraron en los niveles de proteína. Estos resultados apoyan que los aumentos de almidón observados en las partes

aéreas de las líneas sobreexpresoras están relacionados con la actividad fotorrespiratoria.

9. El aumento de los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico afecta a la homeostasis del carbono y del nitrógeno, favoreciendo el metabolismo de los carbohidratos y reduciendo el de aminoácidos y proteínas. El efecto de la RFBS sobre la homeostasis carbohidratos/proteínas es más evidente en condiciones de cambio climático. Los resultados de esta tesis indican que la ingeniería genética de la RFBS podría utilizarse como estrategia para aumentar la calidad nutricional de las plantas en especial en condiciones de actividad fotorrespiratoria reducida.





## 7. BIBLIOGRAFÍA



- AIMP (2011). Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map by the *Arabidopsis* interactome mapping consortium. *Science* 333, 601–607. doi:10.1126/SCIENCE.1203877.
- Anoman, A. D., Flores-Tornero, M., Benstein, R. M., Blau, S., Rosa-Téllez, S., Bräutigam, A., et al. (2019). Deficiency in the phosphorylated pathway of serine biosynthesis perturbs sulfur assimilation. *Plant Physiol.* 180, 153–170. doi:10.1104/pp.18.01549.
- Anoman, A. D., Muñoz-Bertomeu, J., Rosa-Téllez, S., Flores-Tornero, M., Serrano, R., Bueso, E., et al. (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. doi:10.1104/pp.15.00696.
- Baslam, M., Mitsui, T., Sueyoshi, K., y Ohyama, T. (2021). Recent advances in carbon and nitrogen metabolism in C<sub>3</sub> plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–39. doi:10.3390/ijms22010318.
- Bauwe, H., Hagemann, M., y Fernie, A. R. (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci.* 15, 330–336. doi:10.1016/j.tplants.2010.03.006.
- Benstein, R. M., Ludewig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., et al. (2013). *Arabidopsis* phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *Plant Cell* 25, 5011–5029. doi:10.1105/tpc.113.118992.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293–300. doi:10.1128/JB.62.3.293-300.1951.
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.* 186, 595–600. doi:10.1128/JB.186.3.595-600.2004.
- Bhuiyan, N. H., Friso, G., Poliakov, A., Ponnala, L., y van Wijk, K. J. (2015). MET1 is a thylakoid-associated TPR protein involved in photosystem II supercomplex formation and repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27, 262–285. doi:10.1105/TPC.114.132787.

- Birnboim, H. C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523. doi:10.1093/NAR/7.6.1513.
- Bloom, A. J., Burger, M., Asensio, J. S. R., y Cousins, A. B. (2010). Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* 328, 899–903. doi:10.1126/SCIENCE.1186440.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H. P., Matros, A., Peterek, S., et al. (2008). Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 26, 1301–1308. doi:10.1038/nbt.1506.
- Callis, J., Fromm, M., y Walbot, V. (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1, 1183–1200. doi:10.1101/GAD.1.10.1183.
- Casatejada-Anchel, R., Muñoz-Bertomeu, J., Rosa-Téllez, S., Anoman, A. D., Nebauer, S. G., Torres-Moncho, A., et al. (2021). Phosphoglycerate dehydrogenase genes differentially affect *Arabidopsis* metabolism and development. *Plant Sci.* 306, 110863. doi:10.1016/j.plantsci.2021.110863.
- Cascales-Miñana, B., Muñoz-Bertomeu, J., Flores-Tornero, M., Anoman, A. D., Pertusa, J., Alaiz, M., et al. (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. doi:10.1105/tpc.113.112359.
- Char, S. N., Neelakandan, A. K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M. H., et al. (2017). An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol. J.* 15, 257–268. doi:10.1111/PBI.12611.
- Christensen, A. H., y Quail, P. H. (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5, 213–218. doi:10.1007/BF01969712.
- Clough, S. J., y Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x.

- Crozier, A., Clifford, M. N., y Ashihara, H. (2007). Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1002/9780470988558.
- Curtis, M. D., y Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133, 462–469. doi:10.1104/pp.103.027979.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., y Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5–17. doi:10.1104/pp.105.063743.
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., et al. (2008). A Complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132, 273–285. doi:10.1016/J.CELL.2007.12.028.
- Diehl, F. F., Lewis, C. A., Fiske, B. P., y Vander Heiden, M. G. (2019). Cellular redox state constrains serine synthesis and nucleotide production to impact cell proliferation. *Nat. Metab.* 1, 861–867. doi:10.1038/s42255-019-0108-x.
- Diretto, G., Welsch, R., Tavazza, R., Mourgues, F., Pizzichini, D., Beyer, P., et al. (2007). Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biol.* 7, 1–8. doi:10.1186/1471-2229-7-11.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., y Rébeillé, F. (2001). The glycine decarboxylase system: A fascinating complex. *Trends Plant Sci.* 6, 167–176. doi:10.1016/S1360-1385(01)01892-1.
- Drake, B. G., Gonzalez-Meler, M. A., y Long, S. P. (1997). More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 609–639. doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.48.1.609.
- Enfissi, E. M. A., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., y Bramley, P. M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 3, 17–27. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x.

- Fang, C., Fernie, A. R., y Luo, J. (2019). Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 24, 83–98. doi:10.1016/j.tplants.2018.09.006.
- Farré, G., Blancquaert, D., Capell, T., Van Der Straeten, D., Christou, P., y Zhu, C. (2014). Engineering complex metabolic pathways in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 187–223. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035825.
- Flores-Tornero, M., Anoman, A. D., Rosa-Téllez, S., y Ros, R. (2015). Lack of phosphoserine phosphatase activity alters pollen and tapetum development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 235, 81–88. doi:10.1016/j.plantsci.2015.03.001.
- Fraser, P. D., Romer, S., Shipton, C. A., Mills, P. B., Kiano, J. W., Misawa, N., et al. (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1092–1097. doi:10.1073/pnas.241374598.
- Furini, A., Koncz, C., Salamini, F., y Bartels, D. (1997). High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO J.* 16, 3599–3608. doi:10.1093/EMBOJ/16.12.3599.
- Gamage, D., Thompson, M., Sutherland, M., Hirotsu, N., Makino, A., y Seneweera, S. (2018). New insights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. *Plant. Cell Environ.* 41, 1233–1246. doi:10.1111/PCE.13206.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151–158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Hellens, R. P., Anne Edwards, E., Leyland, N. R., Bean, S., y Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819–832. doi:10.1023/A:1006496308160.
- Ho, C. L., Noji, M., y Saito, K. (1999a). Plastidic pathway of serine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 11007–11012. doi:10.1074/jbc.274.16.11007.

- Ho, C. L., Noji, M., Saito, M., y Saito, K. (1999b). Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 274, 397–402. doi:10.1074/jbc.274.1.397.
- Ho, C. L., Noji, M., Saito, M., Yamazaki, M., y Saito, K. (1998). Molecular characterization of plastidic phosphoserine aminotransferase in serine biosynthesis from *Arabidopsis*. *Plant J.* 16, 443–452. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00313.x.
- Ho, C. L., y Saito, K. (2001). Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 20, 243–259. doi:10.1007/s007260170042.
- Höhner, R., Day, P. M., Zimmermann, S. E., Lopez, L. S., Krämer, M., Giavalisco, P., et al. (2021). Stromal NADH supplied by phosphoglycerate dehydrogenase 3 is crucial for photosynthetic performance. *Plant Physiol.* 186, 142–167. doi:10.1093/PLPHYS/KIAA117.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., y Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG Mol. Gen. Genet.* 163, 181–187. doi:10.1007/BF00267408.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., et al. (2008). Genevestigator V3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* 2008, 420747. doi:10.1155/2008/420747.
- Humphrey, A. J., y Beale, M. H. (2007). “Terpenes,” en Crozier, A., Clifford, M. N., y Ashihara, H (Eds) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (Blackwell Publishing Ltd.), 47–101. doi:10.1002/9780470988558.ch3.
- Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., y Aro, E.-M. (2011). Structure of the Chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: Nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52, 1560–1568. doi:10.1093/PCP/PCR098.
- Igamberdiev, A. U., y Kleczkowski, L. A. (2018). The glycerate and phosphorylated pathways of serine synthesis in plants: The branches of plant glycolysis linking carbon and nitrogen metabolism. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. doi:10.3389/fpls.2018.00318.
- Inoue, H., Nojima, H., y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28. doi:10.1016/0378-1119(90)90336-P.

- Jez, J. M. (2019). Structural biology of plant sulfur metabolism: From sulfate to glutathione. *J. Exp. Bot.* 70, 4089–4103. doi:10.1093/jxb/erz094.
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays Biochem.* 60, 255–273. doi:10.1042/EBC20160016.
- Judge, A., y Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays Biochem.* 64, 607–647. doi:10.1042/EBC20190041.
- Kalhan, S. C., y Hanson, R. W. (2012). Resurgence of serine: An often neglected but indispensable amino acid. *J. Biol. Chem.* 287, 19786–19791. doi:10.1074/jbc.R112.357194.
- Karp, G. (2017). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*, 7e. McGraw-Hill Education.
- Katny, M. A. C., Hoffmann-Thoma, G., Schrier, A. A., Fangmeier, A., Jäger, H. J., y Van Bel, A. J. E. (2005). Increase of photosynthesis and starch in potato under elevated CO<sub>2</sub> is dependent on leaf age. *J. Plant Physiol.* 162, 429–438. doi:10.1016/J.JPLPH.2004.07.005.
- Kito, K., Tsutsumi, K., Rai, V., Theerawitaya, C., Cha-um, S., Yamada-Kato, N., et al. (2017). Isolation and functional characterization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase involved in salt responses in sugar beet. *Protoplasma* 254, 2305–2313. doi:10.1007/s00709-017-1127-7.
- Kleczkowski, L. A., y Givan, C. V. (1988). Serine formation in leaves by mechanisms other than the Glycolate pathway. *J. Plant Physiol.* 132, 641–652. doi:10.1016/S0176-1617(88)80223-2.
- Kleczkowski, L. A., y Randall, D. D. (1988). Purification and characterization of a novel NADPH(NADH)-dependent hydroxypyruvate reductase from spinach leaves. Comparison of immunological properties of leaf hydroxypyruvate reductases. *Biochem. J.* 250, 145–152. doi:10.1042/bj2500145.
- Kleczkowski, L. A., Randall, D. D., y Blevins, D. G. (1986). Purification and characterization of a novel NADPH(NADH)-dependent glyoxylate reductase from spinach leaves. Comparison of immunological properties of leaf glyoxylate reductase and hydroxypyruvate reductase. *Biochem. J.* 239, 653–659. doi:10.1042/bj2390653.



- Koncz, C., Greve, H. De, André, D., Deboeck, F., Montagu, M. Van, y Schell, J. (1983). The opine synthase genes carried by Ti plasmids contain all signals necessary for expression in plants. *EMBO J.* 2, 1597–1603. doi:10.1002/j.1460-2075.1983.tb01630.x
- Koncz, C., y Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Mol. Gen. Genet.* 204, 383–396. doi:10.1007/BF00331014.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Li, Q., Gao, Y., y Yang, A. (2020). Sulfur homeostasis in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–16. doi:10.3390/ijms21238926.
- Liang, Z., Yu, C., y Huang, A. H. C. (1984). Conversion of glycerate to serine in intact spinach leaf peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 233, 393–401. doi:10.1016/0003-9861(84)90460-0.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., y Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.* 1, 387–396. doi:10.1038/nprot.2006.59.
- Liu, J., y Last, R. L. (2015). A land plant-specific thylakoid membrane protein contributes to photosystem II maintenance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 82, 731–743. doi:10.1111/TPJ.12845.
- Liu, Y., Mauve, C., Lamothe-Sibold, M., Guérard, F., Glab, N., Hodges, M., et al. (2019). Photorespiratory serine hydroxymethyltransferase 1 activity impacts abiotic stress tolerance and stomatal closure. *Plant Cell Environ.* 42, 2567–2583. doi:10.1111/pce.13595.
- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A. B., O’Halloran, D. M., Cosman, K. M., et al. (2006). The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of  $\beta$ -carotene accumulation. *Plant Cell* 18, 3594–3605. doi:10.1105/tpc.106.046417.
- Lücker, J., Bouwmeester, H. J., Schwab, W., Blaas, J., Van Der Plas, L. H. W., y Verhoeven, H. A. (2001). Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. *Plant J.* 27, 315–324. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01097.x.

- Mandel, M., e Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159–162. doi:10.1016/0022-2836(70)90051-3.
- Matsuhara, S., Jingu, F., Takahashi, T., y Komeda, Y. (2000). Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions. *Plant J.* 22, 79–86. doi:10.1046/J.1365-313X.2000.00716.X.
- Maurino, V. G., y Peterhansel, C. (2010). Photorespiration: Current status and approaches for metabolic engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 248–255. doi:10.1016/j.pbi.2010.01.006.
- Medek, D. E., Schwartz, J., y Myers, S. S. (2017). Estimated effects of future atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations on protein intake and the risk of protein deficiency by country and region. *Environ. Health Perspect.* 125, 087002. doi:10.1289/EHP41.
- Mehrmohamadi, M., Liu, X., Shestov, A. A., y Locasale, J. W. (2014). Characterization of the usage of the serine metabolic network in human cancer. *Cell Rep.* 9, 1507–1519. doi:10.1016/J.CELREP.2014.10.026.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282, 662–682. doi:10.1126/science.282.5389.662.
- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M., y Kang, S. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91, 173–180. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.2.173.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., y Shikanai, T. (2002). *PGR5* is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110, 361–371. doi:10.1016/S0092-8674(02)00867-X.
- Muñoz-Bertomeu, J., Cascales-Miñana, B., Alaiz, M., Segura, J., y Ros, R. (2010a). A critical role of plastidial glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the control of plant metabolism and development. *Plant Signal. Behav.* 5, 67–69. doi:10.4161/psb.5.1.10200.

- Muñoz-Bertomeu, J., Cascales-Miñana, B., Irlés-Segura, A., Mateu, I., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., et al. (2010b). The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 1830–1841. doi:10.1104/pp.109.150458.
- Muñoz-Bertomeu, J., Cascales-Miñana, B., Mulet, J. M., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J., Kuhn, J. M., et al. (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. doi:10.1104/pp.109.143701.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi:10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X.
- Nannas, N. J., y Dawe, R. K. (2015). Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. *Genetics* 199, 655–669. doi:10.1534/genetics.114.165183.
- Niedermaier, S., Schneider, T., Bahl, M.-O., Matsubara, S., y Huesgen, P. F. (2020). Photoprotective acclimation of the *Arabidopsis thaliana* leaf proteome to fluctuating light. *Front. Genet.* 11, 154. doi:10.3389/FGENE.2020.00154.
- Okamura, E., y Hirai, M. Y. (2017). Novel regulatory mechanism of serine biosynthesis associated with 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7, 1–7. doi:10.1038/s41598-017-03807-5.
- Patel, R. V., Nahal, H. K., Breit, R., y Provart, N. J. (2012). BAR expressolog identification: Expression profile similarity ranking of homologous genes in plant species. *Plant J.* 71, 1038–1050. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05055.x.
- Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., et al. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* 23, 482–487. doi:10.1038/nbt1082.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Pott, D. M., Osorio, S., y Vallarino, J. G. (2019). From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Front. Plant Sci.* 10, 835. doi:10.3389/FPLS.2019.00835/FULL.

- Rachmilevitch, S., Cousins, A. B., y Bloom, A. J. (2004). Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 11506–11510. doi:10.1073/PNAS.0404388101.
- Ramakrishna, A., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 1720–1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613.
- Randall, D. D., y Tolbert, N. E. (1971a). 3-Phosphoglycerate phosphatase in plants. I. Isolation and characterization from sugarcane leaves. *J. Biol. Chem.* 246, 5510–5517. doi:10.1016/S0021-9258(18)61935-0.
- Randall, D. D., y Tolbert, N. E. (1971b). 3-Phosphoglycerate phosphatase in plants. *Plant Physiol.* 48, 488–492. doi:10.1104/pp.48.4.488.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., y Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312, 105–112. doi:10.1111/nyas.12396.
- Ravilious, G. E., y Jez, J. M. (2012). Structural biology of plant sulfur metabolism: From assimilation to biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1138–1152. doi:10.1039/c2np20009k.
- Reina-Campos, M., Diaz-Meco, M. T., y Moscat, J. (2020). The complexity of the serine glycine one-carbon pathway in cancer. *J. Cell Biol.* 219. doi:10.1083/JCB.201907022.
- Ros, R., Cascales-Miñana, B., Segura, J., Anoman, A. D., Toujani, W., Flores-Tornero, M., et al. (2013). Serine biosynthesis by photorespiratory and non-photorespiratory pathways: An interesting interplay with unknown regulatory networks. *Plant Biol.* 15, 707–712. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00682.x.
- Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J., y Krueger, S. (2014). Serine in plants: Biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci.* 19, 564–569. doi:10.1016/j.tplants.2014.06.003.
- Rosa-Téllez, S., Anoman, A. D., Alcántara-Enguíanos, A., Garza-Aguirre, R. A., Alseekh, S., y Ros, R. (2020). *PGDH* family genes differentially affect *Arabidopsis* tolerance to salt stress. *Plant Sci.* 290, 110284. doi:10.1016/J.PLANTSCI.2019.110284.

- Sage, R. F., Sage, T. L., y Kocacinar, F. (2012). Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 19–47. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105511.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491. doi:10.1126/science.2448875.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., et al. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354. doi:10.1126/science.2999980.
- Saito, K., Takagi, Y., Ling, H. C., Takahashi, H., y Noji, M. (1997). Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding phosphoserine aminotransferase involved in phosphorylated pathway of serine biosynthesis from spinach. *Plant Mol. Biol.* 33, 359–366. doi:10.1023/A:1005730725764.
- Schneider, T., Bolger, A., Zeier, J., Preiskowski, S., Benes, V., Trenkamp, S., et al. (2019). Fluctuating light interacts with time of day and leaf development stage to reprogram gene expression. *Plant Physiol.* 179, 1632–1657. doi:10.1104/PP.18.01443.
- Scholl, R. L., May, S. T., y Ware, D. H. (2000). Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 1477–1480. doi:10.1104/pp.124.4.1477.
- Serino, G., y Gusmaroli, G. (2011). "*Arabidopsis thaliana* as an Experimental Organism." en *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley and Sons, Ltd.). doi:10.1002/9780470015902.a0002031.pub2.
- Shehryar, K., Khan, R. S., Iqbal, A., Hussain, S. A., Imdad, S., Bibi, A., et al. (2019). Transgene stacking as effective tool for enhanced disease resistance in plants. *Mol. Biotechnol.* 62, 1–7. doi:10.1007/s12033-019-00213-2.
- Shikanai, T. (2016). Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 1015–1022. doi:10.1016/J.BBABIO.2015.10.013.
- Stitzer, M. C., y Ross-Ibarra, J. (2018). Maize domestication and gene interaction. *New Phytol.* 220, 395–408. doi:10.1111/nph.15350.

- Suárez, M. F., Avila, C., Gallardo, F., Cantón, F. R., García-Gutiérrez, A., Claros, M. G., et al. (2002). Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *J. Exp. Bot.* 53, 891–904. doi:10.1093/jexbot/53.370.891.
- Sugimoto, K., Okegawa, Y., Tohri, A., Long, T. A., Covert, S. F., Hisabori, T., et al. (2013). A single amino acid alteration in PGR5 confers resistance to antimycin A in cyclic electron transport around PSI. *Plant Cell Physiol.* 54, 1525–1534. doi:10.1093/PCP/PCT098.
- Tabatabaie, L., Klomp, L. W., Berger, R., y de Koning, T. J. (2010). L-serine synthesis in the central nervous system: A review on serine deficiency disorders. *Mol. Genet. Metab.* 99, 256–262. doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.012.
- Takahashi, H. (2010). Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 281, 129–159. doi:10.1016/S1937-6448(10)81004-4.
- Takatani, N., Ito, T., Kiba, T., Mori, M., Miyamoto, T., Maeda, S., et al. (2014). Effects of high CO<sub>2</sub> on growth and metabolism of Arabidopsis seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen. *Plant Cell Physiol.* 55, 281–292. doi:10.1093/PCP/PCT186.
- Tartof, K. D., y Hobbs, C. A. (1988). New cloning vectors and techniques for easy and rapid restriction mapping. *Gene* 67, 169–182. doi:10.1016/0378-1119(88)90394-0.
- Taub, D. R., Miller, B., y Allen, H. (2008). Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 14, 565–575. doi:10.1111/J.1365-2486.2007.01511.X.
- Tegeder, M., y Masclaux-Daubresse, C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol.* 217, 35–53. doi:10.1111/NPH.14876.
- Teng, N., Wang, J., Chen, T., Wu, X., Wang, Y., y Lin, J. (2006). Elevated CO<sub>2</sub> induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 172, 92–103. doi:10.1111/J.1469-8137.2006.01818.X.
- Toujani, W., Muñoz-Bertomeu, J., Flores-Tornero, M., Rosa-Téllez, S., Anoman, A. D., Alseekh, S., et al. (2013a). Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163, 1164–1178. doi:10.1104/pp.113.226720.

- Toujani, W., Muñoz-Bertomeu, J., Flores-Tornero, M., Rosa-Téllez, S., Anoman, A. D., y Ros, R. (2013b). Identification of the phosphoglycerate dehydrogenase isoform EDA9 as the essential gene for embryo and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 8, 8–10. doi:10.4161/psb.27207.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., y Scheible, W. R. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20, 1736–1737. doi:10.1105/tpc.108.061143.
- Voll, L. M., Jamai, A., Renné, P., Voll, H., M, C. R., y Weber, A. P. M. (2006). The photorespiratory arabidopsis *shm1* mutant is deficient in *SHM1*. *Plant Physiol.* 140, 59–66. doi:10.1104/pp.105.071399.
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., et al. (2010). The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 38, W214–W220. doi:10.1093/nar/gkq537.
- Watanabe, C. K., Sato, S., Yanagisawa, S., Uesono, Y., Terashima, I., y Noguchi, K. (2014). Effects of elevated CO<sub>2</sub> on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: Possible relationships with respiratory rates. *Plant Cell Physiol.* 55, 341–357. doi:10.1093/PCP/PCT185.
- Wieser, H., Manderscheid, R., Erbs, M., y Weigel, H.-J. (2008). Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations on the quantitative protein composition of wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6531–6535. doi:10.1021/JF8008603.
- Woodward, A. W., y Bartel, B. (2018). Biology in bloom: A primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics* 208, 1337–1349. doi:10.1534/genetics.118.300755.
- Wulfert, S., y Krueger, S. (2018). *Phosphoserine aminotransferase1* is part of the phosphorylated pathways for serine biosynthesis and essential for light and sugar-dependent growth promotion. *Front. Plant Sci.* 871, 1–14. doi:10.3389/fpls.2018.01712.
- Yamori, W., Hikosaka, K., y Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM plants: Temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth. Res.* 119, 101–117. doi:10.1007/s11120-013-9874-6.

- Yang, C. J., Samayoa, L. F., Bradbury, P. J., Olukolu, B. A., Xue, W., York, A. M., et al. (2019). The genetic architecture of teosinte catalyzed and constrained maize domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 5643–5652. doi:10.1073/pnas.1820997116.
- Ye, X., y Beyer, P. (2000). Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287, 303–305. doi:10.1126/science.287.5451.303.
- Zar, J. (1996). *Biostatistical analysis*. 3rd ed. Upper Saddle River N.J.: Prentice Hall.
- Zimmermann, S. E., Benstein, R. M., Flores-Tornero, M., Blau, S., Anoman, A. D., Rosa-Télez, S., et al. (2021a). The phosphorylated pathway of serine biosynthesis links plant growth with nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* 186, 1487–1506. doi:10.1093/PLPHYS/KIAB167.
- Zimmermann, S. E., Blau, S., Frerigmann, H., y Krueger, S. (2021b). The phosphorylated pathway of serine biosynthesis is crucial for indolic glucosinolate biosynthesis and plant growth promotion conferred by the root endophyte *Colletotrichum tofieldiae*. *Plant Mol. Biol.* 107, 85–100. doi:10.1007/S11103-021-01181-5.
- Zorrilla-López, U., Masip, G., Arjó, G., Bai, C., Banakar, R., Bassie, L., et al. (2013). Engineering metabolic pathways in plants by multigene transformation. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 565–576. doi:10.1387/ijdb.130162pc.
- Zulak, K. G., Liscombe, D. K., Ashihara, H., y Facchini, P. J. (2007). “Alkaloids,” en Crozier, A., Clifford, M. N., y Ashihara, H (Eds) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet* (Blackwell Publishing Ltd.), 102–136. doi:10.1002/9780470988558.ch4.





VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA



BIOTECMED

Estructura de Recerca Interdisciplinar  
en Biotecnologia i Biomedicina