



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA

ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL

**RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO EN
PLANTAS DE SORGO (*Sorghum bicolor* L.) CON
LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA 3
(SbPPC3) O CON LAS FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA QUINASAS 1-3 (SbPPCK1-3)
SILENCIADAS**

Tesis doctoral presentada por

Jesús Pérez López

para optar al título de Doctor en Biología

Sevilla, 2023



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA

ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL

**RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO EN
PLANTAS DE SORGO (*Sorghum bicolor* L.) CON
LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA 3
(SbPPC3) O CON LAS FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA QUINASAS 1-3 (SbPPCK1-3)
SILENCIADAS**

Tesis doctoral presentada por **Jesús Pérez López** para optar al título de Doctor en
Biología
Sevilla, 2023

Directores de la Tesis

Sofía García-Mauriño Ruiz-Berdejo

José Antonio Monreal Hermoso

*A los que fueron,
a los que son*

*“...Caminante no hay camino,
se hace camino al andar...”*

Antonio Machado



PROYECTOS Y AYUDAS

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología vegetal y Ecología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

El doctorando ha sido beneficiario de un contrato predoctoral (personal investigador en formación) del plan propio de la Universidad de Sevilla en áreas de especial atención (**VIPPIT-2018-IV.3**).

Además, este trabajo de tesis doctoral ha sido financiado por diferentes proyectos y ayudas:

- Proyecto FEDER de investigación de I+D de la Junta de Andalucía (Consejería de Economía y Conocimiento): Impacto de la fosfoenolpiruvato carboxilasa sobre las características nutricionales y la tolerancia a la sequía del sorgo: estudio en líneas ARNi y en variedades naturales (Nutrisorgo) (**US-1251626**).
- Proyecto de investigación de I+D de excelencia del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España: Control autofágico de elementos claves del metabolismo: la fosfoenolpiruvato carboxilasa de sorgo en estrés y en semillas (**AGL2016-75413-P**).
- Ayudas a grupos de investigación para la Investigación y la Transferencia del plan propio de la Universidad de Sevilla (**BIO-298**).



COMUNICACIONES A CONGRESOS

Los resultados obtenidos durante este trabajo han sido presentados en las siguientes comunicaciones a congresos:

- **Pérez-López, J., Saéz, T., de la Osa, C., Baena, G, Echevarría C., Monreal J.A., García-Mauriño S., 2019.** Aluminium effects on RNAi *SbPPC3* silenced sorghum lines. Póster presentado al **XVI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**; 26-28 de junio de 2019; Pamplona, España.
- **Pérez-López, J., de la Osa, C., Gandullo J., Feria A.B., García-Mauriño S., Monreal J.A., 2021.** RNAi silencing of *SbPPC3*, a non-photosynthetic PEPC, influences sorghum responses to phosphate deficiency. Póster presentado al congreso **Plan Biology Europe 2021**; 28 de junio-1 de julio de 2021; Turin, Italia.
- **Pérez-López, J., de la Osa, C., Gandullo J., Feria A.B., García-Mauriño S., Monreal J.A., 2021.** Cadmium effects on RNAi *SbPPC3* silenced sorghum lines. Comunicación oral presentada al **XVII Congreso Hispano-Luso de Biología Vegetal**; 7-8 de julio de 2021; Vigo, España.
- **Monreal, J.A., de la Osa, C., Gandullo, J., Baena, G., Pérez-López, J., Feria, A.B., García-Mauriño, S., Echevarría, C., 2021.** Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC): one protein family for multiple plant responses. Comunicación oral invitada en el **XVII Congreso Hispano-Luso de Biología Vegetal**; 7-8 de julio de 2021; Vigo, España.

PUBLICACIONES

Resultados relacionados con esta tesis doctoral y otros obtenidos durante el desarrollo de la misma han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Pérez-López, J., Gandullo J.M., de la Osa C., Feria A.B., Echevarria C., Monreal J.A. García-Mauriño S., 2022.** Responses to aluminum and cadmium of a RNAi sorghum line with decreased levels of phosphoenolpyruvate carboxylase 3 (PPC3). **Environ. Exp. Bot. en revision.**
- **de la Osa C., Pérez-López J., Feria A.B., Baena G., Marino D., Coletto I., Pérez-Montaño F., Gandullo J., Echevarría C., García-Mauriño S., Monreal J.A., 2022.** Knock-down of phosphoenolpyruvate carboxylase 3 negatively impacts growth, productivity, and responses to salt stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Plant J. 111**, 231-249.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	19
II. ABREVIATURAS	25
III. RESUMEN	33
IV. INTRODUCCIÓN	39
1. SORGO (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench)	41
2. ESTRÉS POR METALES: CADMIO Y ALUMINIO	43
2.1. Aluminio	43
2.1.1. Toxicidad por aluminio en plantas	45
2.1.2. Mecanismos de respuesta a la toxicidad por aluminio en plantas	48
<i>Mecanismos de exclusión</i>	48
<i>Mecanismos de tolerancia</i>	49
2.1.3. Efectos del aluminio en la salud humana	51
2.2. Cadmio	51
2.2.1. Toxicidad por cadmio en plantas	54
2.2.2. Mecanismos de respuesta a la toxicidad por cadmio en plantas	57
2.2.3. Efectos del cadmio en la salud	59
3. DÉFICIT DE FÓSFORO	59
3.1. Respuestas al déficit de fósforo	60
3.1.1. Incremento en la adquisición de fósforo	62
<i>Cambios en la arquitectura radicular</i>	62
<i>Incremento del transporte de P</i>	63
<i>Aumento de la solubilización de fósforo</i>	64
3.1.2. Mejora del uso interno del fósforo	66
4. ESTRÉS SALINO	69
4.1. Toxicidad por sal	69
4.2. Tolerancia al estrés salino	70
4.2.1. Homeostasis y compartimentación iónica	71
4.2.2. Síntesis de osmoprotectores y solutos compatibles	71
5. LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA	73
5.1. Familia génica de la PEPC: genes <i>PPC</i>	73
5.2. Estructura de la PEPC	74
5.3. Funciones de la PEPC	76
5.3.1. La PEPC en la fotosíntesis de tipo C ₄ y CAM	76
5.3.2. La PEPC en otros contextos fisiológicos	78
5.4. Regulación de la actividad PEPC	81
5.4.1. Regulación transcripcional	81
5.4.2. Regulación postraduccional	82
<i>Regulación alostérica</i>	82
<i>Regulación por monoubiquitinación, por ácido fosfatídico y por óxido nítrico</i>	83

<i>Regulación por fosforilación reversible</i>	84
6. LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA QUINASA	86
6.1. Familia génica de la PEPCk: Genes <i>PPCK</i>	86
6.2. Regulación de la PEPCk	87
6.2.1. Regulación transcripcional	87
6.2.2. Regulación postraduccional	89
6.2.3. Regulación de la degradación	90
7. LA PEPC Y PEPCk EN EL ESTRÉS ABIÓTICO	91
7.1. Estrés por metales y por falta de fósforo	91
7.1.1. Estrés por cadmio y aluminio	91
7.1.2. Estrés por deficiencia de fósforo	92
7.2. Estrés salino	92
V. OBJETIVOS	95
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	99
1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	101
1.1. Material vegetal	101
1.1.1. Obtención de la línea transgénica <i>Ppc3</i>	101
1.1.2. Obtención de la línea transgénica <i>Ppck</i>	101
1.2. Condiciones generales de cultivo hidropónico	102
1.2.1. Condiciones de cultivo de cada tratamiento	102
<i>Tratamiento de estrés por aluminio</i>	102
<i>Tratamiento de estrés por cadmio</i>	103
<i>Condiciones de cultivo para la obtención de exudados en los tratamientos de aluminio y cadmio</i>	103
<i>Tratamiento de estrés por falta de fósforo</i>	103
<i>Tratamiento de estrés salino</i>	104
1.3. Condiciones de cultivo en invernadero	104
2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS	105
3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	105
4. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	106
4.1. Determinación de la actividad PEPC	106
4.2. Determinación de la actividad PEPCk	106
4.2.1. Actividad PEPCk <i>in vitro</i>	106
4.2.2. Determinación del grado de fosforilación <i>in vivo</i> de la PEPC. Test malato	107
4.3. Determinación de actividades enzimáticas	107
5. TÉCNICAS ANALÍTICAS	108
5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	108
5.2. Determinación del contenido de antocianinas	109
5.3. Cuantificación del contenido de ATP	109
5.4. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	109

5.5. Determinación de malondialdehído	110
5.6. Cuantificación del contenido de prolina	110
5.7. Cuantificación de elementos y de contenido total de fósforo	111
5.8. Caracterización de semillas	111
5.8.1. Determinación de almidón en semillas	111
5.8.2. Medición de fenoles en semillas	111
5.8.3. Cuantificación de fitatos en semillas	112
5.8.4. Cuantificación de taninos en semillas	112
5.8.5. Determinación del peso y el volumen de las semillas	112
6. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	112
6.1. Anticuerpos utilizados	112
6.2. Inmunoblot	113
6.3. Purificación de anticuerpos	113
7. TÉCNICAS MOLECULARES	114
7.1. Extracción de ADN genómico	114
7.2. Extracción ARN	114
7.3. Retrotranscripción de ARN a ADNc	115
7.4. Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	115
7.4.1. PCR a tiempo final	115
7.4.2. PCR en tiempo real (qPCR)	115
8. MEDIDAS DE INTERCAMBIO GASEOSO	117
9. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA	117
10. OTROS MÉTODOS	117
10.1. Transformación de plantas mediante la bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	117
10.2. Inducción de callos y plántulas	118
10.3. Selección de transformantes por resistencia a herbicida	118
10.4. Cuantificación de proteínas y medidas de pH	118
10.5. Tinción con violeta de pirocatecol	118
11. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EXUDADOS	119
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	119
VII. RESULTADOS	121
1. EFECTOS DEL ESTRÉS POR METALES EN PLANTAS DE SORGO CON EL GEN <i>SbPPC3</i> SILENCIADO POR ARNi	123
1.1. Efectos del estrés por aluminio en plantas de sorgo con el gen <i>SbPPC3</i> silenciado por ARNi	123

1.1.1.	Impacto de la toxicidad de aluminio sobre la germinación de semillas <i>Ppc3</i>	123
1.1.2.	Determinación de la unión del aluminio a las raíces de sorgo mediante tinción con violeta de pirocatecol	125
1.1.3.	Efectos de la concentración de aluminio sobre plantas WT	125
1.1.4.	Efecto del estrés por aluminio sobre el desarrollo vegetativo de plantas de sorgo <i>Ppc3</i>	126
1.1.5.	Efectos del aluminio en la actividad PEPC y en la expresión de los genes <i>SbPPC</i>	130
1.1.6.	Efectos de la toxicidad por aluminio sobre la expresión de genes <i>SbPPCK</i> y la actividad <i>PEPCK in vitro</i>	134
1.1.7.	Efecto del aluminio en la secreción de ácidos orgánicos por plantas <i>Ppc3</i>	136
1.2.	Efectos del estrés por cadmio en plantas de sorgo con el gen <i>SbPPC3</i> silenciado por ARNi	139
1.2.1.	Impacto del cadmio sobre la germinación de semillas <i>Ppc3</i>	139
1.2.2.	Efecto del estrés por cadmio sobre el desarrollo vegetativo en plantas de sorgo <i>Ppc3</i>	141
1.2.3.	Efectos del cadmio en la actividad PEPC y la expresión de los genes <i>SbPPC</i>	148
1.2.4.	Efectos del cadmio sobre la expresión de genes <i>SbPPCK</i> y la actividad <i>PEPCK in vitro</i>	151
1.2.5.	Efectos del cadmio en la exudación de ácidos orgánicos	152
1.2.6.	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPC3</i> en la acumulación de cadmio en raíces	154
2.	EFFECTOS DEL DÉFICIT DE FÓSFORO EN PLANTAS DE SORGO CON EL GEN <i>SbPPC3</i> SILENCIADO POR ARNi	155
2.1.	Efecto de la concentración y fuente de fósforo suministrado a plantas de sorgo	155
2.2.	Caracterización de la deficiencia de fósforo en plantas WT de sorgo	163
2.2.1.	Influencia del déficit de fósforo sobre el crecimiento	163
2.2.2.	Determinación del grado de estrés provocado por la falta de fósforo	164
2.2.3.	Cambios en la actividad PEPC inducidos por el déficit de fósforo	166
2.2.4.	Influencia del déficit de fósforo sobre el pH del medio de cultivo	168
2.3.	Efectos del estrés por déficit de fósforo en las líneas <i>Ppc3</i>	170

2.3.1. Efecto de la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento de sorgo <i>Ppc3</i>	170
2.3.2. Influencia del déficit de fósforo sobre parámetros fotosintéticos en plantas <i>Ppc3</i>	172
2.3.3. Acumulación de antocianinas en hojas	175
2.3.4. Respuesta de la PEPC y PEPCk frente a la deficiencia de fósforo en hojas	176
2.3.5. Respuesta de la PEPC y PEPCk frente a la deficiencia de fósforo en raíces	180
2.3.6. Variación en el pH del medio de cultivo	183
2.3.7. Expresión del transportador PHT en raíces y contenido de fósforo en plantas WT y <i>Ppc3</i>	184
2.3.8. Efectos del silenciamiento sobre el contenido en ATP de las plantas sometidas a falta de fósforo	186
2.3.9. Variación en actividades enzimáticas de hojas y raíces como respuesta a la deficiencia de fósforo en plantas WT y <i>Ppc3</i>	187
3. OBTENCIÓN DE PLANTAS DE SORGO CON LOS GENES <i>SbPPCK1-3</i> SILENCIADOS MEDIANTE ARNi	191
3.1. Construcción del vector y transformación de embriones	191
3.2. Transformación de embriones de sorgo	194
3.3. Confirmación y selección de las líneas transgénicas T1 y obtención de semillas T2	194
3.4. Identificación de los sitios de inserción del ADN-T en el genoma de sorgo	198
3.5. Respuestas a estrés abiótico en líneas de sorgo con los genes <i>SbPPCK1-3</i> silenciados	199
3.5.1. Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK</i> en condiciones de deficiencia de fósforo	199
3.5.2. Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> en estrés salino	202
3.6. Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> sobre el tiempo de floración y la productividad	204
VIII. DISCUSIÓN	207
1. EFECTOS DE ESTRESSES ABIÓTICOS EN PLANTAS DE SORGO CON <i>SbPPCK3</i> SILENCIADO	209
1.1. Respuesta a aluminio y cadmio en plantas <i>Ppc3</i>	210
1.2. Respuesta a la deficiencia de fósforo en plantas <i>Ppc3</i>	214
2. CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS DE SORGO CON LOS GENES <i>SbPPCK1-3</i> SILENCIADOS EN CONDICIONES CONTROL Y DE ESTRÉS ABIÓTICO	222
IX. CONCLUSIONES	227
X. BIBLIOGRAFÍA	231
XI. AGRADECIMIENTOS	283

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Fig. 1	Proporción media de los principales elementos químicos que componen la corteza terrestre	43
Fig. 2	Distribución mundial de suelos clasificados según su pH	45
Fig. 3	Principales dianas del aluminio en plantas	47
Fig. 4	Mecanismos generales de la resistencia a aluminio y su asociación con el metabolismo mitocondrial en células de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
Fig. 5	Contribución relativa de las principales fuentes de cadmio a la contaminación de suelos agrícolas	52
Fig. 6	Ratio de acumulación de cadmio	53
Fig. 7	Esquema del cierre estomático inducido por cadmio	54
Fig. 8	Esquema de los efectos del cadmio sobre las células de las hojas y raíces	55
Fig. 9	Esquema de las respuestas múltiples a estrés por cadmio en plantas	57
Fig. 10	Esquema de los mecanismos involucrados en la quelación y compartimentalización de cadmio en la vacuola	58
Fig. 11	Distribución geográfica de las reservas mundiales de roca fosfórica	60
Fig. 12	Esquema hipotético de la expresión de genes de respuesta al déficit de fósforo	61
Fig. 13	Esquema simplificado de los mecanismos de detección de P en <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
Fig. 14	Procesos implicados en la solubilización de P en el suelo	64
Fig. 15	Enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y otras reacciones implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos	65
Fig. 16	Procesos metabólicos alternativos para la glucólisis citosólica, el transporte de electrones mitocondrial y el bombeo de H ⁺ del tonoplasto que pueden ser potenciados bajo condiciones de déficit de P	67
Fig. 17	Suelos afectados por sal	69
Fig. 18	Representación de la reacción de la PEPC	73
Fig. 19	Representación de la vía fotosintética C ₄ de tipo NADP-ME	77
Fig. 20	Esquema de las rutas metabólicas clave en la respuesta de las plantas expuestas a condiciones de estrés	80
Fig. 21	Regulación de la PEPC por fosforilación reversible en plantas C ₄	88
Fig. 22	Efectos del aluminio sobre la velocidad de germinación de semillas <i>Ppc3</i>	124
Fig. 23	Tinción con violeta de pirocatecol del aluminio unido a las raíces de la planta WT	125
Fig. 24	Efectos del aluminio sobre el crecimiento y la actividad PEPC en raíces de sorgo WT	126
Fig. 25	Efectos del estrés por aluminio en el crecimiento de las radículas	127
Fig. 26	Efectos del aluminio sobre el contenido de antocianinas en hojas y raíces	130
Fig. 27	Efectos del aluminio sobre la actividad PEPC en radículas y raíces	131
Fig. 28	Expresión de genes <i>SbPPC</i> en raíces tratadas con aluminio	132

Fig. 29	Efectos del estrés por aluminio sobre la actividad PEPC y la expresión de genes <i>SbPPC</i> en hojas	133
Fig. 30	Efecto del aluminio en la expresión relativa de los genes <i>SbPPCK</i> y en la actividad PEPCk medida <i>in vitro</i> en raíces	135
Fig. 31	Efectos del aluminio sobre la expresión relativa de los genes <i>SbPPCK</i> y la actividad PEPCk medida <i>in vitro</i> en hojas	136
Fig. 32	Determinación de ácidos orgánicos exudados por raíces de plantas de sorgo tratadas con aluminio	137
Fig. 33	Actividad PEPC medida en raíces de sorgo tratadas con aluminio	138
Fig. 34	Efectos del cadmio sobre la germinación de semillas <i>Ppc3</i>	140
Fig. 35	Efecto del silenciamiento de <i>SbPPC3</i> sobre la capacidad de recuperación de plántulas tratadas con cadmio	141
Fig. 36	Efecto del cadmio sobre la actividad y los pigmentos fotosintéticos	143
Fig. 37	Efectos del cadmio sobre marcadores de estrés en hojas	144
Fig. 38	Efectos del cadmio sobre el contenido de Fe, Zn, Ca y Mg en raíces y hojas	146
Fig. 39	Efecto del cadmio sobre la expresión relativa de genes relacionados con el déficit de hierro en raíces	148
Fig. 40	Efectos del cadmio en la actividad PEPC de raíces WT	149
Fig. 41	Efectos del cadmio sobre la actividad y expresión de <i>SbPPC</i> en plantas de sorgo	150
Fig. 42	Efecto del cadmio sobre la expresión relativa de los genes <i>SbPPCK</i> y la actividad PEPCk medida <i>in vitro</i> en raíces de sorgo	151
Fig. 43	Efectos del silenciamiento y del estrés por cadmio sobre la expresión de genes <i>SbPPCK</i> en hojas	152
Fig. 44	Determinación de ácidos orgánicos exudados por raíces de plantas de sorgo tratadas con cadmio	153
Fig. 45	Actividad PEPC medida en raíces de plantas de sorgo tratadas con cadmio	154
Fig. 46	Efectos del tratamiento con distintos niveles de P sobre el crecimiento de plantas de sorgo	157
Fig. 47	Efectos de la concentración y fuente de fósforo sobre la altura de plantas de sorgo	158
Fig. 48	Efectos de la concentración y tipo de fósforo sobre la producción de biomasa fresca de las plantas de sorgo	159
Fig. 49	Efectos de la concentración y tipo de fósforo sobre la producción de biomasa seca en plantas de sorgo	160
Fig. 50	Efectos de la concentración y tipo de fósforo sobre la actividad PEPC en raíces de sorgo	161
Fig. 51	Efectos de la concentración y tipo de fósforo aplicado sobre el contenido de fósforo en raíces de sorgo	162
Fig. 52	Efecto del déficit de fósforo sobre el crecimiento de plantas de sorgo WT	163
Fig. 53	Efecto del déficit de fósforo sobre el ratio raíz/parte aérea en peso seco plantas de sorgo WT.	164
Fig. 54	Efectos de la falta de fósforo sobre la actividad fotosintética en sorgo WT	165
Fig. 55	Efectos de la falta de fósforo sobre la acumulación de antocianinas en hojas de sorgo WT	166
Fig. 56	Efectos de la falta de fósforo sobre la actividad PEPC en hojas de sorgo WT	166

Fig. 57	Efecto del déficit de fósforo sobre la IC ₅₀ para el malato en hojas de sorgo WT	167
Fig. 58	Efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad PEPC en raíces de sorgo WT	168
Fig. 59	Variación del pH del medio de cultivo respecto al tiempo de tratamiento	169
Fig. 60	Efectos del déficit de fósforo sobre el crecimiento de plantas de sorgo	171
Fig. 61	Efecto del silenciamiento sobre el ratio raíz/parte aérea en condiciones control y de déficit de fósforo	172
Fig. 62	Efectos del silenciamiento en la actividad fotosintética en condiciones control y de falta de fósforo	173
Fig. 63	Fluorescencia de las clorofilas en condiciones control y de falta de fósforo	174
Fig. 64	Efectos de la falta de fósforo sobre el contenido en pigmentos fotosintético	175
Fig. 65	Acumulación de antocianinas inducida por falta de fósforo en hojas de sorgo	176
Fig. 66	Respuesta de la PEPC al déficit de fósforo en hojas de sorgo	177
Fig. 67	Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes <i>SbPPCK1-3</i> en hojas	178
Fig. 68	Efectos de la deficiencia de fósforo sobre la actividad PEPCk <i>in vitro</i> en hojas	179
Fig. 69	Efecto del déficit de fósforo sobre la IC ₅₀ para el malato en hojas de sorgo	180
Fig. 70	Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes <i>SbPPCK2-3</i> en raíces de sorgo	181
Fig. 71	Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes <i>SbPPCK2-3</i> en raíces	182
Fig. 72	Ensayo de actividad PEPCk <i>in vitro</i> en raíces	183
Fig. 73	Variación del pH del medio de cultivo respecto al tiempo de tratamiento	184
Fig. 74	Análisis de la expresión mediante qPCR del gen <i>SbPHT1</i> en raíces	185
Fig. 75	Análisis de fósforo total en hojas y raíces de sorgo en condiciones control y de déficit de fósforo	186
Fig. 76	Niveles de ATP en hojas y raíces de plantas WT y <i>Ppc3</i> bajo déficit de fósforo	187
Fig. 77	Determinación de actividades enzimáticas en hojas de sorgo	189
Fig. 78	Determinación de actividades enzimáticas en raíces de sorgo	190
Fig. 79	Construcción del plásmido de silenciamiento	193
Fig. 80	Selección por BASTA®	194
Fig. 81	Ejemplo de confirmación por PCR de la inserción del ADN-T	195
Fig. 82	Expresión relativa de los genes <i>SbPPCK</i> en hojas de sorgo	196
Fig. 83	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> en el crecimiento de plantas de sorgo T1	197
Fig. 84	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> y de la falta de fósforo sobre la actividad PEPC	201
Fig. 85	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> y de la falta de fósforo sobre la fosforilación de la PEPC en hojas	201
Fig. 86	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> y del estrés salino en el crecimiento vegetativo de las plantas	202

Fig. 87	Efecto del estrés salino en la actividad y fosforilación de la PEPC de hojas de plantas de sorgo WT y <i>Ppck</i>	204
Fig. 88	Tiempo de floración de plantas de sorgo WT y <i>Ppck</i>	205
Fig. 89	Aspecto de las espigas en plantas de sorgo WT y <i>Ppck</i>	205
Tablas		
Tabla 1	Emisiones antropogénicas de cadmio	53
Tabla 2	Composición del medio de cultivo de sorgo	104
Tabla 3	Cebadores utilizados en este trabajo	116
Tabla 4	Efectos del estrés por aluminio sobre el crecimiento de plantas de sorgo	128
Tabla 5	Parámetros fotosintéticos e indicativos de estrés en plantas <i>Ppc3</i> tratadas con aluminio	129
Tabla 6	Efecto del cadmio sobre el crecimiento de plantas de sorgo <i>Ppc3</i>	142
Tabla 7	Efecto del silenciamiento sobre la acumulación de cadmio en raíces	154
Tabla 8	Efecto del déficit de fósforo sobre el crecimiento vegetativo	171
Tabla 9	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> en el crecimiento y la producción de plantas de sorgo	197
Tabla10	Análisis de los sitios de inserción del T-DNA en las líneas <i>Ppck</i>	199
Tabla 11	Efectos del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> y de la falta de fósforo sobre el crecimiento	200
Tabla 12	Efecto del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> y el estrés salino en el crecimiento vegetativo de las plantas	203
Tabla 13	Efecto del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> sobre las espigas y la producción de semillas	206
Tabla 14	Efecto del silenciamiento de <i>SbPPCK1-3</i> sobre la producción de semillas	206
Tabla 15	Caracterización de semillas secas WT, <i>Ppck-2</i> y <i>Ppck-4</i>	206

ABREVIATURAS

En esta sección se muestran todas las abreviaturas y siglas que aparecen en este trabajo. Se ha empleado el Sistema Internacional de Unidades para los nombres y símbolos. Los compuestos químicos han sido denominados según el sistema de nomenclatura de la IUPAC.

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3-PGA	Ácido 3-fosfoglicérico
A	Tasa fotosintética neta
AAT	Aspartato aminotransferasa
ABA	Ácido abscísico
ACO	Aconitasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN copia
ADN-T	ADN del plásmido Ti
Ala	Alanina
ALAD	Ácido 5-aminolevulinico deshidratasa
ALMT	Transportador de Malato activado por Aluminio
AOX	Oxidasa alternativa
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
AS	Acetosiringona
Asp	Aspartato
ATP	Adenosín trifosfato
BAP	6-benzylaminopurina
BSA	Albúmina de suero bovino
BTPC	PEPC de tipo bacteriano
C ₃	Metabolismo vegetal cuyo primer producto fotosintético estable posee tres átomos de carbono
C ₄	Metabolismo vegetal cuyo primer producto fotosintético estable posee cuatro átomos de carbono
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CDPK	Proteína quinasa dependiente de calcio

CDS	Región codificante
CS	Citrato sintasa
C-terminal	Carboxilo terminal
DMSP	Dimetil sulfonio propionato
DMSP	Dimetil sulfonio propionato
DREB	Factores de transcripción relacionados con la deshidratación
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EGTA	Ácido etilenglicoltetracético
F ₀	Fluorescencia emitida en ausencia de luz fotosintética
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FRO	Enzima quelato-férrico reductasa-oxidasa
Fv/Fm	Rendimiento cuántico máximo del PSII
<i>g</i>	Fuerza <i>g</i>
G6P	Glucosa 6-fosfato
GDH	Glutamato dehidrogenasa
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
<i>gs</i>	Conductancia estomática
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-il] etanosulfónico
HMW	Alto peso molecular
HSP	Chaperonas moleculares
IAA	Ácido indolacético
IBA	Ácido indol-3-butírico
IC ₅₀	Concentración del inhibidor requerida para reducir al 50% la actividad de la enzima
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IM	Medio de inoculación
InsPs	Inositol pirofosfato
IRGA	Analizador de gases por infrarrojo

IRO2	Factor de transcripción bHLH relacionado con hierro
IRT	Transportador regulado por hierro
kDa	Kilodalton
KF	Fluoruro de potasio
K _i	Constante de inhibición
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LMW	Bajo peso molecular
LPR	Ferroxidasa de raíz baja en fosfato
Lys	Lisina
MATE	Bomba de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga
MDA	Malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
MES	Ácido 2-etanosulfónico
miRNAs	microARNs
MS	Murashige and Skoog salts
NAD(P)(H)	Nicotina adenina dinucleótido (fosfato) (reducido)
NAD-ME	Enzima NAD-málico
NADP-ME	Enzima málico-NADP
NO	Óxido nítrico
NO _x	Óxidos de nitrógeno
NR	Nitrato reductasa
NRAMP	Proteína Natural de Macrófagos Asociada a Resistencia
N-terminal	Extremo amino terminal
OAA	Oxalacetato
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud /World Health Organization
p/v	Relación peso/volumen
p107	Polipéptido de PEPC de 107 kDa
p110	Polipéptido de PEPC de 110 kDa
PA	Ácido fosfatídico
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fitoquelatinas
PCa	Tratamiento con fosfato de calcio (Ca ₃ (PO ₄) ₂)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Violeta pirocatecol
PDR2	Respuesta a deficiencia de fosfato 2
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa
PEPP	Fosfoenolpiruvato fosfatasa
PF	Peso fresco
PHR	Factores de transcripción de respuesta a falta de fosfato
PHT	Transportadores de fosfato
Pi	Fósforo inorgánico
PI-PLC	Fosfolipasa C dependiente de fosfatidil inositol
PK _c	Piruvato quinasa citosólica
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPC	Isoforma/isogen de PEPC
PPCK	Isoforma/isogen de PEPCK
PPDK	Piruvato fosfato diquinasa
PPi	Pirofosfato
PPi-PFK	Fosfofructoquinasa dependiente de PPi
PS	Peso seco
Ps	Fosfato soluble
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PTM	Modificación postraducciona
PTPC	PEPC de tipo planta
PVPP	Polivinilpirrolidona
qPCR	PCR cuantitativa o a tiempo real
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP	Ribulosa-1,5-bisfosfato
SAG	Genes asociados a la Senescencia
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SM	Medio inducción de hojas

SOS	Salt Overly Sensitive
STOP1	Factor de transcripción de toxicidad de protones 1
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBS	Tampón tris salino
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TGM	Tampón tris glicina metanol
TIR1	Receptor de auxinas Transportador Inhibidor de Respuesta 1
TNB	Ácido 5-tiobenzoico
Transportador ABC	Transportadores dependientes de ATP
Tris	2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
U	Unidad de actividad enzimática
UA	Unidades arbitrarias
UHPLC	Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución
UNEP	Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente
UV	Ultra-violeta
v/v	Relación volumen/volumen
V_{max}	Velocidad máxima de reacción enzimática
WT	Wild-type o silvestre
WUE	Eficiencia en el uso del agua
YS1	Yellow Stripe 1
Ψ_w	Potencial hídrico

RESUMEN

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) es una enzima citosólica multifuncional que cataliza la β -carboxilación oxidativa del fosfoenolpiruvato (PEP) produciendo oxalacetato (OAA) y fósforo inorgánico (Pi). Es la responsable de la fijación inicial del CO₂ en plantas con fotosíntesis de tipo C₄ y en plantas CAM, además tiene importantes funciones no fotosintéticas. Al tratarse de una enzima con un papel central en el metabolismo, se encuentra altamente regulada. La PEPC es regulada mediante varias modificaciones postraduccionales (PTMs) que regulan tanto su estabilidad como su actividad de formas complejas. Una de las modificaciones más conocidas consiste en la fosforilación reversible de la PEPC. Ésta incrementa la actividad de la PEPC y es llevada a cabo por la PEPC-quinasa (PEPCK), una proteína quinasa perteneciente a la familia de las quinasas dependientes de calcio (superfamilia CDPK), pero cuya actividad es independiente de éste. A su vez, la expresión, la estabilidad y la actividad de la PEPCK puede ser modificada en diferentes condiciones fisiológicas.

En sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), la especie utilizada en esta tesis, existen 6 isoformas de la PEPC: *SbPPC1*, que codifica la PEPC C₄; *SbPPC2-5*, que codifican las PEPC de tipo C₃ y *SbPPC6*, que codifica la PEPC de tipo bacteriano. Además, en sorgo, la PEPCK constituye una familia génica formada por 3 genes: *SbPPCK1*, que codifica la isoforma fotosintética; *SbPPCK2*, presente en hojas y raíces e inducida por estrés y *SbPPCK3*, que codifica una isoforma poco caracterizada. Esta tesis doctoral está dividida en dos grandes bloques. Por un lado, el estudio del papel de una de las isoformas de la PEPC, *SbPPC3*, en distintas condiciones de estrés abiótico y, por otro lado, la caracterización inicial de plantas de sorgo con los genes *SbPPCK* silenciados mediante ARNi.

Estudios previos desarrollados por nuestro grupo de investigación encontraron que la isoenzima *SbPPC3* es importante en la respuesta frente a estreses abióticos como la sal o el exceso de amonio en raíces de sorgo. Para profundizar en el estudio del papel de *SbPPC3*, se obtuvieron líneas de sorgo con el gen *SbPPC3* silenciado mediante ARNi. La caracterización de esas líneas puso de manifiesto que *SbPPC3* no sólo es la isoforma de PEPC predominante en raíces y en la respuesta a estreses en este tejido, sino que también tiene importantes repercusiones sobre el desarrollo vegetativo de la planta, la formación y germinación de semillas y la apertura y el cierre estomático. Resultado de todas estas importantes funciones, se decidió continuar estudiando el papel de *SbPPC3* en otras situaciones de estrés abiótico: la toxicidad por metales (aluminio y cadmio) y la deficiencia de fósforo.

La toxicidad por metales como el aluminio o el cadmio altera múltiples procesos fisiológicos de una planta, la fotosíntesis, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la absorción de nutrientes, que pueden causar déficits nutricionales. Todo esto tiene como resultado la inhibición del crecimiento. En sorgo, hemos encontrado que estos metales reducen el crecimiento y aumentan el estrés oxidativo. Además, el cadmio altera la absorción de otros elementos y el aluminio incrementa el contenido de antocianinas.

Algunas de estas respuestas y cambios fueron mayores en las líneas silenciadas, indicando una mayor sensibilidad a estos estreses como consecuencia de la falta de PPC3.

La PEPC tiene un papel importante en la respuesta a estrés por metales en sorgo. Estos estreses aumentan la expresión y la cantidad de PEPC presente en raíces. Este incremento en la actividad enzimática está asociada principalmente a la isoforma PPC3, ya que no se produce en las líneas silenciadas. Además, la carencia de esta enzima repercute en la secreción de ácidos orgánicos, que actúan como quelantes de los iones metálicos evitando la toxicidad para la planta. En el tratamiento con Al a corto plazo no se encontraron diferencias en la cantidad de citrato en los exudados radicales. Por el contrario, en los tratamientos a más largo plazo con Cd, se observó una notable disminución de la cantidad de citrato en los exudados de las líneas silenciadas. Estos resultados muestran que SbPPC3 tiene un papel importante en el mantenimiento de una síntesis prolongada de ácidos orgánicos, como el citrato, en la respuesta a la toxicidad por metales.

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes en plantas y su deficiencia en suelos suponen un problema agrícola a nivel global. El déficit de fósforo altera la fisiología y el metabolismo de la planta en múltiples niveles. Al igual que en la respuesta a los metales, uno de los papeles de la PEPC en deficiencia de fósforo está asociado al mantenimiento de la síntesis de ácidos orgánicos a largo plazo. Hemos encontrado que la falta de fósforo incrementa la actividad PEPC en raíces WT, pero no en las líneas silenciadas. El silenciamiento de PPC3 reduce la respuesta en la relación raíz/parte aérea respecto a la encontrada en la planta WT bajo deficiencia de fósforo. Además, en las plantas modificadas algunas de las respuestas a falta de fósforo se mantienen al ser tratadas con fosfato insoluble, mientras que en las plantas WT estas respuestas desaparecen. Este fue el caso de parámetros como el contenido de antocianinas y la fosforilación de la PEPC en hojas o la expresión del transportador de fosfato (*SbPHT*) en raíces. Además, cabe destacar que las líneas *Ppc3* tienen una menor cantidad de fósforo en raíces que las plantas WT en el tratamiento con fosfato insoluble. Todo esto indica que el silenciamiento de *SbPPC3* repercute sobre la capacidad de solubilización del fósforo, provocando que en las líneas modificadas se mantenga la respuesta a la deficiencia de fósforo en presencia de fosfato insoluble.

Estos resultados muestran que la isoforma PPC3, además de ser la isoforma predominante en raíces, tiene un importante papel en las respuestas frente a estreses que se sientan y desencadenan respuestas en dicho tejido. Entre ellas, las que implican el mantenimiento de una alta síntesis de ácidos orgánicos de forma prolongada. Estos resultados, junto a las importantes funciones de esta isoforma en otros tejidos y contextos fisiológicos, la convierten en una posible diana de mejora vegetal en el futuro.

En el segundo bloque de la tesis, se han obtenido plantas de sorgo con los genes *SbPPCK1-3* silenciados mediante la técnica del ARNi. Con esto, se han logrado obtener líneas modificadas que mantenían menores niveles de fosforilación de la PEPC en hojas, incluso en condiciones que aumentan esta modificación postraduccional. El silenciamiento de *SbPPCK1-3* afecta modestamente al crecimiento y desarrollo de las

plantas de sorgo. Los principales efectos se encontraron sobre el tiempo de floración y sobre la producción de las semillas, así como sobre la composición de las mismas, afectando a importantes parámetros de calidad nutricional. La caracterización inicial de estas plantas modificadas ha permitido encontrar posibles e interesantes líneas de investigación sobre los genes *SbPPCK1-3*. Entre todas, hay que destacar el estudio de las funciones de la PEPCk sobre la floración y la producción y la germinación de semillas, investigaciones futuras que podrían desarrollarse en distintas condiciones de estrés. También sería importante profundizar en la investigación de los efectos del silenciamiento de *SbPPCK1-3* sobre la calidad nutricional de las semillas. Además, sería interesante estudiar los cambios metabólicos causado por este silenciamiento en distintos contextos fisiológicos. Todo ello, nos permitiría conocer en mayor medida la importancia de la fosforilación de la PEPC en distintos procesos y condiciones fisiológicas.

INTRODUCCIÓN

1. SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

El sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] constituye el quinto cultivo de cereales más relevante del mundo, por detrás del maíz, el arroz, el trigo y la cebada. Esta especie de sorgo ha sido dividida en tres subespecies: El sorgo cultivado *S. bicolor ssp. bicolor*, el sorgo silvestre del que procede (*S. bicolor ssp. verticilliflorum*) y el sorgo híbrido estable entre ambos, conocido como *S. bicolor ssp. drummondii*, siendo los dos últimos considerados como malezas. La importancia de su cultivo radica en que proporciona una amplia gama de productos: alimentos, pienso, fibras, materias químicas, bioplásticos y biocombustibles (Kresovich et al., 2005; Taylor et al., 2006; Mace et al., 2013).

La importancia del cultivo del sorgo se encuentra también en su resistencia a la sequía. Esta resistencia viene dada por características morfológicas y fisiológicas. En este sentido, el sorgo presenta un sistema de raíces cuya profundidad varía en función del agua recibida, es capaz de mantener la actividad fotosintética pese al cierre estomático gracias al mecanismo de concentración de CO₂ del metabolismo C₄, la senescencia de las hojas, y una gran capacidad de ajuste osmótico. Además, tiene altos niveles de cera epicuticular en la superficie, que refleja la radiación visible e infrarroja cercana, reduciendo la evaporación de agua a través de la cutícula. Estas características hacen que el sorgo tenga una mayor eficiencia en el uso del agua que el maíz (Tari et al., 2013; Jedmowski et al., 2014; Akinseye et al., 2017; Harris-Shultz et al., 2019). También al presentar una fotosíntesis de tipo de C₄ conserva una elevada asimilación del carbono a altas temperaturas (Paterson, 2008). Estas características aumentan el interés por este cereal en un contexto de cambio climático, donde las temperaturas se elevan y la disponibilidad de agua se ve fuertemente mermada.

Todas estas características hacen que el sorgo presente un gran potencial en áreas semiáridas como alimento (FAO, 1995), siendo un alimento básico para aproximadamente 500 millones de personas en más de 30 países, especialmente en África y Asia (Dahlberg et al., 2011; Akinseye et al., 2017).

En 2020, se cosecharon globalmente más de 58 millones de toneladas de sorgo en poco más de 40 millones de hectáreas cultivadas, siendo los principales países productores Estados Unidos (EE. UU), Nigeria, Etiopía, India y México. En EE. UU se produjeron más de 9 millones de toneladas en aproximadamente 2 millones de hectáreas, lo que supuso un rendimiento promedio de algo más de 4,5 toneladas por hectárea (FAO, 2020). En este país entre el 15 y 20% de la producción se emplea para la fabricación de etanol y sus derivados, siendo la obtención este producto el nicho de mercado que más rápido ha crecido dentro de la industria del sorgo (Dahlberg et al., 2011).

En España el cultivo de sorgo empezó en la Alta Edad Media, siendo anterior al del maíz, procedente de América. Aquí, el sorgo es empleado principalmente para alimento del ganado, siendo el cuarto grano de cereal empleado en la fabricación de piensos, llegando a utilizar unas 200.000-300.000 Tm, en su mayoría procedente de EE. UU y Argentina. Las regiones donde más sorgo se cultiva dentro de España son Andalucía occidental y el sur de los Pirineos (García-Atance, 1982; De Morais et al., 2017).

Además de las características previamente mencionadas, el sorgo también presenta un grado de tolerancia intermedio frente al estrés salino, aunque se ha encontrado una gran variación genotípica en la tolerancia a la salinidad (Reddy, 2019), llegando a tolerar 200 mM de NaCl durante 4 días antes de manifestar síntomas de estrés (Tari et al., 2013). También se ha encontrado una alta capacidad de respuestas a otros estreses abióticos. En dos cultivares de sorgo se descubrió el locus principal de tolerancia a aluminio (*Alt_{sb}*), asociado a la exudación de citrato, posteriormente se encontró un gen codificante de un miembro de la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga (MATE), un transportador de citrato activado por aluminio responsable de la tolerancia a aluminio en sorgo (Magalhaes et al., 2004, 2007). En Colombia, se analizaron 6000 genotipos de sorgo encontrando que un 8% toleraba el 65% de saturación de Al³⁺ (Reddy, 2019). Estos transportadores también podrían intervenir en la respuesta frente a la toxicidad por cadmio (Bali et al., 2020) y al déficit de fósforo en sorgo (López-Arredondo et al., 2014; Chen y Liao, 2016).

Junto a todas estas características agronómicas y de tolerancia a distintos estreses abióticos cabe destacar que presenta un genoma pequeño (730 millones de pares de bases) lo que lo ha convertido en una planta modelo para el estudio de la estructura, función y evolución de los cereales (Paterson, 2008). Todo esto ha propiciado que se investiguen y desarrollen variedades de sorgo con mejores capacidades frente a condiciones adversas y con mayor rendimiento agronómico. La mayoría de estas, han sido conseguidas mediante las técnicas de transformación convencionales de cruzamiento y selección. Sin embargo, en los últimos años los avances en genética molecular y genómica han permitido la obtención de plantas de sorgo modificadas genéticamente (Gurel et al., 2009; Grootboom et al., 2010). La primera de estas, se obtuvieron en 1993, mediante bombardeo con microproyectiles a embriones inmaduros de sorgo (Casas et al., 1993), desde entonces se han logrado grandes avances técnicos pese a las dificultades que tiene el cultivo celular de sorgo (O'Kennedy et al., 2006), en cuya superación se continua investigando (Liu y Godwin, 2012; Do y Zhang, 2015).

También se han utilizado otras técnicas de transformación como la electroporación, pero con esta no se ha logrado desarrollar plantas transgénicas, solo ensayos de expresión transitoria; o la transformación del polen, método que tiene una baja frecuencia de transformación (Do y Zhang, 2015). La técnica que hasta hoy ha dado mejores resultados consiste en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, llegando a obtener una eficiencia de transformación de embriones inmaduros del 33% (Wu et al., 2014; Do et al., 2016). Sin embargo, aún hoy se sigue tratando de mejorar la eficiencia de transformación cambiando las condiciones, como la disminución de los efectos de los compuestos fenólicos mediante distintos tratamientos (Nguyen et al., 2007; Lu et al., 2009; Do et al., 2018), pre-inducción de *agrobacterium* con acetosiringona, pretratamiento frío-calor (Verma et al., 2008; Gurel et al., 2009), etc. Pese a todos estos progresos, la obtención de sorgo transgénico sigue siendo recalcitrante y dependiente del genotipo (Kaepler y Pedersen, 1997; Sato et al., 2004; Liu y Godwin, 2012; Ahmed et al., 2018).

2. ESTRÉS POR METALES: CADMIO Y ALUMINIO

La contaminación de los suelos por metales se ha convertido en un problema global debido a su persistencia y a su no-biodegradabilidad, lo que conduce a su acumulación en suelos provocando severos daños en el medio ambiente y pudiendo afectar a la salud humana. Una parte considerable de esta contaminación se debe a actividades antropogénicas como el uso de pesticidas y fertilizantes, la manufactura química, el tratamiento inadecuado de residuos industriales, las deposiciones de emisiones atmosféricas... (Tang et al., 2019). Los gastos económicos asociados a esta contaminación se estiman que exceden 10 billones \$ US por año (Kumar et al., 2019). Las plantas responden a la toxicidad por metales mediante una multitud de mecanismos, entre los que se encuentran la síntesis de ácidos orgánicos y otras sustancias (Clemens, 2006), en lo que podría intervenir la actividad de la enzima PEPC. En este trabajo se investigan dos metales, cuya presencia y, por tanto, su toxicidad, se han visto incrementadas tanto por la actividad antropogénica y por factores naturales: el aluminio y el cadmio. En los apartados siguientes se desarrollan la presencia en suelos, la toxicidad, los mecanismos de tolerancia en plantas y los posibles efectos sobre la salud humana de estos dos metales.

2.1. Aluminio

El aluminio es un elemento químico perteneciente al grupo de los metales no ferromagnéticos (McLean, 1976). Es el metal mayoritario en la corteza terrestre (McLean, 1976; Driscoll y Schecher, 1990; May y Nordstrom, 1991) y es, además, después del oxígeno (46,6 %) y el silíceo (27,7 %), el elemento químico más abundante en la misma, representando entorno al 8,1 % (**Fig. 1**) (Poschenrieder et al., 2008; Earle y Panchuk, 2019). Pese a su abundancia es un elemento altamente insoluble y, en consecuencia, normalmente se encuentra poco disponible en los procesos biogeoquímicos (Driscoll y Schecher, 1990) y aunque puede encontrarse en la mayor parte de los organismos, en general, lo hace de forma inerte y a muy baja concentración, al no tener ninguna función fisiológica conocida (Exley, 2009).

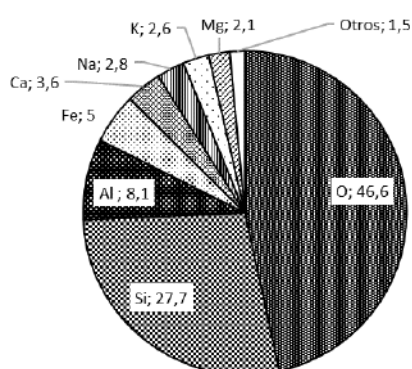


Figura 1. Proporción media de los principales elementos químicos que componen la corteza terrestre. Oxígeno (O) 46,6 %; silíceo (Si) 27,7%; aluminio (Al) 8,1%; hierro (Fe) 5%; calcio (Ca) 3,6%; sodio (Na) 2,8%; potasio (K) 2,6%; magnesio (Mg) 2,1%; otros 1,5% (Earle y Panchuk, 2019).

El aluminio en los suelos puede encontrarse en diferentes formas de manera natural, pero la forma mayoritaria es formando aluminosilicatos, siendo la forma mineral más

estable (May y Nordstrom, 1991). Procesos como la meteorización pueden provocar la liberación de las rocas del ion trivalente de aluminio (McLean, 1976). Sin embargo, la solubilidad del aluminio en suelos va a depender fundamentalmente del pH, siendo solubilizado en condiciones ácidas (Ma et al., 2000; 2001a), así la acidificación de los suelos constituye el principal problema frente a la toxicidad por aluminio en los cultivos. No obstante, también puede verse incrementada por actividades antropogénicas como la minería y los procesos de tratamiento de los minerales, el reciclaje de chatarra y la industria del metal (Igbokwe et al., 2020), donde supuso entre 2013 y 2014 el 60% del total de la producción global de metales no ferrosos (Milkereit et al., 2019), el refinado del petróleo, y la producción y utilización de productos que contienen aluminio (Igbokwe et al., 2020). Todo ello hacen del aluminio el segundo metal más empleado tras el acero (Cullen y Allwood, 2013), por lo que la actividad humana puede hacer pasar la concentración de aluminio en el aire de los 0,0005 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la Antártida a 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas industrializadas (WHO, 1998), produciendo contaminación por deposición atmosférica.

En los ecosistemas, el aluminio en forma soluble interviene en múltiples procesos: actúa como tampón de pH en aguas ácidas; afecta a la disponibilidad de otros elementos como el fósforo, el carbono orgánico y otros metales; e influye en el grado de claridad de las aguas al intervenir en procesos de coagulación en aguas lénticas. Por lo que cambios en su disponibilidad afectan en gran medida a los ecosistemas, además es potencialmente tóxico para los organismos (Driscoll y Schecher, 1990).

La toxicidad del aluminio aparece cuando éste es solubilizado, es decir cuando forma el catión trivalente (Al^{3+}), lo que sucede en suelos ácidos con un pH inferior a 5,5 (Kochian et al., 2004). Este tipo de suelo constituye el 30% de los suelos del mundo y el 40-50% de la superficie cultivable (von Uexküll y Mutert, 1995; Riaz et al., 2018). Esto supone 3.950 millones de hectáreas (Bian et al., 2013), encontrándose aproximadamente el 60% en zonas tropicales y subtropicales (**Fig. 2**) (Kochian et al., 2015). Por lo que estas regiones, en su mayoría países en vías de desarrollo, son las zonas más afectadas por la toxicidad por aluminio, donde solo es superado por la sequía en la limitación de la producción agrícola (Foy, 1988; Kochian et al., 2015).

En consecuencia, la acidificación de los suelos es la principal razón del aumento de los efectos tóxicos del aluminio sobre los cultivos. La solubilización del aluminio se vuelve exponencial cuando el pH del suelo es inferior a 6, lo que no aumenta el aluminio únicamente en el suelo, sino también en las aguas (Driscoll y Schecher, 1990). Por ejemplo, en aguas con un pH neutro la concentración de aluminio llega a 0,001-0,05 mg/l, mientras que en las aguas ligeramente ácidas pueden multiplicar su concentración de aluminio por 10 (0,5-1 mg/l) y en aguas ácidas puede llegar a alcanzar 90 mg/l (WHO, 1998).

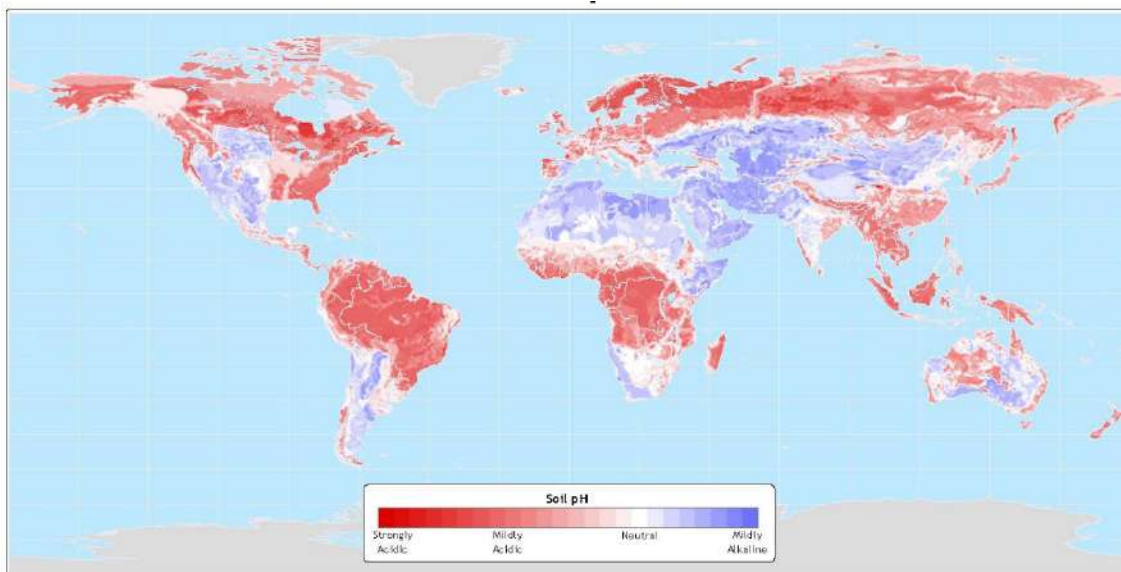


Figura 2. Distribución mundial de suelos clasificados según su pH. Se representan los suelos clasificados según su pH. Los suelos fuertemente ácidos están representados en rojo intenso mientras que los de carácter fuertemente básico se representan en azul intenso. Atlas of Biosphere, center for sustainability and the global environment, Nelson Institute, University of Wisconsin-Madison. IGBP-DIS Global Soils Dataset (1998).

La acidificación de los suelos puede ocurrir de forma natural, debido al arrastre por la lluvia de elementos que actúan como bases (calcio, magnesio, potasio, sodio...) y por la descomposición de materia orgánica vegetal (Bian et al., 2013). No obstante, la actividad antropogénica puede acelerar el proceso de acidificación de forma significativa (FAO, 2016) debido a deposiciones atmosféricas ácidas (Reuss et al., 1987), como SO_2 y NO_x procedentes de la quema de combustibles fósiles (May y Nordstrom, 1991); a la utilización de fertilizantes de nitrógeno (Tian y Niu, 2015); al cambio climático (Reinds et al., 2009) y al cambio en el uso de suelos, mediante la deforestación y la posterior agricultura intensiva (Liu et al., 2019; Pinheiro Junior et al., 2019).

2.1.1. Toxicidad por aluminio en plantas

El aluminio biodisponible (Al^{3+}) es un elemento con una gran reactividad, por lo que es altamente tóxico a concentraciones muy pequeñas (micromolar), convirtiéndose en el principal factor limitante de la producción agrícola en suelos ácidos (von Uexküll y Mutert, 1995; Barceló y Poschenrieder, 2002).

El aluminio soluble es fitotóxico para la mayoría de las plantas y tiene efectos morfológicos y fisiológicos. El primer mecanismo de toxicidad por aluminio consiste en la unión del metal a las raíces, principal e inicialmente al ápice de éstas (Kochian et al., 2004), concretamente queda unido a los residuos carboxilos, cargados negativamente, de la pectina y la hemicelulosa de la pared celular, haciéndola más rígida (Kochian et al., 2005), como se ha demostrado en numerosas especies vegetales como arroz (Nagayama et al., 2019), maíz (Jones et al., 2006) o en pomelo chino (Yang et al., 2018). Esta unión ocurre rápidamente y, en tan solo unos minutos de exposición, el crecimiento de las raíces

primarias y el desarrollo de raíces laterales son inhibidos. Esto se debe a que bloquea la expansión y la elongación celular, así como la división celular, al bloquear la mitosis (Foy et al., 1978; Kochian, 1995; Barceló y Poschenrieder, 2002; Kochian et al., 2004).

En consecuencia, la toxicidad por aluminio provoca que el sistema radical se vea reducido y dañado, lo que limita la absorción de agua y de otros nutrientes minerales (Kochian et al., 2004, 2005). También causa deficiencias al reaccionar directamente con los fosfatos solubles transformándolos en formas relativamente insolubles y no disponibles para la planta (McLean, 1976; Kochian et al., 2004). Al mismo tiempo, compite por los sitios de unión de elementos como el potasio, el calcio, el manganeso, el cobre y el magnesio, reduciendo la absorción de estos elementos y, por tanto, afectando a la nutrición de la planta (Foy et al., 1978; Kochian et al., 2005; Riaz et al., 2018).

En el interior de la planta el aluminio afecta a la membrana plasmática, al citoesqueleto, al núcleo, a los cloroplastos y a las mitocondrias (**Fig. 3**) (Kochian et al., 2004). En la membrana plasmática, el aluminio se une a los fosfolípidos, alterando la fluidez y el potencial de membrana, afectando como resultado, a la funcionalidad de la misma (Kochian et al., 2005; Poschenrieder et al., 2008). Además, puede provocar la despolarización del potencial de membrana afectando a la enzima H^+ -ATPasa y a la absorción de cationes (Silva, 2012). También el aluminio induce daño oxidativo. En las membranas, provoca un aumento de la peroxidación lipídica, incrementando compuestos como el malondialdehído (MDA) (Giannakoula et al., 2008; Inostroza-Blancheteau et al., 2012). Interactúa con los microtúbulos y los filamentos de actina, alterando toda la dinámica del citoesqueleto (Kochian et al., 2004; Poschenrieder et al., 2008) y provocando finalmente, como se mencionó antes, la inhibición del crecimiento de las raíces, al bloquear la división celular (Kochian et al., 2004, 2005). Puede unirse a los fosfatos del ADN, afectando a la composición de éste y a la estructura de la cromatina, incrementando su rigidez e interfiriendo con procesos esenciales como la replicación y la transcripción del ADN (Kochian, 1995; Ma, 2000; Kochian et al., 2005; Eekhout et al., 2017). El aluminio llega a generar aberraciones y rupturas cromosómicas, como se ha demostrado en trigo (*T. aestivum*), en arroz (*O. sativa*) o en sorgo (*S. bicolor*), llegando, incluso, a provocar la formación de micronúcleos en haba (*Vicia faba*) (Kimatu et al., 2011; Silva, 2012).

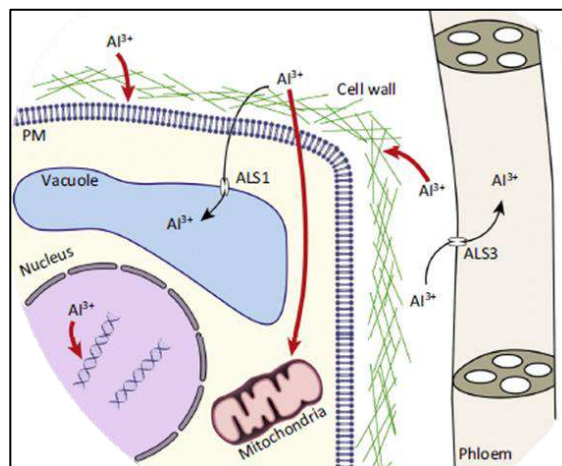


Figura 3. Principales dianas del aluminio en plantas. La forma fitotóxica del aluminio (Al^{3+}), entra en la raíz y se une a sitios con cargas negativas (indicado con flechas rojas), interactuando con la membrana plasmática (PM), con las pectinas (en verde) de la pared celular. En el interior celular interactúa con los ácidos nucleicos, las mitocondrias y otras dianas (Eekhout et al., 2017).

En las hojas, el aluminio inhibe la fotosíntesis, reduciendo el transporte de electrones a través del fotosistema II (PSII) (Kochian et al., 2005; Hasni et al., 2015). Además, se ha demostrado que reduce el contenido de pigmentos fotosintéticos en *Lemna minor* (Su et al., 2019), en cítricos, soja (*G. max*), sorgo, arroz, trigo y en otras especies. Esta reducción en el contenido de clorofila se debe a la inhibición de la enzima ácido δ -aminolevulinico deshidratasa, enzima que interviene en la formación de la clorofila y a la activación de la enzima clorofilasa. El aluminio reduce la asimilación de CO_2 , pero dicha disminución no se debe a una inhibición de las enzimas del ciclo de Calvin, sino a la inhibición de la actividad fotosintética (Chen et al., 2010a).

El aluminio también afecta a los mecanismos de transducción de señales, especialmente, a los relacionados con el calcio (Ca^{2+}), puesto que afecta a su homeostasis, alterando sus niveles en el citosol, además de inhibir enzimas como la fosfolipasa C, que interviene en la señalización dependiente de Ca^{2+} a través de la ruta del inositol fosfato (Kochian et al., 2004; Poschenrieder et al., 2008). Al mismo tiempo, y al igual que otros muchos tipos de estreses, el aluminio induce la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kochian et al., 2004, 2005), provocando disfunción mitocondrial (Kochian et al., 2005; Eekhout et al., 2017) y peroxidación lipídica en las membranas (Silva, 2012). Esta se produce abundantemente en los cloroplastos debido a los efectos del aluminio en el transporte de electrones durante la fotosíntesis (Chen et al., 2010a).

El aluminio tiene una alta fitotoxicidad al alterar diversas estructuras celulares y procesos fisiológicos en plantas. Esto convierte al aluminio en el principal agente limitante de la producción agrícola en suelos ácidos (Foy et al., 1978; Kochian et al., 2005, 2015). Puede llegar a reducir el crecimiento de los cultivos en un 50% y provocar una reducción del rendimiento en grano, que en cebada puede alcanzar entre un 50 y 30 % en cebada sensible y tolerante al aluminio, respectivamente (Abate et al., 2013).

2.1.2. Mecanismos de respuesta a la toxicidad por aluminio en plantas

Existen diferentes grados de tolerancia a la toxicidad por aluminio, en función de la especie y de los cultivares empleados, al presentar diferentes estrategias para responder a la toxicidad por este metal. Estas respuestas pueden darse por mecanismos de exclusión, para evitar la entrada del aluminio en el ápice de la raíz y por tanto en la planta, o mediante mecanismos de tolerancia, que responden frente al aluminio en el interior celular mediante detoxificación y secuestro (**Fig. 4**) (Kochian et al., 2015).

Mecanismos de exclusión

El mecanismo de exclusión de aluminio más conocido es la exudación de ácidos orgánicos en la rizosfera (**Fig. 4**). Estos aniones de ácidos orgánicos actúan como quelantes de los iones de aluminio (Al^{3+}), evitando la entrada en las raíces y la toxicidad por aluminio (Kochian et al., 2015). En diversos estudios se ha demostrado que existe una correlación entre la capacidad de secreción de ácidos orgánicos de una especie vegetal y su tolerancia al aluminio (Kochian et al., 2004, 2015). Estas variaciones entre especies dependen, principalmente, de tres factores (Kochian et al., 2005, 2015):

1. El tipo de ácido orgánico secretado.
2. La cantidad que es capaz de exudar, lo que depende a su vez, del número de transportadores de membrana, de la capacidad de aumentar la síntesis de ácidos orgánicos y de la habilidad para disponer de ligandos que permitan el transporte de los ácidos orgánicos. En este sentido, es importante destacar el papel de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) debido a que intervienen en la producción de ácidos orgánicos y de energía.
3. Del tiempo que tarda en inducirse la exudación de ácidos orgánicos tras la exposición a aluminio.

Los principales ácidos orgánicos exudados son el málico, el cítrico y el oxálico. La liberación de malato predomina en trigo (*T. aestivum*) y en *Arabidopsis thaliana* (Ryan et al., 2009); la de citrato en sorgo (*S. bicolor*) (Ma, 2000; Kochian et al., 2004), maíz (*Z. mays*), cebada (*H. vulgare*), tora (*Cassia tora*) (Yang et al., 2001; Ryan et al., 2009; Xu et al., 2018b) o soja (*G. max*) (Wang et al., 2019a); y la de oxalato en trigo sarraceno (*F. esculentum*), en taro (*C. esculenta*) o en *Melastoma* (Poschenrieder et al., 2008; Ryan et al., 2009).

Estos ácidos orgánicos son secretados por transportadores específicos, cuya existencia ha sido demostrada en una gran cantidad de especies como en trigo, maíz (Kochian et al., 2015) sorgo o cebada (Nunes-Nesi et al., 2014). Estos transportadores pertenecen a dos familias: la familia del transportador de malato activado por aluminio (ALMT), un canal aniónico, y la familia de extrusión de multi-drogas y compuestos tóxicos (MATE), un transportador anti-porte ácido orgánico/ H^+ , siendo responsables del eflujo de malato y citrato, respectivamente (**Fig. 4**) (Liu et al., 2012a; Kochian et al., 2015).

Además de exudar ácidos orgánicos, las plantas secretan otras sustancias como compuestos fenólicos, que también actúan como quelantes de los iones de aluminio, aunque tienen menos capacidad quelante que los ácidos orgánicos. En maíz se secreta catecol, catequina y quercetina bajo presencia de aluminio, árboles como *Cinnamomum camphora* y *Eucalyptus camaldulensis* sintetiza enoteína B, en otras especies con alta tolerancia a aluminio se ha detectado la acumulación del flavonoide proantocianidina (Kochian et al., 2015) y la planta de té sintetiza catequina (Poschenrieder et al., 2008).

Mecanismos de tolerancia

Los mecanismos de tolerancia confieren capacidad a la planta para responder al aluminio, una vez ha entrado en ésta, mediante el secuestro o la detoxificación del mismo (**Fig. 4**).

Uno de los primeros mecanismos consiste en el secuestro o retención del aluminio en la pared celular, donde se puede localizar entre el 85 y el 90% del aluminio de las raíces (Kochian, 1995; Kochian et al., 2015). Como se explicó antes, la unión se produce a los grupos hidroxilos de las pectinas y hemicelulosas. Se ha demostrado que el contenido en pectina reduce la acumulación interna de aluminio y aumenta la tolerancia al mismo (Nagayama et al., 2019), además también se ha visto que en este mecanismo de tolerancia es importante el grado de metilación de las pectinas en lo que intervienen las enzimas pectina metilesterasas (Kochian et al., 2015).

Otro de los mecanismos de tolerancia se basa en la movilización del aluminio mediante transportadores de la membrana plasmática y del tonoplasto. El aluminio se transporta al interior de las células de las raíces, mediante la Proteína Natural de Macrófagos Asociada a Resistencia (NRAMP), como se ha estudiado en arroz y sorgo (Kochian et al., 2015; Lu et al., 2017) y se secuestra en la vacuola, posiblemente mediante transportadores de tipo ABC. En otras especies vegetales se ha demostrado que el aluminio puede ser transportado a la parte aérea de la planta donde se acumula en la vacuola. En trigo sarraceno y hortensia se transporta y acumula en formas no tóxicas unido a oxalato y citrato, respectivamente (Kochian et al., 2015). También las antocianinas intervienen en la respuesta frente al estrés por metales actuando como antioxidantes y como agentes quelantes de iones metálicos, que posteriormente son secuestrados en la vacuola (Landi et al., 2015), en hortensias esta acumulación provoca, incluso, cambios en el color de los sépalos (Schreiber et al., 2010).

Además, en maíz se ha comprobado que variedades con mayor tolerancia al aluminio presentan una mayor acumulación de prolina, interviniendo ésta en la osmorregulación y en la estabilización de las membranas, siendo ambas afectadas por la toxicidad por aluminio (Giannakoula et al., 2008).

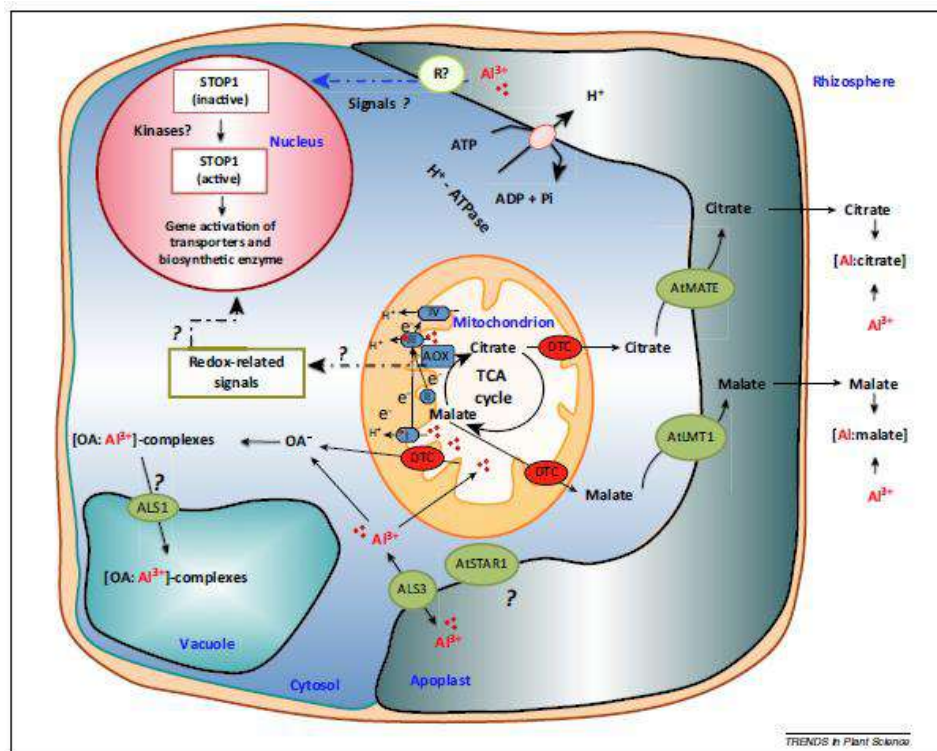


Figura 4. Mecanismos generales de la resistencia a aluminio y su asociación con el metabolismo mitocondrial en células de raíces de *Arabidopsis thaliana*. Al interactúa con un receptor (R) en la membrana plasmática lo que activa una ruta de transducción de señales (flecha azul). Hay evidencias que sugieren que el factor de transcripción STOP1 (Sensible a toxicidad de protones 1) está implicado en la ruta de transducción de señales para Al. Posiblemente interviniendo en un mecanismo postraduccional, tal vez la fosforilación de proteínas, a través de quinasas activadas por STOP1. Estudios han encontrado que STOP1 controla la expresión de genes implicados en la resistencia a aluminio como las proteínas de membrana: Transportador de Malato Activado por Aluminio (*AtALMT1*) y Extrusión de Compuestos Tóxicos y Muldrogas (*AtMATE*). Estos genes intervienen en la secreción de ácidos orgánicos (AO) a la rizosfera, donde actúan como agentes quelantes de Al, formando compuestos no fitotóxicos. Otro gen controlado por STOP1 es *AtALS3* (Sensible a Aluminio 3), un transportador ABC, que se piensa distribuye Al por la planta alejándolo de los tejidos más sensibles. Los genes *AtALS1*, transportador localizado en el tonoplasto y *AtSTAR1* (Sensible a la Rizotoxicidad Al 1), situado en la membrana plasmática, actúan independientemente de STOP1, no son inducidos por Al y su papel en la respuesta a Al no está claro. En *Arabidopsis*, *ALS1* parece estar implicado en el transporte de Al quelado con OA al interior de la vacuola y el transportador del tonoplasto *ALMT9* regula el contenido de OA en la misma. Cuando Al entra en la mitocondria interactúa con las proteínas Fe-S del complejo I y III, inhibiendo la cadena de transporte de electrones lo que resulta en la acumulación de electrones y una producción masiva de ROS en la mitocondria. Esto provoca la pérdida del potencial de membrana (MTP), lo que termina provocando la activación de la vía de tipo caspasa-3 que termina en la muerte celular programada. Bajo estrés por Al *AOX1a* (oxidasa alternativa) incrementa su expresión y, por tanto, tiene un papel protector frente a la toxicidad por aluminio. Abreviaturas: **I, II, III y IV**, complejos de cadena de transporte de electrones mitocondriales; **Al**, aluminio; **ALMT**, transportador de malato activado por aluminio; **ALS3**, sensible al aluminio 3; **AOX**, oxidasa alternativa; **DTC**, portador de dicarboxilato / tricarboxilato; **e-**, electrón; **MATE**, familia de extrusión de compuestos múltiples y tóxicos; **OA**, orgánico ácido; **ROS**, especies reactivas de oxígeno; **R**, receptor; **STAR1**, sensible a la rizotoxicidad Al 1; **TCA**, ciclo del ácido tricarboxílico. Los signos de interrogación (?) denotan rutas metabólicas desconocidas (Nunes-Nesi et al., 2014).

2.1.3. Efectos del aluminio en la salud humana

El aluminio puede acabar en el cuerpo humano mediante diversas vías: por inhalación, por vía parenteral (diálisis, vacunas...) o por ingesta a través del agua, los medicamentos o la comida (Igbokwe et al., 2020). Productos derivados de cereales como harina, pan bollería, etc. pueden contener entre 1 y 737 mg kg⁻¹, aunque el 82% de las muestras tuvo una concentración por debajo de 10 mg kg⁻¹ (Stahl et al., 2011). Los alimentos que de forma natural poseen mayor contenido en aluminio son las patatas, las espinacas (Igbokwe et al., 2020) y el té (con una media de 40 mg kg⁻¹) (Stahl et al., 2011). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ingesta de aluminio a través de la dieta (mg/día) oscila entre 1,9 y 13 mg/día en función del país: Australia (1,9-2,4), Finlandia (6,7), Alemania (8-11), Holanda (3,1), Suecia (13), Suiza (4,4), Reino Unido (3,9), EE. UU (7,1-8,2) (WHO, 1998).

El aluminio puede acumularse en tejidos animales, generando daños por toxicidad. Se ha demostrado que este metal presenta toxicidad reproductiva, provoca lesiones pulmonares, malformaciones óseas, inmunotoxicidad, lesiones neurológicas que pueden derivar en la aparición de enfermedades como Alzheimer, enfermedades inflamatorias y además afecta a una gran cantidad de procesos fisiológicos. También se trata de un elemento genotóxico, teratogénico, mutagénico y carcinogénico, al favorecer la proliferación y dispersión de las células tumorales puesto que actúa como metal-estrógeno (WHO, 1998; Exley y House, 2011; Igbokwe et al., 2020). Esto lo convierte en un elemento a tener en cuenta para la salud pública.

2.2. Cadmio

El cadmio se encuentra en el suelo de forma natural (EFSA, 2012). En la corteza terrestre la concentración media de cadmio oscila entre 0,15 y 0,2 ppm (Fleischer et al., 1974). No obstante, su concentración en suelos depende del tipo de roca existente en los mismos. El cadmio puede encontrarse en diferentes formas: precipitado con óxidos, hidróxidos y óxidos hidratados o con carbonatos, asociado a la fracción orgánica, unido a los cristales minerales o unido a grupos sulfuro (Adriano, 2001). La concentración de cadmio puede incrementarse forma natural o por la actividad antropogénica (EFSA, 2012). El origen natural está asociado al desgaste de las rocas y, principalmente, a las emisiones volcánicas, pudiendo alcanzar 15.000 – 88.000 toneladas por año (UNEP, 2010; EFSA, 2012), mientras que el origen antropogénico de la contaminación por cadmio proviene de la producción industrial, consumo y utilización de productos que contienen cadmio, ganadería (11%), agricultura (34%) y tratamiento de aguas residuales (5%) (**Fig. 5**) (Adriano, 2001; Yuan et al., 2019).

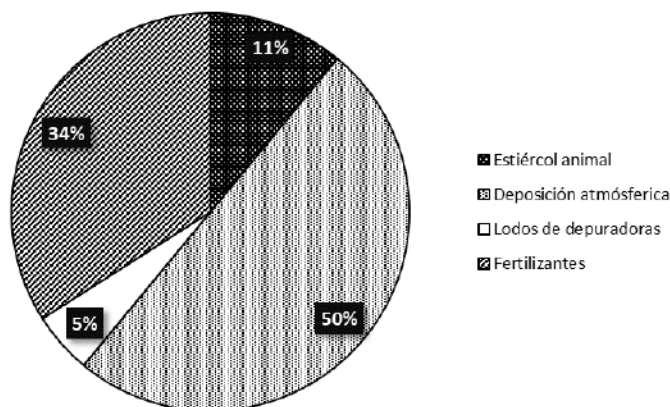


Figura 5. Contribución relativa de las principales fuentes de cadmio a la contaminación de suelos agrícolas. El principal origen de la contaminación por cadmio se debe a la deposición de contaminaciones atmosféricas que contienen cadmio, la segunda fuente principal consiste en el uso de fertilizantes, fundamentalmente fertilizantes de fosfato, puesto que estos contienen cadmio. Adaptado de Adriano, 1986.

La contaminación de los suelos está asociada al desgaste de las rocas minerales, pero también a las fuentes antropogénicas (**Tabla 1**), especialmente, a la aplicación de fertilizantes de fosfato, la minería extractiva o la utilización de los fangos resultantes del tratamiento de aguas residuales como fertilizantes (Davis, 1984; Adriano, 2001). Además, este metal pesado es también generado como un producto secundario de la industria del zinc, del cobre y de otros minerales (Adriano, 2001; Jackson y MacGillivray, 1995; Faroon et al., 2012). También es usado en otros productos: baterías níquel-cadmio (Ni-Cd) (83%), pigmentos (8%), revestimientos y aleaciones (7%), estabilizadores de plásticos (1,2%), aleaciones no ferrosas, dispositivos fotovoltaicos y otros usos (0,8%) (Faroon et al., 2012). Aunque desde 1970 su utilización se encuentra en descenso en occidente, la comercialización de productos que contienen cadmio se incrementa, especial y mayoritariamente las baterías Ni-Cd (UNEP, 2010), y, en consecuencia, no se soluciona el problema de la contaminación por cadmio (**Tabla 1**).

En Europa, el 72,6% de los suelos tienen concentraciones bajas de cadmio y solo el 5,5% de las muestras tienen una concentración superior al valor recomendado. Las regiones con mayor cantidad de cadmio son Irlanda y Grecia. En España y Francia sólo en algunos suelos se encuentran concentraciones de cadmio por encima de los valores recomendados en la producción alimentaria (Su et al., 2014; Tóth et al., 2016a, 2016b) (**Fig. 6**). Sin embargo, los datos de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012) indican que los ciudadanos europeos ingieren aproximadamente un 35% más de cadmio que el valor máximo recomendado (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso). Además, según estos mismos datos, este porcentaje puede incrementarse entre 135-208% en determinadas regiones. La mayor parte del cadmio ingerido se encuentra en granos y productos derivados (26,9%), vegetales (16%) y raíces y tubérculos con almidón (13,2%), aunque también pueden encontrarse en otros alimentos como el chocolate (4,3%) o moluscos (3,2%) (EFSA, 2012).

Tabla 1. Emisiones antropogénicas de cadmio. (Sanitá di Toppi y Gabrielli, 1999).

	10 ³ toneladas año ⁻¹
<i>Atmósfera</i>	
Producción energética	0,79
Fundición y refinación	5,43
Procesos de manufactura	0,6
Incineración de residuos	0,75
Total	7,57
<i>Suelos</i>	
Residuos agrícolas y ganaderos	2,20
Tala y deshechos de madera	1,10
Basura urbana	4,20
Aguas residuales y residuos orgánicos	0,18
Residuos sólidos de la fabricación de metales	0,04
Cenizas de carbón	7,20
Fertilizantes y turba	0,20
Productos manufacturados descartados	1,20
Precipitados atmosféricos	5,30
Total	21,62
Total general	29,19

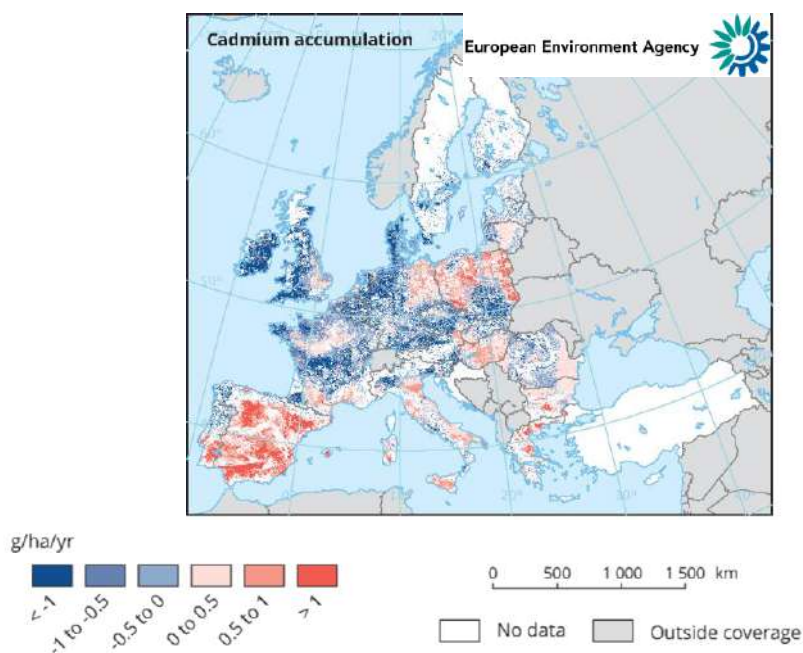


Figura 6. Ratio de acumulación de cadmio. *The European environment – state and outlook 2020. Knowledge for transition to a sustainable Europe.* European Environment Agency, 2019 Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019.

2.2.1. Toxicidad por cadmio en plantas

El cadmio es uno de los metales más tóxicos, convirtiéndose en un grave problema para la productividad de los cultivos. La disponibilidad del cadmio es alta, aunque depende de factores como el pH, el contenido de materia orgánica, el potencial redox, la temperatura o la concentración de otros elementos, por lo que tiene efectos tóxicos en plantas a muy baja concentración en el suelo (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; Adriano, 2001). El cadmio es transportado fácilmente por la planta a través del xilema vía apoplástica o simplástica, unido a ligandos como ácidos orgánicos o fitoquelatinas (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; Haider et al., 2021). El cadmio afecta a múltiples procesos fisiológicos: el metabolismo del nitrógeno y de los carbohidratos, fotosíntesis, asimilación de sulfato, relación planta-agua, transporte y almacenamiento de nutrientes... lo que provoca pérdidas importantes en la producción de los cultivos (Haider et al., 2021).

La tolerancia y los efectos de la toxicidad por cadmio varían en función de la especie y de la variedad de las plantas. En hojas afecta a la fotosíntesis. La acumulación de cadmio en hojas reduce la fotosíntesis neta e incrementa el nivel de CO_2 interno. Esto podría estar asociado a la disminución en la fijación de CO_2 llevada a cabo por la enzima Rubisco, como se ha demostrado en *Vigna radiata* (Wahid et al., 2008), ya que es inhibida por cadmio. Además, el cadmio inhibe la apertura estomática (**Fig. 7**) (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; DalCorso et al., 2008).

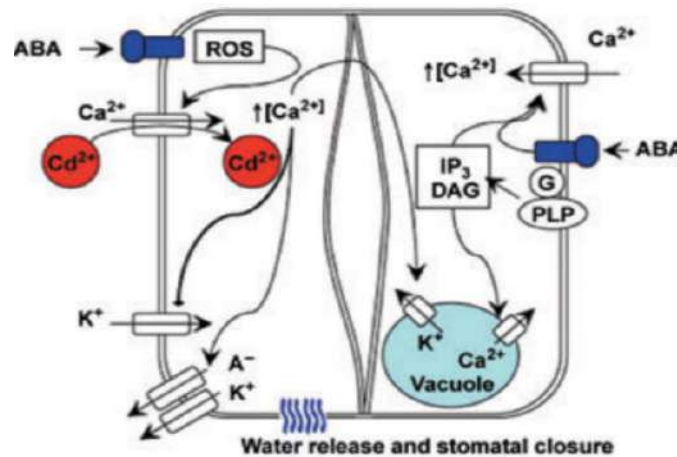


Figura 7. Esquema del cierre estomático inducido por cadmio. El cadmio es capaz de mimetizarse con los iones de calcio, por lo que la entrada de iones de cadmio en la célula guarda provoca el cierre de los canales de entrada de potasio y la activación de los canales aniónicos de la membrana y de los canales de salida de potasio, induciendo, por tanto, el cierre del estoma (DalCorso et al., 2008).

Además, el cadmio también afecta de forma directa a los fotosistemas, especialmente inhibe al fotosistema II, al interactuar con los sitios donante y aceptor del mismo (DalCorso et al., 2008; Ekmekçi et al., 2008; Haider et al., 2021). También reduce el contenido de clorofilas y carotenoides (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; DalCorso et al., 2008), al afectar a las enzimas ácido 5-aminolevulinico deshidratasa (ALAD) y clorofilasa, que intervienen en la síntesis y en la degradación de clorofilas, respectivamente (Wahid et al., 2008; Haider et al., 2021). También afecta a las reacciones

de carboxilación que ocurren durante la fotosíntesis, alterando también otras actividades metabólicas del cloroplasto (Ekmekçi et al., 2008; Wahid et al., 2008; Haider et al., 2021). (**Fig. 8A**).

También en hojas, el cadmio afecta severamente al metabolismo del azufre (Sanità di Toppi y Gabrielli, 1999), ya que, además de inducir un aumento importante de compuestos con grupos tiol, disminuye la actividad de las enzimas ATP-sulfurilasa y O-acetilserina sulfurilasa, enzimas involucradas en la ruta de la asimilación de sulfato (**Fig. 8B**) (DalCorso et al., 2008; Ernst et al., 2008). En raíces, el cadmio afecta al metabolismo del nitrógeno, disminuyendo la asimilación del nitrato al inhibir las enzimas nitrato y nitrito reductasa y del amonio al interferir con las enzimas del ciclo GS-GOGAT (**Fig. 8C**) (Boussama et al., 1999; Sanità di Toppi y Gabrielli, 1999; Gouia et al., 2000, 2003; DalCorso et al., 2008; Haider et al., 2021).

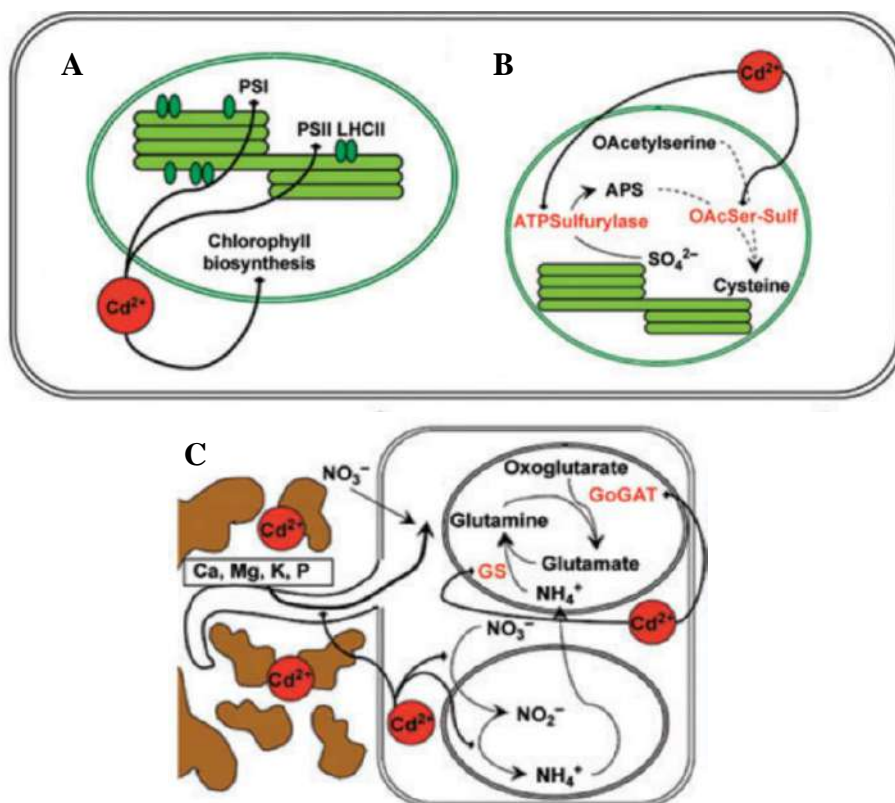


Figura 8. Esquema de los efectos del cadmio sobre las células de las hojas y raíces. El cadmio inhibe la fotosíntesis y la biosíntesis de clorofila (A) y el metabolismo del azufre (B). El cadmio disminuye la asimilación nitrógeno en las raíces (C) (DalCorso et al., 2008).

El cadmio también afecta al núcleo celular. Se une covalentemente a la guanina o adenina de los ácidos nucleicos y, además de inducir daño oxidativo como se ha descrito en tabaco, habas o soja, es capaz de inhibir a las enzimas que intervienen en la síntesis y en la reparación del ADN (Deckert, 2005) o a las ribonucleasas (Sanità di Toppi y Gabrielli, 1999). El cadmio es capaz de sustituir al zinc de los dedos de Zinc de factores de transcripción (Sanità di Toppi y Gabrielli, 1999; Deckert, 2005). Por tanto, procesos tan básicos y esenciales como la replicación, la transcripción e incluso la reparación del ADN se ven perjudicados por la toxicidad por cadmio. Esto resulta finalmente, en la

inducción de una alta tasa de mutación, como se ha investigado en *Arabidopsis thaliana* (DalCorso et al., 2008), provocando anomalías florales así como malformaciones en los embriones (Ernst et al., 2008). En diferentes especies de plantas, como el trigo y el guisante, la citotoxicidad por cadmio puede conllevar la formación de anomalías en los cromosomas e incluso la inhibición de la mitosis alterando el ciclo y la división celular (DalCorso et al., 2008).

Además de al nitrógeno y al azufre, el cadmio afecta a la absorción de otros nutrientes, en una numerosa cantidad de especies vegetales, debido a que afecta a la permeabilidad de la membrana plasmática y a que compite por los mismos transportadores de membrana de otros elementos como potasio, calcio, magnesio, manganeso, cobre, cinc y níquel (Zhang et al., 2002; Wahid et al., 2008; Haider et al., 2021). También reduce la absorción de hierro al provocar una inhibición de la actividad de la enzima Fe(III) reductasa (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; Benavides et al., 2005; Haider et al., 2021) y al competir por su mismo transportador (IRT1) (Dubeaux et al., 2018; Cointry y Vert, 2019; Haider et al., 2021; Hanikenne et al., 2021).

El cadmio afecta a la funcionalidad de otras muchas enzimas provocando alteraciones en una gran diversidad de procesos celulares. Inhibe la fosforilación oxidativa y la actividad ATPasa en las mitocondrias; también inhibe a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, a la glutamato deshidrogenasa, a la enzima málico, isocitrato deshidrogenasa, Rubisco o anhidrasa carbónica, así como a enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa o dehidroascorbato reductasa; e incrementa la peroxidación lipídica (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; DalCorso et al., 2008), aumentando, por ejemplo, la cantidad de malondialdehído (MDA), siendo un efecto común en una gran cantidad de especies distintas (El Rasafi et al., 2022).

El resultado final de la toxicidad por cadmio es un menor crecimiento de las plantas y, por tanto, una menor producción, aunque sus efectos dependen de la especie vegetal y de su variedad. En trigo, el cadmio reduce la biomasa, y el peso y número de las semillas producidas (Zhang et al., 2002). En tabaco y *Arabidopsis*, reduce el crecimiento de raíces y la formación de raíces laterales, y aumenta la formación de pelos radicales, mientras que en tomate la parte aérea se afecta más que la raíz (DalCorso et al., 2008; Ernst et al., 2008). Además, el cadmio también afecta a la germinación, al ser capaz de entrar en las células durante la emergencia de la radícula por los canales de calcio (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; Haider et al., 2021).

2.2.2. Mecanismos de respuestas a la toxicidad por cadmio en plantas

La tolerancia al cadmio está determinada por diversos procesos fisiológicos y moleculares, estos pueden clasificarse en: inmovilización, exclusión y compartimentalización (**Fig. 9**).

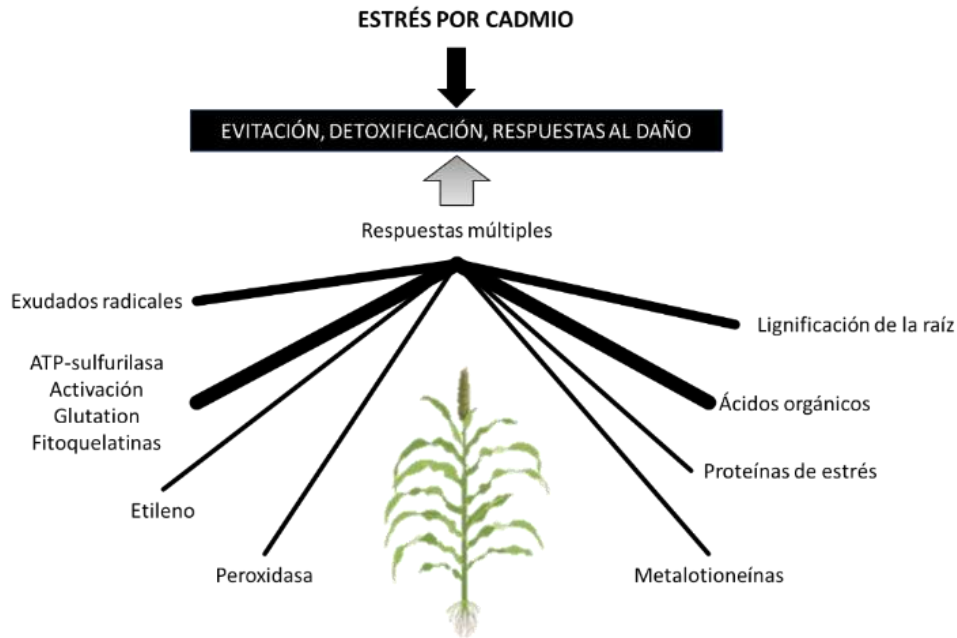


Figura 9. Esquema de las respuestas múltiples a estrés por cadmio en plantas. Modelo multicomponente propuesto que explica cómo las plantas podrían responder al estrés por cadmio de forma eficiente, regulando el grado de expresión de cada una de las respuestas (evitación, detoxificación o respuesta al daño) (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999).

Las primeras respuestas frente al cadmio tienen lugar en las raíces y se basan en impedir la entrada de éste en las células. En este sentido, la principal respuesta se centra, al igual que en el caso del aluminio, en la secreción de exudados como malato o citrato, a través de los transportadores específicos (MATE y ALMT), que actúan como quelantes del ion metálico. El cadmio también puede quedar inmovilizado a las pectinas y a grupos histidilos de la pared celular y a los carbohidratos extracelulares, lo que también evita su entrada (**Fig. 10**) (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; DalCorso et al., 2008; Haider et al., 2021).

Una vez el cadmio logra entrar en las células, se inducen múltiples respuestas entre ellas la quelación del mismo mediante distintas moléculas, principalmente, induce la síntesis de fitoquelatinas (PC), a las que se unirá, formando complejos de bajo peso molecular (LMW). Estos pueden ser expulsados de las células por transportadores específicos o pueden ser secuestrados en la vacuola por transportadores dependientes de ATP (transportadores ABC). Dentro de la vacuola se forman complejos de alto peso molecular (HMW), debido a la unión de PC con altos niveles de polimerización y que, además, presentan grupos de azufre-ácido lábil. Esto aumenta su capacidad y su eficiencia para unirse a cadmio y mantenerlo secuestrado. Sin embargo, las condiciones ácidas de la vacuola pueden desestabilizar la estructura liberando parte del cadmio. Este puede ser

quelado también por aminoácidos o por ácidos orgánicos como citrato, oxalato o malato. Las apo-fitoquelatinas libres pueden ser degradadas por las hidrolasas de la vacuola o pueden ser devueltas al citosol donde siguen actuando en la detoxificación y compartimentalización del cadmio en la vacuola (**Fig. 10**) (Sanitá di Toppi y Gabbrielli, 1999; DalCorso et al., 2008; Verbruggen et al., 2009; Das et al., 2016).

Además, en diferentes especies vegetales (*Solanum nigrum*, *Arachis hypogaea*, *Cucumis sativus*, *Celtis australis* o *Phaseolus vulgaris*) se ha encontrado que el cadmio induce la síntesis y la acumulación de prolina. Este osmolito sería importante frente al estrés abiótico al actuar en el ajuste del potencial osmótico, en la estabilización de la estructura de las membranas, así como en la reducción del daño oxidativo (El Rasafi et al., 2022).

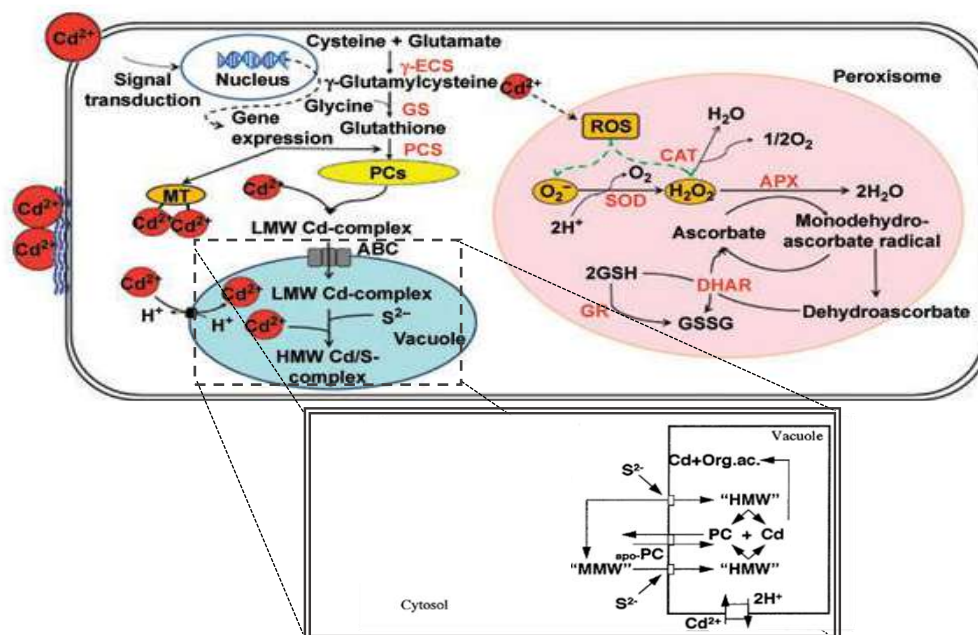


Figura 10. Esquema de los mecanismos involucrados en la quelación y compartimentalización de cadmio en la vacuola. Constituyentes de la pared celular pueden inmovilizar los iones de cadmio evitando la entrada en la célula. Cuando el cadmio entra en el citosol, induce la síntesis de fitoquelatinas y probablemente metalotioneínas. Las fitoquelatinas (PC) se unen al cadmio formando complejos de bajo peso molecular (LMW), que entran en la vacuola a través de un transportador dependiente de ATP (ABC) localizado en el tonoplasto. En la vacuola se forman los complejos de alto peso molecular (HMW). El medio ácido de la vacuola puede liberar el cadmio, este puede volverse a unir a PC o a ácidos orgánicos (Org.ac.). Arriba a la derecha, se observa el ciclo de eliminación de ROS inducidos por cadmio, que tiene lugar principalmente en el peroxisoma (DalCorso et al., 2008).

2.2.3. Efectos del cadmio en la salud

Respecto a la salud humana, el principal problema del cadmio es que se acumula en cantidades significativas en partes aprovechables de los cultivos (Verbruggen et al., 2009; Uraguchi y Fujiwara, 2013), entrando y acumulándose a lo largo de la cadena trófica (Sanitá di Toppi y Gabrielli, 1999), lo que puede convertirlo en un problema para la salud pública (Sasaki et al., 2019).

Una vez ingerido, el cadmio se acumula en los riñones y el hígado (Faroon et al., 2012), pudiendo causar una nefropatía (Sasaki et al., 2019). También afecta al estómago y exposiciones prolongadas generan fragilidad ósea (Faroon et al., 2012). En este sentido el primer caso conocido de intoxicación masiva por cadmio, provocó osteoporosis, osteomalacia, daño renal, enfisema, anemia, llegando a provocar fracturas óseas múltiples (Al-Ghafari et al., 2019). Esta enfermedad fue conocida como Itai-Itai (¡ay, ay!) y ocurrió en Toyama (Japón) a partir de mediados del siglo XX (Nishijo et al., 2017; Sasaki et al., 2019), debido a los vertidos mineros que contaminaron con cadmio los ríos que se usaban para regar los campos de arroz, en cuyos grano se bioacumuló (Sasaki et al., 2019). Además, el cadmio es teratogénico (Sanitá di Toppi y Gabrielli, 1999) y carcinogénico (Faroon et al., 2012; Al-Ghafari et al., 2019).

3. DÉFICIT DE FÓSFORO

El fósforo es un nutriente necesario para todos los organismos. En plantas, es un macronutriente esencial para su crecimiento y desarrollo, convirtiéndose en uno de los tres fertilizantes (N, P y K) más limitantes en la producción agrícola (Vance et al., 2003; Hammond et al., 2004). El 70% de las tierras cultivables sufren deficiencia de fósforo y las plantas cultivadas solo usan aproximadamente entre 20-30% del fosfato aplicado, ya que es rápidamente inmovilizado en el suelo por su alta reactividad con cationes como calcio y magnesio en suelos calcáreos o aluminio y hierro en suelos ácidos. Esto conduce a un uso excesivo de fertilizantes lo que provoca problemas como la eutrofización de las aguas (MacDonald et al., 2011; López-Arredondo et al., 2014; Daneshgar et al., 2018). En la agricultura se consume el 95% de toda la producción de fosfato, lo que supone alrededor de 148 millones de toneladas de roca fosfórica por año (FAO, 2007; Cordell et al., 2009; Daneshgar et al., 2018), unos 50 millones de toneladas de fertilizante de fosfato, estimándose un incremento anual de 20 millones de toneladas hasta 2030 (Cakmak, 2002; Vance et al., 2003; López-Arredondo et al., 2014).

Las principales reservas de fosfato se localizan en las conocidas como rocas fosfóricas, rocas sedimentarias cuyo contenido en fosfato asciende a 2,7-3,7% de su peso. Las rocas fosfóricas se encuentran desigualmente distribuidas por el mundo, debido a las condiciones específicas de su formación (Filippelli, 2011; Daneshgar et al., 2018), lo que las convierte en un recurso finito, insustituible y no renovable (Cordell et al., 2009). La principal reserva de roca fosfórica se localiza en el Sáhara Occidental albergando el 73 % de las reservas del mundo (**Fig. 11**) (FAO, 2007; Cordell et al., 2009; Daneshgar et al., 2018). Sin embargo, al ritmo actual se estima que las reservas podrían desaparecer en los

próximos 50-100 años (Hammond et al., 2004; Cordell et al., 2009; López-Arredondo et al., 2014).

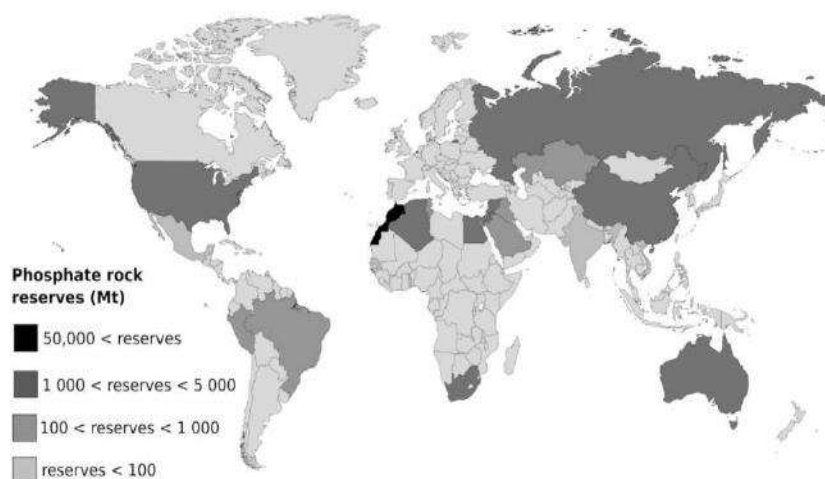


Figura 11. Distribución geográfica de las reservas mundiales de roca fosfórica. (Daneshgar et al., 2018).

3.1. Respuestas al déficit de fósforo

La disponibilidad de fósforo inorgánico (Pi) en el suelo es una limitación muy importante para la productividad de los cultivos, e incluso para los ecosistemas naturales, dada su escasez (Lynch y Brown, 2001). Las plantas en deficiencia de P inducen un amplio rango de respuestas morfológicas, bioquímicas y moleculares encaminadas a mejorar la eficiencia en la captación y uso del Pi. El resultado final de este déficit es una reducción en la producción agrícola al afectar al crecimiento en biomasa de los cultivos, así como a su rendimiento en grano (Plénet et al., 2000; Vance et al., 2003; MacDonald et al., 2011).

Los genes que responden frente al déficit de P pueden clasificarse en genes de respuesta temprana y genes de respuesta tardía. Los primeros responden rápidamente y no son específicos de la falta de P, mientras que los últimos son específicos de la respuesta al déficit de P prolongado y están relacionados con la mejora en la adquisición de P y el incremento en la eficiencia del uso de éste dentro de la planta, induciendo cambios morfológicos, fisiológicos y metabólicos (**Fig. 12**) (Vance et al., 2003; Hammond et al., 2004).

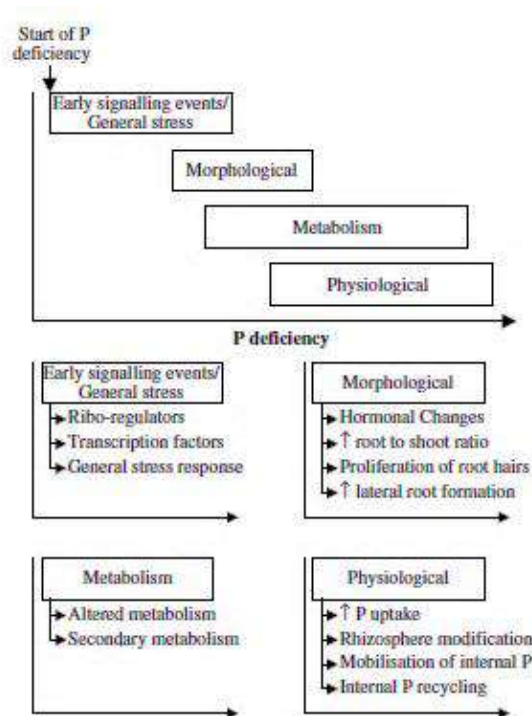


Figura 12. Esquema hipotético de la expresión de genes de respuesta al déficit de fósforo. Los genes han sido clasificados en genes de repuesta temprana y en genes que intervienen en procesos morfológicos, fisiológicos y metabólicos. Estos grupos de genes han sido clasificados arbitrariamente en una escala desde una deficiencia leve de P hasta una deficiencia extrema (Hammond et al., 2004).

Para que estas respuestas puedan activarse las plantas suelen presentar dos mecanismos de detección de fósforo: uno para detectar el fósforo externo de carácter local y otro que detecta los niveles de fósforo interno, que es de carácter sistemático. Ambos han sido descritos en *Arabidopsis* (**Fig. 13**):

El primer mecanismo está mediado por la interacción entre la respuesta a la deficiencia de fósforo (PDR2) y la ferroxidasa de raíz baja en fósforo 1 y 2 (LPR1 y LPR2), por lo que es dependiente de hierro. Esta respuesta conlleva la acumulación de Fe^{3+} y la formación de ROS en el apoplasto. Esta provoca la deposición de callosa en el meristemo apical de la raíz, bloqueando el crecimiento de la raíz primaria y favoreciendo el crecimiento de las raíces laterales. Además, la falta de P induce la expresión de los transportadores ALMT por la vía del factor de transcripción de toxicidad de protones 1 (STOP1). ALMT interviene en la secreción y transporte interno de malato, este ácido orgánico interviene tanto en la detección de la cantidad de P externo como en la solubilización del mismo y en la acumulación de Fe^{3+} en el apoplasto al ser quelante de este ion (**Fig. 13A**) (López-Arredondo et al., 2014; Ham et al., 2018; Canarini et al., 2019; Crombez et al., 2019; Gonçalves et al., 2020).

Por otra parte, el mecanismo sistémico de detección de P está regido por la síntesis de inositol pirofosfato (InsPs) llevada a cabo por las enzimas fosfato quinazas. En *Arabidopsis*, concretamente InsP8 se une al dominio SPX (SYG1, Pho81y XPR1) de AtSPX1 estabilizando la unión de éste a los factores de transcripción de respuesta a falta

de fosfato (PHR), regulándolos negativamente. Cuando los niveles de P disminuyen, también disminuye InsP, en consecuencia AtSPX1 libera a AtPHR1, lo que conlleva la activación de todos los genes inducidos por falta de P (**Fig. 13B**) (López-Arredondo et al., 2014; Ham et al., 2018; Wang y Liu, 2018; Crombez et al., 2019; Gonçalves et al., 2020).

Ambos mecanismos de detección y respuesta a la falta de fósforo son comunes en la mayoría de especies vegetales (Ham et al., 2018; Wang y Liu, 2018; Crombez et al., 2019; Gonçalves et al., 2020).

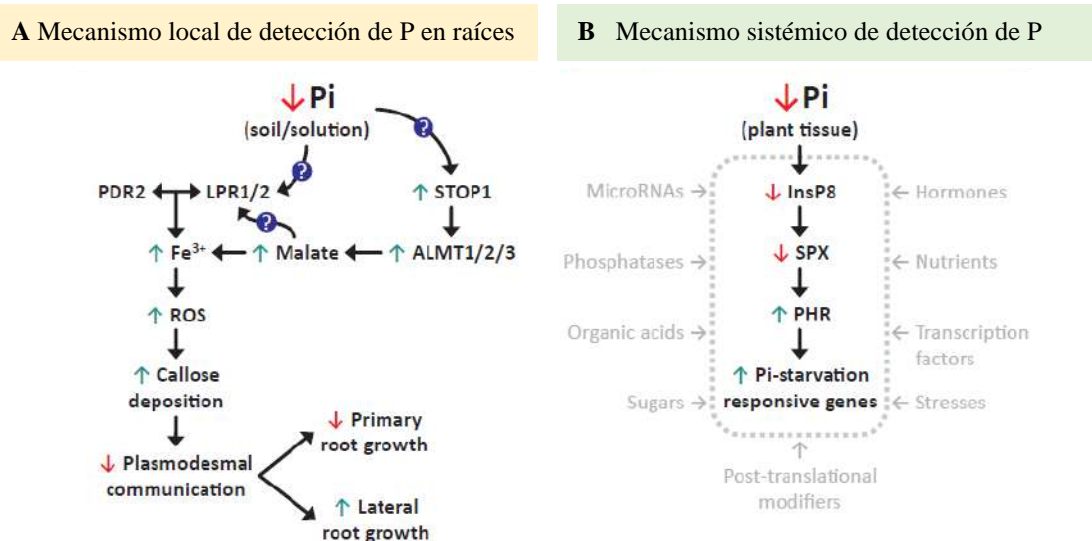


Figura 13. Esquema simplificado de los mecanismos de detección de P en *Arabidopsis thaliana*. A. Mecanismo de detección del P externo, disponible en la rizosfera (local). **B.** Mecanismo sistémico de detección de P interno. Las flechas hacia abajo (rojas) indican inactivación o disminución de la concentración y las flechas hacia arriba (verdes) representan activación o incremento de la concentración. Los signos de interrogación dentro de círculos azules indican procesos poco conocidos. **PDR**, respuesta al déficit de fosfato 2; **LPR1/2**, ferroxidasa de raíz baja en fosfato 1 y 2; **STOP1**, factor de transcripción de toxicidad de protones 1; **ALMT**, transportador de malato activado por aluminio; **ROS**, especies reactivas de oxígeno; **InsP8**, inositol pirofosfato 8; **SPX**, dominio SPX; **PHR**, factores de transcripción de respuesta a falta de fosfato (Gonçalves et al., 2020).

3.1.1. Incremento en la adquisición de fósforo

Cambios en la arquitectura radicular

Cuando existe déficit de Pi en el suelo, las plantas maximizan el volumen de suelo explorado por las raíces para incrementar la eficiencia de adquisición. Morfológicamente, se reduce el crecimiento de la parte aérea de la planta, respecto a su raíz. Además, se producen importantes cambios en la arquitectura radicular, incrementando el crecimiento y la densidad de las raíces laterales (Lynch y Brown, 2001; Hammond et al., 2004; Crombez et al., 2019) y la formación de un mayor número y longitud de pelos radicales (Jungk, 2001; Hammond et al., 2004; Crombez et al., 2019). Además, se ha descrito que

la falta de fosfato induce el crecimiento de las raíces adventicias en judías (*P. vulgaris*), guisantes (*P. sativum*) y soja (*G. max*) (Steffens y Rasmussen, 2016).

Estos cambios en la arquitectura radicular son uno de los mecanismos principales para mejorar la absorción de P (Gonçalves et al., 2020). De hecho, en condiciones de bajo P los pelos radicales constituyen casi el 70% del aérea total de la superficie radicular y pueden ser responsables del 90% del P adquirido por las plantas (López-Arredondo et al., 2014). Sin embargo, implican costes metabólicos (Hetrick, 1991) y se encuentran controlados por los reguladores del crecimiento de plantas (PGRs) (Lynch y Brown, 2001; López-Bucio et al., 2003; Vance et al., 2003), en particular, por hormonas como auxinas, etileno y citoquininas (Hammond et al., 2004). Las auxinas están implicadas en el desarrollo de las raíces laterales, el control de la densidad de los pelos radicales y la elongación de estos. En *Arabidopsis*, se encontró un aumento de los niveles de auxinas, así como un aumento de la expresión del receptor de auxinas respuesta 1 del inhibidor del transporte (TIR1), siendo este, diana de PHR1. Por otra parte, la reducción de los niveles de citoquinina en raíces bajo déficit de P podría estar relacionado con un menor crecimiento de estas (Bates y Lynch, 1996; Ma et al., 2001b; Casimiro et al., 2003; Casson y Lindsey, 2003; Hammond et al., 2004; Crombez et al., 2019).

Incremento del transporte de P

Al mismo tiempo, las plantas también responden frente al déficit de Pi incrementando la capacidad de transporte de Pi en las raíces, mediante la regulación transcripcional de los transportadores de fosfato (*PHT*). Estos se pueden clasificar en transportadores de baja afinidad, cuya expresión es constitutiva y que presentan una K_m de 3-10 μM ; y los transportadores de alta afinidad, inducidos por bajo P y cuya K_m es de 50-300 μM (Raghothama y Karthikeyan, 2005).

Los *PHT* se expresan sobre todo en los pelos radicales. En *Arabidopsis* se han descrito cuatro familias de *PHT*: *PHT1*, *PHT2*, *PHT3* Y *PHT4*. También se han descrito *PHT* en varias especies económicamente importantes, como tomate (*S. lycopersicum*), patata (*S. tuberosum*), soja (*G. max*), arroz (*O. sativa*), cebada (*H. vulgare*) y maíz (*Z. mays*) (López-Arredondo et al., 2014). Hasta la fecha solo se ha encontrado respuesta frente a la falta de Pi en los miembros de la subfamilia *PHT1* (Hammond et al., 2004; López-Arredondo et al., 2014; Crombez et al., 2019). Dentro de esta subfamilia, se han encontrado 14 miembros en soja, cinco en carretón (*Medicago truncatula*), 13 en arroz, de los cuales cuatro se expresan bajo estrés por falta de P, cinco en maíz (López-Arredondo et al., 2014) y en sorgo sólo se han encontrado 3 *PHT* que se sobreexpresan bajo deficiencia de fósforo (Wang et al., 2019b). Por otra parte, las subfamilias *PHT2*, *PHT3* y *PHT4* se encuentran más relacionadas con la distribución de P dentro de los compartimentos subcelulares, localizándose en la membrana interna de los plastidios, la membrana interna de la mitocondria y el aparato de Golgi, respectivamente (López-Arredondo et al., 2014).

Aumento de la solubilización de fósforo

En el aumento de la solubilización del P de la rizosfera intervienen varias respuestas, como son la secreción de ácidos orgánicos, la secreción de fosfatasa o el bombeo de protones (**Fig. 14**).

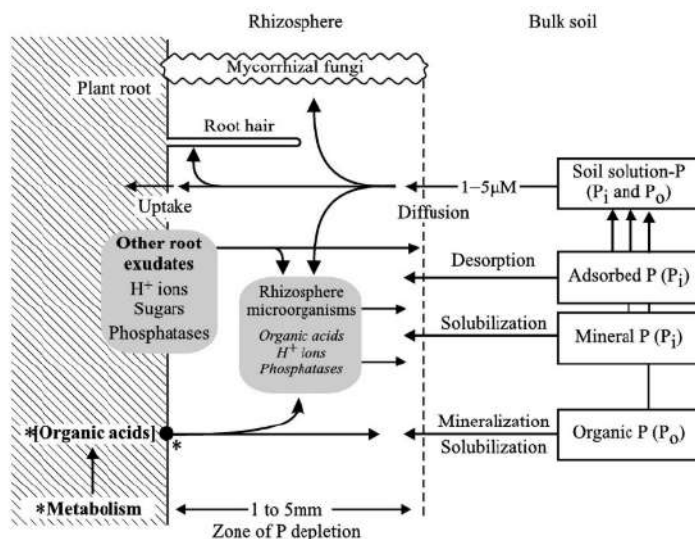


Figura 14. Procesos implicados en la solubilización de P en el suelo. Los ácidos orgánicos aumentan la concentración de P en la solución del suelo al solubilizar los minerales y liberar el P. Los exudados de las raíces también pueden afectar a la actividad de los microorganismos de la rizosfera, lo que influye en estos procesos. Los puntos de regulación de la exudación de aniones orgánicos están marcados por un asterisco (Ryan et al., 2001).

La producción y exudación de ácidos orgánicos es una respuesta común para aumentar la solubilización del P en suelos en una gran variedad de especies vegetales, como en colza (*Brassica napus*), arroz (*O. sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), garbanzo (*Cicer arietinum*), maíz (*Z. mays*), trigo (*T. aestivum*), soja (*G. max*), centeno (*Secale cereale*) o sorgo (*S. bicolor*) (López-Arredondo et al., 2014; Chen y Liao, 2016). Los principales ácidos orgánicos exudados son citrato y malato (Canarini et al., 2019) pudiendo llegar a concentraciones de milimolar en la rizosfera, aunque también el oxalacetato es secretado para solubilizar el P (López-Arredondo et al., 2014) (**Fig. 14**). Los ácidos orgánicos secretados permiten movilizar el P del suelo al separarlo de los cationes ($\text{Fe}^{2/3+}$, Al^{3+} , Ca^{2+}) a los que se encuentra unido de forma natural (Hoffland et al., 1992; Neumann y Römheld, 1999; Ryan et al., 2001; Crombez et al., 2019). La importancia de estos ácidos orgánicos en la solubilización del P es tan importante que llega a suponer el 20% del carbono total fijado durante la fotosíntesis (Vance et al., 2003; Lynch y Ho, 2005) y puede suponer un 30% del carbono procedente de la fijación no fotosintética en las raíces (Ryan et al., 2001). Esto implica cambios metabólicos en las enzimas del ciclo TCA, que aumentan su actividad como respuesta a la deficiencia de P, además de otras enzimas en las que se ha detectado aumento de expresión y/o actividad, tales como malato deshidrogenasa (MDH) o citrato sintasa (CS), implicadas en la síntesis de malato y citrato, respectivamente (Ryan et al., 2001; López-Arredondo et al., 2014). También la PEPC juega un papel relevante en la reposición de los esqueletos carbonados

necesarios para la síntesis de estos ácidos (**Fig. 15**) (Hoffland et al., 1992; Ryan et al., 2001; Hammond et al., 2004; Neumann y Römheld, 1999, 2012).

El déficit de P también incrementa la expresión de transportadores que intervienen en la secreción de ácidos orgánicos: el transportador de malato activado por aluminio (ALMT1) y la bomba de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga (MATE), que secretan malato y citrato, respectivamente (**Fig. 15**) (López-Arredondo et al., 2014; Crombez et al., 2019). Estos son inducidos independientemente de PHR1 (Balzergue et al., 2017).

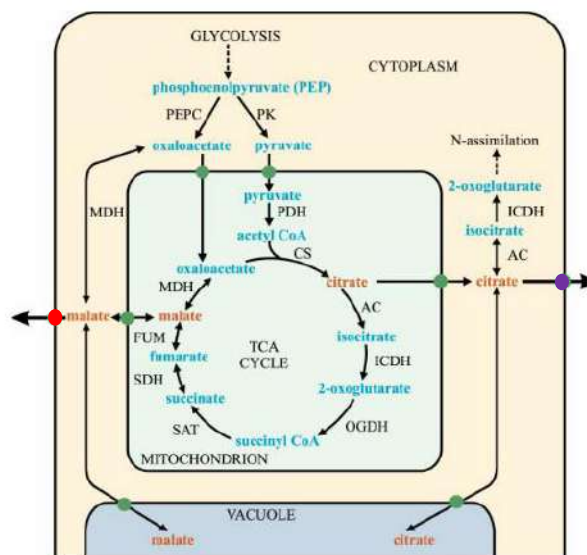


Figura 15. Enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y otras reacciones implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos. Se muestran las isoformas mitocondriales y citoplasmáticas de las enzimas. Los círculos verdes indican los transportadores, el círculo rojo indica el transportador ALMT y el lila el transportador MATE. **PEPC**: fosfoenolpiruvato carboxilasa; **PK**: piruvato quinasa; **PDH**: piruvato deshidrogenasa; **CS**: citrato sintasa; **AC**: aconitasa; **ICDH**: isocitrato deshidrogenasa; **OGDH**: 2-oxoglutarato deshidrogenasa; **SAT**: succinato tioquinasa; **SDH**: succinato deshidrogenasa; **FUM**: fumarasa; **MDH**: malato deshidrogenasa (Ryan et al., 2001).

Además, las plantas también secretan enzimas a la rizosfera para liberar el P de fuentes orgánicas (fitatos, 20-50%, ácidos nucleicos 10%, fosfolípidos 1-5% y otros organofosfatos 30-5%), las cuales suponen entre el 30 y 70% del P total del suelo (Hammond et al., 2004; López-Arredondo et al., 2014). El principal grupo de enzimas liberadas son las fosfatasa ácidas (APases), estas pueden hidrolizar P de un amplio rango de fosfomonoésteres y anhídridos, presentando un pH óptimo inferior a 7 (Wang y Liu, 2018). La síntesis y secreción de fosfatasa se encuentran altamente regulada en múltiples niveles: a nivel transcripcional por PHR y a nivel postraduccional: en la traducción a proteína o regulando su estabilidad mediante modificaciones como la glicosilación, su secreción a la rizosfera regulada por etileno, así como su actividad en la superficie de las raíces, donde se encuentra regulado por el pH, por el nivel de P o por etileno al modular el pH de la superficie radical (Wang y Liu, 2018). La inducción de APases ha sido descrita en muchas plantas: *Arabidopsis* (Lei et al., 2011), tomate (Goldstein et al., 1988), soja

(Zhang et al., 2014), arroz (Hur et al., 2007; Kumar et al., 2021), maíz (Gaume et al., 2001; Yun y Kaeppler, 2001) o sorgo (Yadav y Tarafdar, 2001), siendo por tanto una respuesta común en la solubilización de P de fuentes orgánicas.

Otro de los mecanismos involucrados en el incremento de la disponibilidad de P consiste en el bombeo de protones (H^+) a la rizosfera mediante bombas H^+ -ATPasas, lo que acidifica la rizosfera, aumentando la solubilización del P. Por un lado al favorecer la formación del anión $H_2PO_4^-$ (Neumann y Römheld, 2012) y por otro, incrementando la actividad de las APasas y favoreciendo la secreción de ácidos orgánicos como citrato mediante un antiporte con H^+ (Wang y Liu, 2018; Canarini et al., 2019). Este mecanismo también ha sido descrito en numerosas especies vegetales, por ejemplo en altramuz blanco (*Lupinus albus*) (Yan et al., 2002), soja (*G. max*) (Shen et al., 2006) y arroz (*O. sativa*) (Chang et al., 2009; Zhang et al., 2011).

Dentro de los mecanismos que incrementan la adquisición de P por parte de las plantas se encuentran la formación de micorrizas, especialmente importantes son las micorrizas arbusculares, que pueden incrementar significativamente la cantidad total de P asimilado (López-Arredondo et al., 2014; Ham et al., 2018; Canarini et al., 2019; Crombez et al., 2019).

3.1.2. Mejora del uso interno del fósforo

Las plantas, además de responder ante el déficit de P intentando incrementar la captación de éste, también responden metabólicamente y fisiológicamente para aclimatarse a la falta de P, incrementando la eficiencia en su uso por parte de la planta (López-Arredondo et al., 2014). En este proceso es necesario la detección del estado nutritivo en el que se encuentra la parte aérea y es dependiente de la fotosíntesis, del transporte y distribución de azúcares desde los tejidos fuentes a los tejidos sumideros, siendo estos azúcares fundamentales para que los genes inducidos por falta de P puedan alcanzar sus máximos niveles de expresión (Gonçalves et al., 2020). En este sentido también juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta sistémica los microARNs (miRNAs), entre ellos, el mejor caracterizado es miRNA399, regulado por los factores de transcripción PHR, por tanto, miRNA399 aumenta en falta de P. Entre otras funciones, media la degradación del ARNm de PHO2 (fosfato 2) (Bari et al., 2006; López-Arredondo et al., 2014; Ham et al., 2018). A su vez, PHO2 es una enzima que regula la degradación de PHO1 (fosfato 1). Este es un transportador que permite el flujo de P desde el interior celular al xilema, por tanto, está implicado en el transporte de éste desde las raíces a las hojas. Además PHO2 también regula la degradación del transportador PHT1 (Liu et al., 2012b; López-Arredondo et al., 2014; Wang et al., 2019b).

Además, la deficiencia de P induce cambios metabólicos importantes, como el uso de enzimas alternativas de la glucólisis, de proteínas de transporte de electrones mitocondrial que no requieren P o adenilatos como cosustrato, y de la fotosíntesis (Hammond et al., 2004; López-Arredondo et al., 2014). En la glucólisis, se han descrito al menos 6 enzimas alternativas independientes de P y de adenilato inducidas y activadas en condiciones de falta de P (Plaxton y Tran, 2011). Por ejemplo, en condiciones de falta

de Pi la conversión de sacarosa en hexosa-P se lleva a cabo por una ruta dependiente de pirofosfato (PPi) que requiere UDP-glucosa pirofosforilasa (Ciereszko et al., 2001), otras enzimas glucolíticas inducidas por falta de P son: la fosfofructoquinasa dependiente de PPi (PPi-PFK), la piruvato Pi diquinasa (PPDK), la PEPC y también otras como la bomba de H⁺ dependiente de pirofosfato inorgánico (H⁺-PPiases) del tonoplasto (**Fig. 16**) (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011; Neumann y Römheld, 2012).

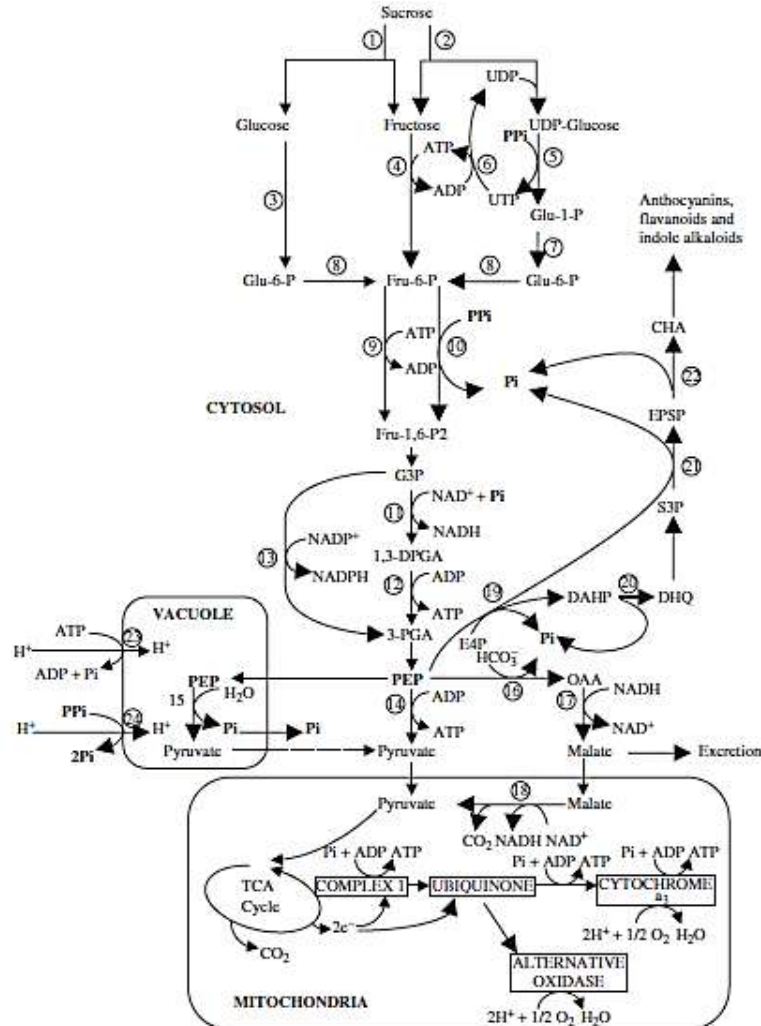


Figura 16. Procesos metabólicos alternativos para la glucólisis citosólica, el transporte de electrones mitocondrial y el bombeo de H⁺ del tonoplasto que pueden ser potenciados bajo condiciones de déficit de P. Las flechas más grandes indican las rutas potenciadas. Las enzimas que catalizan estas reacciones son: (1) invertasa, (2) sacarosa sintasa, (3) Hexoquinasa, (4) Fructoquinasa, (5) UDP-glucosa pirofosforilasa, (6) nucleósido difosfato quinasa, (7) fosfoglucomutasa, (8) fosfoglucoisomerasa, (9) fosfofructoquinasa (dependiente de ATP), (10) fosfofructoquinasa (dependiente de PPi), (11) gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (G3PDH; fosforilante), (12) fosfoglicerato (PGA) quinasa, (13) G3PDH dependiente de NADP (no fosforilante), (14) piruvato quinasa, (15) fosfoenolpiruvato (PEP) fosfatasa, (16) PEP carboxilasa, (17) malato deshidrogenasa, (18) enzima málica, (19) 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP) sintasa, (20) 3-dehidroquinato (DHQ) deshidratasa, (21) 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSP) sintasa, (22) corismato (CHA) sintasa, (23) tonoplasto H⁺-ATPasa y (24) tonoplasto H⁺-PPiase. Las abreviaturas de los compuestos que aparecen en corresponden a: **Glu-1-P**, glucosa 1-fosfato; **Glu-6-P**, glucosa 6-fosfato; **Fru-6-P**, fructosa 6-fosfato; **Fru-1,6-P2**, fructosa 1,6-bisfosfato; **G3P**, gliceraldehído-3-fosfato; **1,3-DPGA**, 1,3-defosfoglicerato; **OAA**, oxaloacetato; **E4P**, eritrosa-4-fosfato; **S3P**, shikimato-3-fosfato. (Hammond et al., 2004).

Otra de las consecuencias de la privación de P es que los niveles intracelulares tanto de P como de ADP se ven severamente reducidos, lo que afecta gravemente a la cadena de transporte de electrones de la respiración. Sin embargo, existen sistemas de transporte de electrones alternativos que permiten a las plantas mantener el flujo respiratorio con una producción de ATP limitada y el funcionamiento del ciclo TCA. En esta cadena de transporte de electrones alternativas son esenciales las NADH dehidrogenasa insensible a rotenona y oxidasa alternativa (AOX) (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011)

La fotosíntesis también es afectada por la falta de fósforo, aunque sus efectos varían entre las diferentes especies vegetales. La inhibición de la fotosíntesis se encuentra asociada, al igual que en el caso de la respiración, a la disminución en la capacidad de transporte de electrones desde el donante en el fotosistema II (PSII) hasta el PSI, esto provoca fotoinhibición, llegando a dañar el PSII (Kondracka y Rychter, 1997; Xu et al., 2007). Se produce una disminución del contenido de ATP que limita la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), reduciendo la actividad del ciclo de Calvin y, por tanto, la fijación del CO₂, también esta se ve afectada por la disminución en la cantidad y la actividad de la enzima Rubisco (Xu et al., 2007; Lin et al., 2009; Thuynsma et al., 2016), lo que a su vez favorece la fotoinhibición previamente mencionada. Finalmente, el suministro de carbono a la planta también se ve afectada puesto que bloquea el flujo de triosas fosfato fuera de los cloroplastos, por lo que finalmente afecta a la síntesis de sacarosa, favoreciendo la síntesis de almidón en un gran número de especies vegetales (Foyer y Spencer, 1986; Flüggé et al., 2003; Xu et al., 2007).

Frente a la fotoinhibición provocada por la deficiencia de P la planta responde desarrollando múltiples mecanismos fotoprotectores, que no son exclusivos de este tipo de estrés (Dixon y Paiva, 1995; Xu et al., 2007; Lin et al., 2009), como la disipación térmica por clorofilas en estado de triplete, el metabolismo fotorrespiratorio, la fotoreducción de O₂ en el ciclo agua-agua y una oxidasa clororrespiratoria alternativa, además hay que añadir toda la actividad antioxidante con la que la planta también responde (Niyogi, 1999, 2000). En este sentido, hay que destacar una respuesta común en muchas plantas frente a la deficiencia de P que es la síntesis y acumulación de antocianinas en hojas, cuya función es fotoprotectora (**Fig. 16**) (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011; Henry et al., 2012; Wang y Liu, 2018). La inducción de la síntesis de antocianinas en respuesta a la falta de P está mediada por miRNA399 (Peng et al., 2020).

El déficit de P aumenta la expresión y actividad de enzimas, como nucleasas, fosfatasas y fosfolipasas relacionadas con la removilización del P de fuentes orgánicas internas (Hammond et al., 2004; López-Arredondo et al., 2014; Wang y Liu, 2018). Las APasas son secretadas en la matriz extracelular y también al espacio intercelular, además existen APasas intracelulares, que removilizan el P de monoésteres y anhídridos (Plaxton y Tran, 2011).

Finalmente, destacar dentro de las respuestas de las plantas para mejorar la eficiencia del uso del P el remplazamiento de los fosfolípidos de la membrana plasmática y del

tilacoide por galactolípidos y sulfolípidos (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011; Wang y Liu, 2018), lo que permite aumentar el P disponible en condiciones de deficiencia de este macronutriente en el suelo.

4. ESTRÉS SALINO

A nivel mundial, la salinización de los suelos de la tierra agrícola se está viendo agravada debido a causas naturales y, sobre todo, como resultado de la actividad humana. Se estima que el 20% de la superficie cultivada y que el 33% de los suelos irrigados están afectados por altos niveles de sal; y existe un 1 billón de hectáreas gravemente afectadas por la sal (Shahid et al., 2018; Ivushkin et al., 2019) (**Fig. 17**). Además, hoy en día, las áreas afectadas por la salinidad se incrementan un 10% cada año, como resultado de la falta de precipitaciones, de la alta superficie de evaporación o del riego con agua de baja calidad... que provocan la acumulación progresiva de sales en el suelo (Epstein et al., 1980; Zhu, 2002; Munns y Tester, 2008; Jamil et al., 2011; Roy et al., 2014). En 2050, se prevé que el 50% de las tierras cultivables hayan sido salinizadas, sino se corrige la tendencia actual (Jamil et al., 2011). La sal tiene efectos muy negativos en los cultivos (Ondrasek y Rengel, 2021), puesto que es uno de los principales factores de estrés abiótico al afectar al crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2016). En 2013, la salinidad de los suelos supuso un coste de 441 por hectárea, lo que generó pérdidas anuales de 27 billones \$ (Shahid et al., 2018).

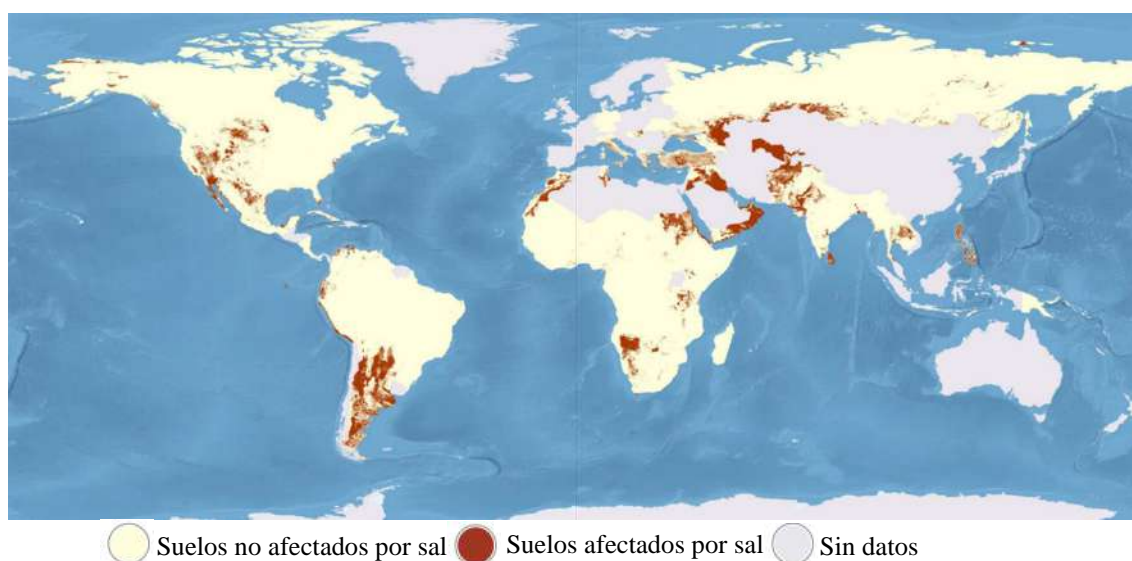


Figura 17. Suelos afectados por sal. Mapa donde se muestra la afectación por sal en suelos a una profundidad de entre 30 y 100 cm (FAO, 2021).

4.1. Toxicidad por sal

La acumulación de sal en los suelos, provoca, entre otros efectos, la reducción en la disponibilidad del agua del suelo, el desequilibrio y limitación de nutrientes, inhibición de rutas metabólicas como la respiración y la fotosíntesis, aumento del estrés oxidativo, disfunción de membranas, etc. (Hasegawa et al., 2000; Orcutt y Nilsen, 2000; Zhu, 2016), lo que lo convierte en uno de los factores de estrés abiótico más importantes.

La salinidad produce en las plantas dos tipos de estreses: estrés hídrico y estrés iónico. Por un lado y, sobre todo al inicio de la exposición a sal, ésta genera un déficit hídrico, al igual que estreses como la sequía o la congelación, puesto que disminuye la disponibilidad de agua para las células, afectando de forma inmediata al crecimiento celular y al metabolismo asociado. Como respuesta a este tipo de estrés las plantas aumentan la eficiencia en el uso del agua (WUE), reduciendo sus pérdidas, acumulando solutos, cambiando las propiedades de la pared celular para evitar la deshidratación, además de emplear otros mecanismos protectores (Jeanneau et al., 2002a; Verslues et al., 2006).

Por otra parte, la alta salinidad en el suelo causa estrés hiperiónico, que puede provocar la muerte de la planta. Este es más tardío, puesto que los iones tardan un tiempo en acumularse hasta concentraciones tóxicas, esto posibilita que se den mecanismos de adaptación (Niu et al., 1995; Yeo, 1998; Glenn et al., 1999; Hasegawa et al., 2000; Munns y Tester, 2008). En general, este tipo de estrés está causado por las altas concentraciones de Na^+ y Cl^- en la solución del suelo. Estos provocan un desequilibrio en la absorción de nutrientes por competencia iónica, especialmente con el K^+ y el Ca^{2+} , provoca la acumulación de iones con efectos tóxicos, sobre todo Na^+ , generando estrés oxidativo. A largo plazo, es este estrés iónico el que genera más daños en la planta (Huh et al., 2002; Verslues et al., 2006). Uno de los mecanismos de respuesta frente a la alteración de la absorción de iones en las raíces consiste en la síntesis o degradación de malato para contrarrestar el exceso de cationes o de aniones, respectivamente (Touraine et al., 1992). En este sentido, la PEPC podría contribuir a la recuperación del balance iónico al intervenir en la síntesis de malato.

Las respuestas de las plantas al estrés salino pueden agruparse en dos etapas. Una primera respuesta rápida (minutos o días) en la hoja relacionada con la detección y señalización del Na^+ (Gilroy et al., 2014; Roy et al., 2014). En ésta tienen lugar las respuestas frente al déficit hídrico como son el cierre de los estomas y la inhibición de la expansión celular (Munns y Termaat, 1986). La segunda etapa depende de los iones, desarrollándose durante un período de tiempo más largo (días-semanas) y en ella, se acumulan iones a concentraciones tóxicas en las hojas, especialmente en las viejas, provocando una senescencia temprana de las mismas, una reducción del crecimiento o incluso provocando la muerte de la planta (Munns y Tester, 2008).

4.2. Tolerancia al estrés salino

Existen diferentes mecanismos de tolerancia a estrés salino que pueden ser clasificados en tres grupos principales. La exclusión de iones tóxicos de la hoja (Na^+ y Cl^-); la tolerancia tisular, compartimentalización de los iones en tejidos, células u orgánulos específicos; y la tolerancia osmótica, regulada por señales que reducen el crecimiento de la hoja y que se activa antes de la acumulación de Na^+ (Munns y Tester, 2008). En la respuesta a la toxicidad iónica están involucrados múltiples transportadores y reguladores de la membrana plasmática y del tonoplasto (Munns y Tester, 2008; Roy et al., 2014; Zhu, 2016), además es probable que los solutos compatibles también sean

fundamentales en el transporte y compartimentalización de los iones en la vacuola, además de intervenir en el ajuste osmótico (Flowers y Colmer, 2008; Munns y Tester, 2008). La mayoría de estos mecanismos actúan de forma simultánea en la misma planta (Roy et al., 2014).

4.2.1. Homeostasis y compartimentación iónica

La homeostasis iónica puede mantenerse mediante la reducción de la entrada de sal por las raíces, reduciendo el transporte de esta hacia las hojas, aumentando la expulsión de las células o el secuestro de sal en las vacuolas (Zhu, 2003). En este mantenimiento cumple una función esencial la ruta de señalización SOS (Salt Overly Sensitive) (Verslues et al., 2006). En esta intervienen tres proteínas principales: SOS1, que codifica un antiportador de Na^+/H^+ en la membrana plasmática, encargado de la exclusión de Na^+ y es activado por fosforilación a través de una proteína dependiente de Ca^{2+} ; SOS2 y SOS3, cuya interacción induce la activación de la quinasa (Gupta y Huang, 2014; Zhu, 2016; van Zelm et al., 2020). Además, el estrés salino afecta a otros iones como K^+ o Ca^{2+} (Niu et al., 1995). El mantenimiento de la homeostasis iónica es dependiente de proteínas transportadoras como ATPasas y pirofosfatasa que traslocan H^+ , ATPasas de Ca^{2+} , transportadores activos secundarios y canales iónicos (Hasegawa et al., 2000).

4.2.2. Biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles

Uno de los efectos de la salinidad es la reducción del potencial hídrico (Ψ_w) en los tejidos (Kramer y Boyer, 1995), lo que implica la activación de respuestas relacionadas con el estrés hídrico. A corto plazo, el principal mecanismo consiste en el cierre estomático. A largo plazo, intervienen cambios en el crecimiento raíz/parte aérea, en el almacenaje de agua en los tejidos, en el grosor de la cutícula... De todos estos, el cambio más importante en cultivos es el crecimiento de las raíces para incrementar la toma de agua (Verslues et al., 2006). Estos mecanismos son suficientes para mantener el desarrollo de la planta cuando el estrés es medio y de una duración limitada (Kramer y Boyer, 1995).

Al producirse el cierre estomático, la planta acumula solutos compatible u osmolitos, y aumenta la rigidez de la pared celular para tratar mantener la entrada de agua (Zhang et al., 1999; Verslues et al., 2006). Los osmolitos compatibles son un grupo de compuestos orgánicos que no interfieren con el metabolismo a pesar de encontrarse en alta concentración. Existen una gran variedad de osmolitos compatibles, entre los principales destacan: azúcares (sacarosa y fructosa), azúcares alcoholes (glicerol y pinitol) y azúcares complejos (trehalosa, rafinosa, fructanos). También pueden actuar como osmolitos iones como K^+ o metabolitos con carga eléctrica como glicina, betaína, dimetil sulfonio propionato (DMSP), prolina o ectoína. La acumulación de estos reduce el potencial osmótico interno, facilitando el ajuste osmótico e incrementando la tolerancia al estrés (McCue y Hanson, 1990). Además, estos solutos pueden actuar como osmoprotectores no enzimáticos, como las chaperonas de bajo peso molecular, puesto que son moléculas hidrofílicas que pueden sustituir al agua en la superficie de proteínas o de complejos proteicos (Hasegawa et al., 2000; Gupta y Huang, 2014).

En general, la síntesis de estos osmolitos compatibles tiene lugar a través de rutas de alta actividad metabólica que permiten respuestas más rápidas (McCue y Hanson, 1990). Alguno de estos casos son: la prolina, cuya ruta de síntesis parte de la ruta de biosíntesis del glutámico, la ectoína que lo hace del aspártico y la glicina betáina que lo hace en la ruta de la colina (Hasegawa et al., 2000; Gupta y Huang, 2014). En plantas de maíz sometidas a estrés osmótico se han descrito incrementos de los niveles de PEPC en relación con un aumento de prolina (Rodríguez-Penagos y Muñoz-Clares, 1999), y resultados similares fueron obtenidos en cebada (Arias-Baldrich et al., 2015). También se ha visto la importancia de la PEPC en sorgo en condiciones de estrés salino (de la Osa et al., 2022). En este sentido, el papel de la PEPC podría consistir en suministrar esqueletos carbonatados para la síntesis de osmolitos, como la prolina, contribuyendo a un mayor grado de tolerancia frente al déficit hídrico (Jeanneau et al., 2002a).

La respuesta al estrés salino se encuentra regulada a nivel transcripcional. Los factores de transcripción controlan directamente la activación de una amplia gama de genes inducibles por estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 1997; Gupta y Huang, 2014). Existen gran cantidad de genes y factores de transcripción que cumplen gran cantidad de funciones: homeostasis iónica (genes *SOS*, *AtNHX1* y *H⁺ATPasa*), genes asociados a la senescencia (*SAG*), chaperonas moleculares (*HSP*) y factores de transcripción relacionados con la deshidratación (*DREB*) (Hasegawa et al., 2000; Gupta y Huang, 2014).

Un elemento clave también la señalización del estrés osmótico es el ácido abscísico (ABA), una hormona con múltiples funciones tanto en el desarrollo como en las respuestas a estrés (Zhu, 2016; Xu et al., 2018a). En condiciones de estrés osmótico el ABA se acumula, actuando sobre la expresión génica y los procesos celulares (Xie et al., 2016), interviniendo en el balance hídrico, regulando las células guarda e induciendo la síntesis de proteínas de tolerancia (Xiong et al., 2002). En hojas de cebada se ha detectado una rápida acumulación de ABA tras la exposición a NaCl, lo que indica una síntesis *in situ* de la hormona (Fricke et al., 2004, 2006; Munns y Tester, 2008). Además en la señalización de la respuesta intervienen otras fitohormonas como el etileno o las citoquininas (Leung y Giraudat, 1998). También existen evidencias del movimiento de glutatión (Droog, 1997; Foyer et al., 1997; Berna y Bernier, 1999). Todo esto genera gran variedad de señales, que terminan disparando una amplia red de respuestas celulares (Hasegawa et al., 2000).

5. LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

La PEPC es una enzima presente en todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas verdes y cianobacterias) y en la mayoría de bacterias no fotosintéticas y arqueas, pero está ausente en animales y hongos (Izui et al., 2004; O'Leary et al., 2011a). En plantas es una enzima esencial en la fijación inicial del CO₂ en la fotosíntesis C₄ y CAM, pero además cumple una gran diversidad de otras funciones no relacionadas con la fotosíntesis. Esta gran variedad de funciones fisiológicas, convierten a la PEPC en una enzima importante en el metabolismo vegetal, lo que ha suscitado un gran interés por ésta (Kluge, 1983; Chollet et al., 1996; O'Leary et al., 2011a).

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) es una enzima que cataliza la β-carboxilación oxidativa del fosfoenolpiruvato (PEP), en presencia de HCO₃⁻, formando oxalacetato (OAA) y liberando fosfato inorgánico, utilizando Mg²⁺ como cofactor. El oxalacetato producido es convertido rápidamente por la enzima NAD(P)-malato deshidrogenasa en malato, que es considerado el primer producto estable de la reacción (Lepiniec et al., 1994) (**Fig. 18**).

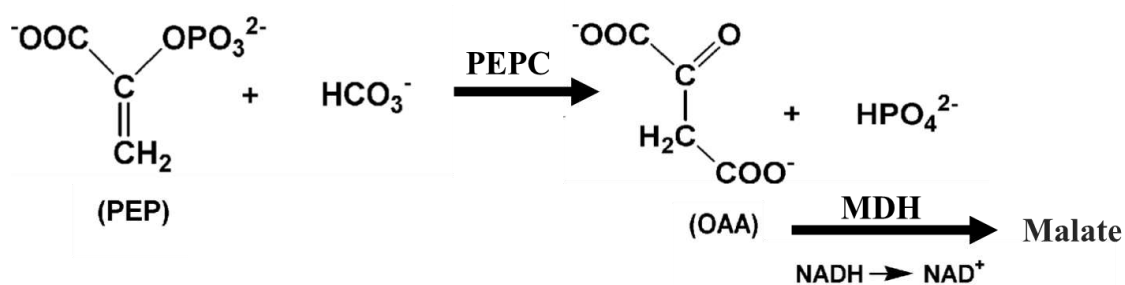


Figura 18. Representación de la reacción de la PEPC. OAA, oxalacetato; MDH, malato deshidrogenasa. Adaptada de Izui et al., 2004.

5.1. Familia génica de la PEPC: genes *PPC*

La enzima PEPC pertenece a una pequeña familia multigénica. Esta puede dividirse en dos grupos filogenéticos: las PEPCs tipo planta (PTPC) y las PEPCs tipo bacteriano (BTPC). Estas últimas presentan una mayor similitud con PEPC procedentes de proteobacterias que con las diferentes isoenzimas PTPC, con las que guarda menos de un 40 % de identidad (Sánchez y Cejudo, 2003; Sánchez et al., 2006; Gennidakis et al., 2007; O'Leary et al., 2011b). Además, dentro de las PTPCs se pueden distinguir dos tipos: las isoenzimas de tipo C₃ o no fotosintéticas y las de tipo de C₄, sólo presentes en plantas con fotosíntesis de tipo C₄ o CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) (Lepiniec et al., 1993, 1994; O'Leary et al., 2011b). Evolutivamente, tanto las PTPC como las BTPC provienen de un linaje ancestral de gamma-proteobacterias, en las que se produjeron eventos de transferencia horizontal con el ancestro eucariota común de plantas y protistas (Peng et al., 2012).

La PEPC C₄ evolucionó a partir de genes codificantes de PEPC no fotosintéticas que estaban presentes en las especies C₃ ancestrales (angiospermas), los cambios supusieron

la adquisición de características cinéticas y de regulación distintivas respecto a las isoformas C₃ (Svensson et al., 2003; Westhoff y Gowik, 2004), como se verá más adelante. Pese a estos cambios evolutivos tan importantes, la secuencia nucleotídica conserva un 90 % de similitud en *Flaveria* (Westhoff y Gowik, 2004) y un 75 % en *Zea mays* (Dong et al., 1998) y en *Sorghum vulgare* (Svensson et al., 2003) entre la PEPC C₄ y C₃. En general, las plantas presentan diferentes isoformas de PEPC de tipo C₃ con secuencias, estructura, función y regulación altamente similares y cuyas diferencias radican en los niveles de expresión en cada órgano de la planta y en la respuesta frente a determinados estímulos (Lepiniec et al., 1993, 1994).

El genoma del sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] ha sido secuenciado y se han descrito seis genes codificantes de distintas isoenzimas PEPC (Paterson et al., 2009). Ruiz-Ballesta et al. (2016) asignaron una nomenclatura numérica a estos genes teniendo en cuenta tanto su función como la nomenclatura de sus ortólogos en otras especies cercanas. El gen *SbPPC1* codifica la enzima PEPC de tipo C₄ o fotosintética (Cretin et al., 1990; Wang et al., 2009) y el gen *SbPPC6* codifica la isoenzima bacteriana (Sánchez y Cejudo, 2003; Wang et al., 2009). Los otros cuatro genes encontrados codifican PEPC de tipo C₃. El gen *SbPPC2* codifica una PEPC expresada constitutivamente y el gen *SbPPC3*, lo hace de una PEPC específica de raíz y cuya expresión es inducible (Lepiniec et al., 1993, 1994, Ruiz-Ballesta et al., 2014, 2016). Los dos genes restantes, *SbPPC4* y *SbPPC5*, se encuentran poco caracterizados y presentan genes homólogos en arroz. Se ha descrito que el gen *SbPPC4* aumenta su expresión en la fase de celularización durante el desarrollo de las semillas y durante la germinación (Ruiz-Ballesta et al., 2016), mientras que del gen *SbPPC5* no se ha detectado expresión ni en hojas ni en raíces (Arias-Baldrich et al., 2017), pero si en semillas, aunque con niveles muy bajos de sus transcritos (Ruiz-Ballesta et al., 2016). Las diferencias de las PTPCs caracterizadas en sorgo se encuentran en los niveles de expresión de los distintos tejidos así como en su respuesta frente a diferentes estímulos, mientras que presentan estructuras primarias y propiedades funcionales y reguladoras semejantes (Lepiniec et al., 1993), siendo la isoenzima BTPC la que presenta mayor divergencia funcional y estructural respecto al resto de isoformas (O'Leary et al., 2009; Peng et al., 2012; Ting et al., 2017).

5.2. Estructura de la PEPC

La estructura primaria de la PEPC se dedujo a partir del gen *PPC* clonado en *Escherichia coli* en 1984 (Fujita et al., 1984). El número de aminoácidos que componen el polipéptido PEPC varía en función del organismo; el número aproximado de aminoácidos es de 870 (100 kDa) en bacterias, 970 (110 kDa) en plantas vasculares, 1010 (116 kDa) en cianobacterias y 1150 (134 kDa) en protozoos (Izui et al., 2004). Además, se ha descrito una PEPC en arqueobacterias hipertermófilas *Methanothermus sociabilis*, *Sulfolobus acidocaldarius* y *Sulfolobus solfataricus*, cuya subunidad tiene tan solo 60 kDa, siendo completamente funcional, pero sin tener regulación alostérica (Ettema et al., 2004; Sako et al., 1996, 1997).

In vitro, la PEPC puede encontrarse en forma de tetrámero, trímero, dímero y monómero (Stiborová y Leblová, 1986), siendo el tetrámero la forma mayoritaria y con la actividad catalítica más elevada, mientras que el dímero tiene una menor actividad y el monómero no presenta actividad (Walker et al., 1986; McNaughton et al., 1989; Jawali, 1990; Willeford et al., 1990). Normalmente, *in vivo* las PTPCs se encuentran en forma de homotetrámero de unos 440 kDa denominado PEPC de clase 1 (Rivoal et al., 2002; O'Leary et al., 2011a). A este homotetrámero pueden unirse cuatro subunidades de BTPC, sumando aproximadamente 910 kDa, formando un complejo denominado PEPC de clase 2 (Blonde y Plaxton, 2003; Gennidakis et al., 2007).

Las mayores diferencias entre los distintos tipos de PEPC en plantas vasculares se encuentran entre las BTPCs y las PTPCs, existiendo tres características principales que las diferencian. Tienen una secuencia distinta en un tetrapéptido crítico muy conservado en el extremo C-terminal, siendo (R/K)NTG y QNTG en BTPC y PTPC, respectivamente (Dong et al., 1999; Sánchez y Cejudo, 2003; Mamedov et al., 2005; Xu et al., 2006); las BTPCs carecen del motivo de fosforilación en una serina (ácido-base-XX-SIDAQLR) de la región N-terminal y que es característico en todas las PTPC (Budde y Chollet, 1986; Nimmo et al., 1987; Terada et al., 1990; Lepiniec et al., 1994; Vidal y Chollet, 1997; Matsumura et al., 2002; O'Leary et al., 2011a); y la presencia en todas las BTPCs de un inserción de unos 10 kDa de tamaño y que es altamente divergente (O'Leary et al., 2011a, 2011b; Plaxton y O'Leary, 2012). Además, cabe destacar que en semillas de ricino se ha descrito que BTPC es fosforilada *in vivo* en tres sitios distintos: en una treonina del extremo N-terminal y en las serinas 425 y 451, siendo la serina 425 un sitio de fosforilación conservado sólo parcialmente (Uhrig et al., 2008a; O'Leary et al., 2011b; Dalziel et al., 2012). La fosforilación de BTPC parece estar implicada en la regulación de la asociación de subunidades BTPC/PTPC en los complejos PEPC de clase 2 (Rivoal et al., 2002; O'Leary et al., 2011b, 2011c).

La PEPC C₄ y la PEPC C₃ difieren entre sí, además de por su función, en su cinética enzimática. Estudios realizados en especies de los géneros *Atriplex*, *Flaveria* y *Panicum* han confirmado que la K_m para PEP, por lo general, es 10 veces superior en la PEPC C₄ que en PEPC C₃ dentro de una misma especie. Por otra parte, también existe diferencia de afinidad por el otro sustrato de la reacción, el bicarbonato (HCO_3^-), en este caso la K_m es menor para la PEPC C₄. También se ha encontrado que la sensibilidad a los activadores e inhibidores alostéricos difiere entre ambos tipos de enzimas. La PEPC C₄ es menos sensible al malato, un inhibidor de la actividad PEPC, pero más sensible a la activación por glucosa-6-fosfato (G6P) y glicina (Gly), activadores alostéricos de la PEPC (Svensson et al., 2003; Westhoff y Gowik, 2004; Dalziel et al., 2012; Park et al., 2012).

Las diferencias en la cinética enzimática entre las PEPCs C₃ y C₄ están asociados a cambios en su secuencia aminoacídica. En *Flaveria* y *Alternanthera*, se ha demostrado que la causa más importante para estos cambios en la cinética es una serina en la posición 774 (780 en maíz) en la región C-terminal de la PEPC C₄, donde la PEPC C₃ presenta una alanina (Izui et al., 2004; Westhoff y Gowik, 2004). Esta sustitución se localiza en el sitio de unión de PEP a la enzima y aumenta la eficacia cinética de la misma en la PEPC de

tipo C₄ (Kai et al., 1999; Bläsing et al., 2000; Paulus et al., 2013). También existe un cambio en la posición 438, una arginina (Arg) en la PEPC de tipo C₃ es sustituida por una glicina en la PEPC C₄, lo que afecta a la interacción con los inhibidores, siendo la causa de la mayor tolerancia a los mismos de la PEPC C₄ (Kai et al., 1999; Matsumura et al., 2002; Paulus et al., 2013). Además, dos regiones esenciales caracterizan a la PEPC C₄ entre las posiciones 296 y 437 (301-442 en maíz) y entre las 645 y 966, estando relacionadas con las propiedades de la cinética de saturación para PEP (Svensson et al., 2003; Izui et al., 2004).

5.3. Funciones de la PEPC

En plantas superiores, la PEPC se encuentra en hojas, raíces, semillas y en nódulos (O'Leary, 1982). La presencia de esta enzima en tantos tejidos diferentes, puede justificarse, posiblemente, por su producto final estable, el L-malato, que es usado como fuente de carbono y como poder reductor en diversas rutas metabólicas. Este papel de su producto final sumando a su presencia en casi todos los tejidos, la convierten en una enzima de gran relevancia, que cumple una inmensa diversidad de funciones fisiológicas distintas (Kluge, 1983; Chollet et al., 1996; O'Leary et al., 2011a).

5.3.1. La PEPC en la fotosíntesis de tipo C₄ y CAM

Todos los eucariotas fotosintéticos reducen el CO₂ a través del ciclo de Calvin o ciclo C₃ para formar carbohidratos. La primera reacción de este ciclo están catalizado por la enzima Rubisco, la cual genera un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA), como primer producto estable (Hatch y Slack, 1970). En las plantas C₄ y CAM, se producen nuevas rutas bioquímicas en un ciclo adicional, en el que la PEPC es la enzima clave en la fijación inorgánica del carbono, actuando, así como un mecanismo concentrador del CO₂, y pese a que los mecanismos de cada planta son distintos, los ciclos bioquímicos son parecidos (Osmond, 1978; Hatch, 1987). Estos reducen la fotorrespiración y el gasto energético asociado, aumentando, por tanto, el rendimiento fotosintético y la eficiencia en el uso del agua y los nutrientes (Nimmo, 2000; Edwards et al., 2001).

En plantas C₄ y CAM la primera fase de la asimilación fotosintética del CO₂ está catalizada por la PEPC, que es muy abundante en el citosol de las células del mesófilo de estas plantas. Esta enzima lleva a cabo la reacción de carboxilación en la que se produce un ácido de 4 átomos de carbonos que, posteriormente, es descarboxilado formando una molécula de 3 átomos de carbono y CO₂ libre. Este es el sustrato para la reacción de fijación llevada a cabo por la Rubisco (Gil, 1995; Sage et al., 2012). En las plantas CAM existe una división temporal entre las dos carboxilaciones, mientras que en las plantas C₄ la separación es espacial al suceder ambas reacciones en tipos celulares distintos: las células de la vaina, donde se localiza la Rubisco; y las células del mesófilo, que se encuentra formando una corona concéntrica alrededor de las células de la vaina y es donde se localiza la PEPC. Esta anatomía foliar característica de las plantas C₄ se denomina anatomía Kranz o en corona (Haberlandt, 1914; Sage et al., 2012).

En la ruta C_4 , el oxalacetato es reducido rápidamente a malato por la enzima $NADP^+$ -malato deshidrogenasa en los cloroplastos de la célula del mesófilo, o transaminado a aspartato (asp) en el citosol por la aspartato transaminasa, dependiendo de la especie C_4 . Posteriormente, los ácidos (malato o aspartato) son transportados a las células de la vaina donde son descarboxilados a piruvato o alanina (Ala), liberándose el CO_2 en el interior de estas células. Esta reacción puede ser realizada por tres enzimas distintas que definen los tres tipos fisiológicos de plantas C_4 : la enzima málico dependiente de $NADP^+$ (tipo $NADP$ -ME), la enzima málico dependiente de NAD^+ (tipo NAD -ME) o la PEP-carboxiquinasa (tipo PCK) (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Sage et al., 2012). En el sorgo, la descarboxilación del malato la realiza la enzima málico dependiente de $NADP^+$. El CO_2 liberado es fijado por la Rubisco, y el piruvato regresa a los cloroplastos de las células del mesófilo para regenerar el aceptor primario, el PEP, por acción de la piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) (Fig. 19).

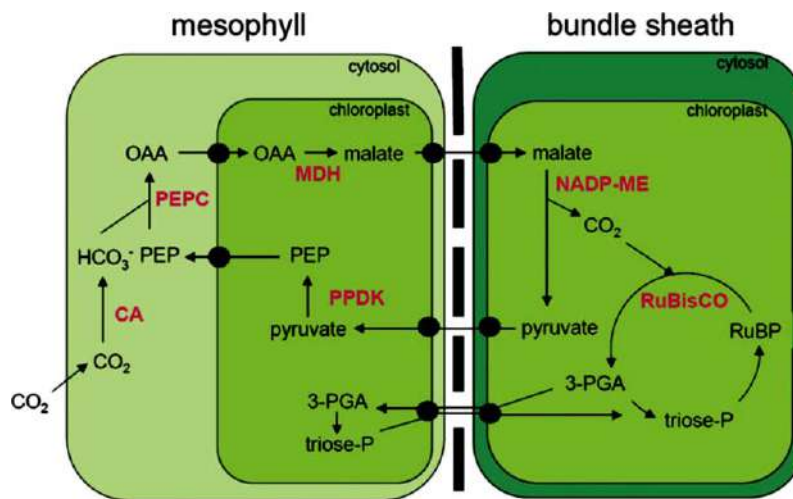


Figura 19. Representación de la vía fotosintética C_4 de tipo $NADP$ -ME. El CO_2 entra en la célula del mesófilo y genera HCO_3^- a través de la anhidrasa carbónica en el citosol. La PEPC cataliza la reacción entre ion bicarbonato y el PEP, formando un ácido de cuatro carbonos (C_4), el oxalacetato (OAA). Éste es convertido en malato (ácido C_4) por la enzima málico deshidrogenasa (MDH) y es transportado a la célula de la vaina. Allí, el malato es descarboxilado por la $NADP$ -ME y el CO_2 liberado es fijado en el ciclo de Calvin. El piruvato (ácido C_3), producido en la descarboxilación del malato, es transportado de nuevo a la célula del mesófilo para regenerar el PEP (Kajala et al 2011).

Estas modificaciones en el metabolismo fotosintético otorgan a las plantas C_4 un conjunto de características que se denomina síndrome Kranz. Entre estas, cabe destacar: bajos niveles de fotorrespiración, un punto de compensación de CO_2 mínimo, una menor sensibilidad de la fotosíntesis a las variaciones en las concentraciones de O_2 y CO_2 e insaturación de las tasas fotosintéticas por la intensidad lumínica en condiciones naturales. Además, sus enzimas tienen elevados óptimos térmicos y son plantas con una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno y del agua en comparación con las plantas C_3 (Gil, 1995).

En el metabolismo fotosintético CAM, la fijación del CO_2 atmosférico y/o respiratorio en el citosol catalizada por la PEPC es llevada a cabo durante la noche, cuando la evotranspiración es baja. El ácido málico, producto final de la reacción, es almacenado en la vacuola. Por el día, los estomas se encuentran cerrados y la Rubisco fija el CO_2

generado por la descarboxilación del ácido málico que había sido sintetizado por la PEPC durante la noche (Borland y Taybi, 2004). El cierre estomático durante el día hace que estas plantas presenten una altísima eficiencia en el uso del agua.

5.3.2. La PEPC en otros contextos fisiológicos

La PEPC tiene una baja K_m por el sustrato bicarbonato (en el rango de μM), por lo que interviene, como norma general, en la economía de carbono de la célula, participando en una multitud de procesos fisiológicos (O'Leary et al., 2011b): el movimiento estomático (Outlaw, 1990), la absorción y transporte de iones en las raíces y la homeostasis del pH celular y (Ben-Zioni et al., 1970). Además, participa en la fijación del nitrógeno atmosférico en las leguminosas, en la interacción del tubo polínico y el estilo, en la maduración y germinación de la semilla y en la maduración del fruto (Chollet et al., 1996; Echevarria y Vidal, 2003; Izui et al., 2004; O'Leary et al., 2011a; Ruiz-Ballesta et al., 2014, 2016). También tiene una función anaplerótica, puesto que permite la reposición de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) o ciclo de Krebs, siendo especialmente importante cuando la demanda de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos es elevada (Huppe y Turpin, 1994; Sweetlove et al., 2010). Dicha función tiene especial relevancia en los tejidos no fotosintéticos (Latzko y Kelly, 1983), tanto en plantas C_3 como C_4 (Giordano, 2001). Los ácidos orgánicos que se producen en el ciclo de Krebs se transportan desde la mitocondria al estroma del cloroplasto o al citosol para la asimilación de NH_4^+ en el ciclo GS/GOGAT durante la síntesis de aminoácidos. Esto reduce la tasa de regeneración de oxalacetato y/o malato en la mitocondria, siendo aquí donde la PEPC jugaría uno de sus importantes funciones (Champigny y Foyer, 1992).

En la reducción del nitrato, la actividad PEPC incrementa el contenido de ácidos orgánicos, reduciendo la alcalinización y contribuyendo a la homeostasis del pH citosólico. Cabe añadir que el oxalacetato, producto de la PEPC, puede ser utilizado para transportar al citosol el poder reductor requerido por la nitrato reductasa (NR), a través de la bomba oxalacetato/malato que se encuentra entre el cloroplasto y el citosol (Oaks, 1994). Además, se ha observado una evidente relación entre la actividad PEPC y la actividad glutamina sintetasa, siendo esta última regulada por la glutamina (Gln) (Dever et al., 1995), y la expresión de la PEPC coordinada con la NR (Müller et al., 2001). Todo esto muestra una alta coordinación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno y precisamente regulada para mantener una relación adecuada entre estos dos elementos vitales.

Además, la PEPC está implicada en la tolerancia de la planta a distintos tipos de estreses abióticos (**Fig. 20**). Esta enzima interviene en dicha tolerancia de dos formas distintas: permitiendo ajustar el metabolismo a las condiciones ambientales, debido a su función anaplerótica; y/o permitiendo una rápida síntesis de ácidos orgánicos para su secreción a la rizosfera, conservando la eficiencia en el uso del carbono de la planta (O'Leary et al., 2011b). Bajo condiciones de estrés salino o por sequía la PEPC sostiene la biosíntesis de osmolitos compatibles como la prolina que son acumulados durante estos

tipos de estreses en muchos tipos de plantas (Chen et al., 2010b; Arias-Baldrich et al., 2015). Mientras que bajo condiciones de estrés por deficiencia de nutrientes como el hierro o el fósforo o por toxicidad de metales como el aluminio o el cadmio, las plantas exudan grandes cantidades de ácidos orgánicos en cuya síntesis participa la PEPC al facilitar una rápida carboxilación anaplerótica del PEP (**Fig. 20**) (López-Millán et al., 2000; Shane et al., 2013; Arias-Baldrich et al., 2015; Feria et al., 2016; Doshi et al., 2017).

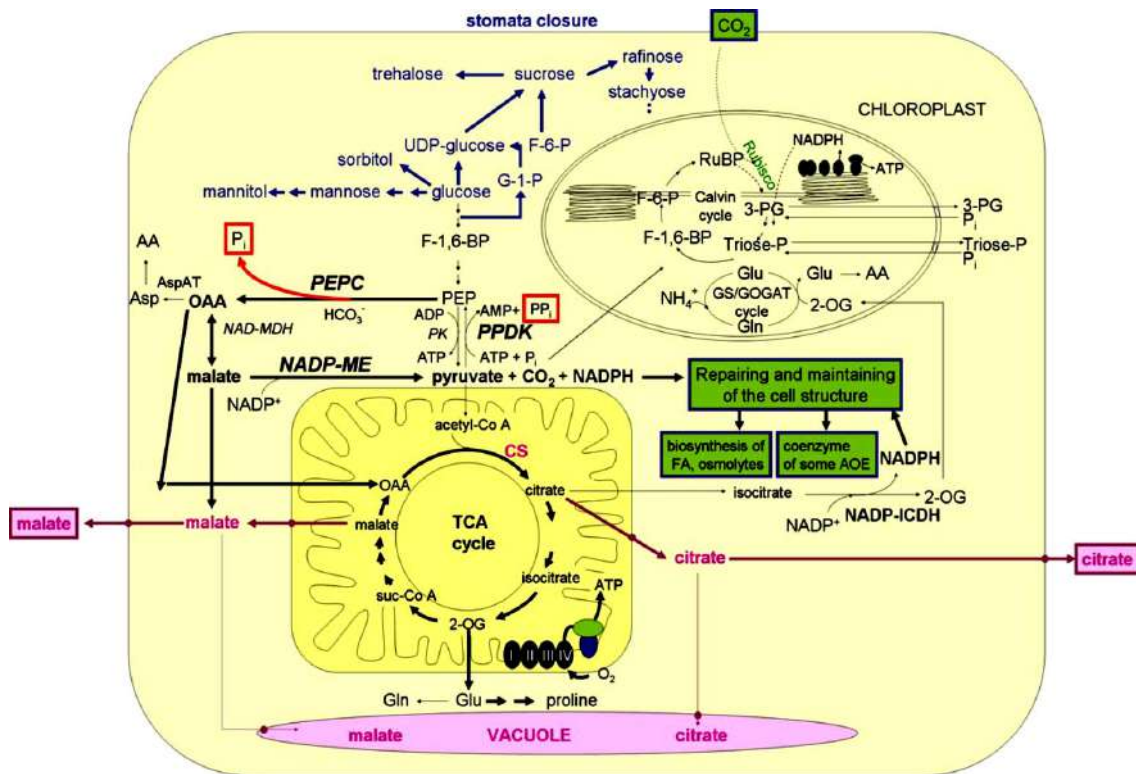


Figura 20. Esquema de las rutas metabólicas clave en la respuesta de las plantas expuestas a condiciones de estrés. El color azul indica las rutas implicadas en la respuesta a estreses que afectan al suministro de agua (sequía, frío, salinidad), donde se sintetizan compuestos osmóticamente activos (sacáridos, aminoácidos, alcoholes de azúcar). El color verde muestra procesos relacionados con el estrés oxidativo causado por ozono o por estrés biótico. Durante estos tipos de estrés, la eficacia fotosintética y la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin disminuyen (flechas de puntos), mientras que la respiración y el requerimiento de NADPH aumentan (flecha negra). La PEPC repone intermediarios del ciclo TCA, la NADP-ME proporciona NADPH, útil para la reparación de daños en las membranas y en la biosíntesis de compuestos como ácidos grasos, ligninas o fitoalexinas. Además, el NADPH sirve como coenzima de enzimas antioxidantes asociadas a la detoxificación (glutación reductasa y monodehidroascorbato reductasa) y el CO₂ podría utilizarse en el ciclo de Calvin. El color púrpura señala las rutas involucradas en la deficiencia de hierro y fósforo y en la toxicidad por aluminio. Estos estreses activan enzimas implicadas en la síntesis de ácidos orgánicos (malato y citrato), incluida la PEPC. La exudación de ácidos orgánicos acidifica la rizosfera, por lo que el fósforo y el hierro pueden pasar a formas más solubles y el aluminio es quelado, formando complejos estables menos tóxicos. El color rojo es específico de rutas importantes en la deficiencia de fósforo. AA, aminoácidos; AOE, enzimas antioxidantes; Asp, aspartato; AspAT, aspartato aminotransferasa; 1,3-BPG, 1,3 bisfosfoglicerato; CS, citrato sintasa; FA, ácidos grasos; F-6-P, fructosa-6-fosfato; F-1,6-BP, fructosa-1,6-bisfosfato; G-1-P, glucosa-1-fosfato; Glu, glutamato; Gln, glutamina; GOGAT, glutamato sintasa; NADP-ICDH, NADP-isocitrato dehidrogenasa; NAD-MDH, NAD-malato dehidrogenasa; NADP-ME, NADP-enzima málico; OAA, oxaloacetato; 2-OG, 2-oxoglutarato; PA, fitoalexinas; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; 3-PG, 3-fosfoglicerato; PK, piruvato quinasa; PPK, piruvato fosfato diquinasa; RuBP, ribulosa-1,5-bisfosfato; Rubisco, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa; suc-CoA, succinil-coenzima A; TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos; triosa-P, triosa-fosfato (Doubnerová et al. 2011).

Diversos trabajos de investigación de nuestro grupo han revelado nuevos datos sobre las funciones de las distintas isoenzimas PEPC en otros contextos distintos de la fotosíntesis. Por ejemplo en la respuesta a la deficiencia de fósforo, la investigación con líneas SALK en *Arabidopsis* carentes de isoenzimas PEPC o fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCk) específicas, ha demostrado que son las isoenzimas PPC3 y PCK2 las que se encuentran más relacionadas con este déficit nutricional (Feria et al., 2016). En salinidad (de la Osa, 2020), en estrés por cadmio (Pérez-López et al., 2021a) y aluminio (Pérez-López et al., 2019) y en estrés por amonio (Arias-Baldrich et al., 2017) así como en déficit de fósforo (Pérez-López et al., 2021b), la actividad PEPC se incrementó en raíces de sorgo, y esa respuesta estuvo específicamente relacionada con la isoenzima PPC3. Esa misma isoenzima presenta una enorme importancia durante el desarrollo y germinación de las semillas de sorgo (Ruiz-Ballesta et al., 2016). En *Arabidopsis* se ha estudiado que la carencia de isoenzimas PEPC específicas altera el metabolismo del carbono y del nitrógeno: provoca la acumulación de nitrato y aminoácidos, y disminuye el contenido de proteínas, reduce el peso de las semillas, retrasa la germinación, reduce intermediarios del ciclo de Krebs y reduce la relación ácidos grasos polinsaturados/no polinsaturados (Sánchez et al., 2015; Feria et al., 2016).

Para que la PEPC pueda intervenir en la respuesta de la planta a los cambios en las condiciones ambientales, se requiere que la enzima se encuentre altamente regulada. Dicha regulación ocurre a nivel transcripcional/traducciona y a nivel postraducciona. Por otro lado, varios estudios demuestran que el suplemento de azúcares exógenos, y el fósforo y el nitrógeno disponibles tienen influencia sobre la cantidad y el estado de la PEPC en diferentes plantas (Duff y Chollet, 1995; Sima et al., 2001; Nakagawa et al., 2003; Rajagopalan et al., 2004; Murmu y Plaxton, 2007; Chen et al., 2008; Feria et al., 2008; Gregory et al., 2009; O'Leary et al., 2011a).

5.4. Regulación de la actividad PEPC

La regulación de la actividad PEPC se lleva a cabo en dos niveles principales, a nivel transcripcional y a nivel postraducciona.

5.4.1. Regulación transcripcional

Transcripcionalmente, la PEPC es regulada por diversos factores, uno de los principales y más estudiados es la luz. Esta respuesta presente en plantas C₄ (Thomas et al., 1990; Lepiniec et al., 2003) y también en plantas C₃ (Matsuoka y Yamamoto, 1989) se encuentra mediada por el fitocromo y se produce en la transición de planta etiolada a planta verde. La luz también afecta a la fluctuación circadiana de los niveles de ARNm de PEPC, aunque estos no afectan a la cantidad de proteína. (Thomas et al., 1990). En la planta CAM facultativa *Mesembryanthemum crystallinum* L., el fitocromo participa también en la regulación de la expresión de la PEPC (Cushman y Bohnert, 1999). Otros factores ambientales, como el estrés hídrico, la temperatura, la salinidad o la aplicación exógena de ABA, aumentan la expresión de PEPC en dicha planta (Herppich et al., 1992).

En sorgo, factores ambientales como estrés hídrico, salinidad o estrés por amonio incrementan la expresión de genes *PPC* (Arias-Baldrich et al., 2017; Buchanan et al., 2005). Incrementos similares han sido descritos también en plantas C_3 como en la cebada (*Hordeum vulgare*) donde el estrés salino y el ABA estimulan la actividad PEPC (Popova et al., 1995). En plántulas de trigo (*Triticum aestivum*), el estrés por LiCl, la salinidad, la hipoxia o el frío aumentan la expresión de genes *PPC* en raíces (González et al., 2003). En *Arabidopsis*, la deficiencia de P y la salinidad incrementan la expresión de *PPC*, sobre todo en las raíces (Feria et al., 2016). Además, el estrés por metales induce la expresión de estos genes. Esto se ha descrito para el aluminio en maíz (*Z. mays*) (Xu et al., 2018b), judías (*P. vulgaris*) (Eticha et al., 2010) y soja (*G. max*) (Ermolayev et al., 2003; You et al., 2011) y el cadmio, en *A. thaliana* (Willick et al., 2019), en plántulas de judías (Gouia et al., 2003) y de trigo (Abdel-Latif, 2008) y en raíces de maíz (Nocito et al., 2008).

5.4.2. Regulación postraducciona

Regulación alostérica

La mayor parte de las PTPCs son reguladas alostéricamente por una gran variedad de metabolitos, aunque sus propiedades cinéticas y alostéricas dependen de cada isoenzima. Las PTPCs de dicotiledóneas son activadas por glucosa-6-fosfato e inhibidas por malato o aspartato, especialmente a valores de pH del orden de 7,1 - 7,3 próximos al pH citosólico (Andreo et al., 1987; Echevarria et al., 1994). La glucosa-6-fosfato aumenta la V_{max} de la PEPC, disminuyendo la K_m para el PEP y la sensibilidad al malato (Echevarria et al., 1994). La interacción con los inhibidores puede realizarse en puntos diferentes de la enzima dando lugar a diferentes tipos de inhibición en función del pH, de la concentración y del estado de fosforilación de PEPC (Andreo et al., 1987; Echevarria et al., 1994; Duff y Chollet, 1995). En monocotiledóneas también son activadores alostéricos aminoácidos neutrales como glicina, alanina y serina (Nishikido y Takanashi, 1973; Stiborova y Leblova, 1985; Garson y Gray, 1991; Bandarian et al., 1992; Tovar-Méndez et al., 2000; Izui et al., 2004; Güémez-Toro et al., 2012). Recientemente se ha descrito que esta interacción ocurre en una región próxima al sitio de unión de la glucosa-6-fosfato, y que interactúa a la vez con dos subunidades de un dímero dentro del tetrámero. Eso ocurre únicamente en la PEPC C_4 de plantas monocotiledóneas y permite alcanzar los mismos niveles de actividad que con la glucosa-6-fosfato, e incluso tiene mayor capacidad de reducir los efectos inhibitorios del malato que ésta (González-Segura et al., 2018). Por el contrario, la PEPC de *E. Coli*, tiene una regulación más compleja. Es activada por acetil-coenzima A, fructosa-1,6-bisfosfato, ácidos grasos de cadena larga y guanosina-3'-difosfato-5'-difosfato, e inhibida por aspartato o malato (Izui et al., 1981, 2004). Tanto la PEPC de clase 2 como las BTTPCs presentan propiedades diferentes, siendo menos sensibles a los inhibidores alostéricos comparando con la PEPC de clase 1 (O'Leary et al., 2009, 2011a; Ting et al., 2017).

La afinidad de la enzima por el PEP y el Mg_2^+ es notablemente mayor a un pH entre 7 y 8, siendo óptimo *in vitro* a un pH 8 (Gadal et al., 1996; Osuna et al., 1996). *In vivo*, la actividad enzimática depende del balance de efectores negativos y positivos y de la

modulación del pH del citosol (Gadal et al., 1996). La mayoría de factores que intervienen en la regulación de la PEPC son opuestos a los efectos negativos del malato y el aspartato (Jeanneau et al., 2002b). Además, la PEPC podría ser regulada por reacciones de oxidación-reducción (Iglesias y Andreo, 1984; Chardot y Wedding, 1992) debido a la gran cantidad de cisteínas, algunas muy conservadas, en todas las PEPCs (Chollet et al., 1996). Sin embargo, aún no se ha descrito ninguna cascada de óxido-reducción implicada en la regulación de la PEPC.

Regulación por monoubiquitinación, por ácido fosfatídico y por óxido nítrico

La monoubiquitinación de la PEPC fue descrita en semillas de ricino en germinación. La unión de la molécula de ubiquitina a la subunidad de PEPC incrementa su peso molecular de 107 a 110 kDa, algo observable en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Uhrig et al., 2008b). Además, se ha localizado PEPC monoubiquitinada en hojas y flores de ricino (O'Leary et al., 2011a), en hojas, raíces y semillas en germinación de *Arabidopsis* (O'Leary et al., 2011b; Figueroa et al., 2016), en semillas en germinación y en raíces de sorgo (Nhiri et al., 2000; Ruiz-Ballesta et al., 2014, 2016; Arias-Baldrich et al., 2017) y en semillas en desarrollo y germinación de otros cereales, como el trigo o la cebada (González et al., 1998; Fera et al., 2008). En definitiva, se ha encontrado PEPC monoubiquitinada en una amplia diversidad de órganos y tejidos, así como en diferentes contextos fisiológicos, aunque, pese a ello, su función fisiológica no se conoce totalmente.

En semillas de ricino y en raíces con proteoides de *Hakea prostrata* la monoubiquitinación de PEPC está asociada a una inhibición de su actividad (O'Leary et al., 2011b). Sin embargo, en semillas de sorgo se ha descrito un patrón definido de monoubiquitinación de la PEPC durante la germinación, sin guardar una relación con los niveles de actividad PEPC (Ruiz-Ballesta et al., 2016). Esta monoubiquitinación tiene lugar en las lisinas (Lys) 630 y 624 de las isoenzimas SbPPC2 y SbPPC3, respectivamente (Ruiz-Ballesta et al., 2014, 2016). También se ha descrito un aumento de la monoubiquitinación en raíces de sorgo como respuesta al estrés por amonio, condiciones en las que también aumenta la actividad PEPC (Arias-Baldrich et al., 2017).

En 2004, el grupo de Christa Testerink mostró por primera vez interacciones específicas entre el ácido fosfatídico (PA) y distintas isoenzimas de PEPC en cultivos celulares de *Arabidopsis* y tomate (*S. lycopersicum*) (Testerink et al., 2004; Testerink y Munnik, 2005). Posteriormente, se pudo asociar una mayor unión del PA a la PEPC como respuesta a estreses ambientales, como el estrés hipoosmótico o el elicitor fúngico xilanasa a los que se expusieron las células (Zhang et al., 2005). Más tarde, se describió que el PA también se une a la PEPC C₄ de sorgo, provocando su inhibición independientemente de su estado de fosforilación, del pH o de la presencia de metabolitos reguladores o de PEP (Monreal et al., 2010a). Además, se observó que la PEPC estaba presente en la fracción de membrana y que se encontraba parcialmente proteolizada, debido a que el PA induce la exposición del C-terminal de la PEPC al exterior de la misma, activando un mecanismo de degradación a través de una cisteín-proteasa, aún no

identificada (Gandullo, 2010, 2019; Monreal et al., 2010a), por tanto la interacción de PA con PEPC estaría relacionada con su degradación proteolítica.

En plantas de arroz transgénico que sobreexpresan la PEPC C₄ de maíz se produce un aumento de la actividad PEPC al tratar con donadores de óxido nítrico (NO) (Chen et al., 2014). Posteriormente, en este mismo arroz transgénico, se describió que el NO está implicado en la regulación de la PEPCk y de la PEPC en la respuesta a estrés hídrico, aumentando la expresión de ambas, lo que se traduce en un aumento de la actividad PEPC (Qian et al., 2015; Liu et al., 2017). Algo similar ha encontrado nuestro grupo en condiciones de estrés salino en sorgo, donde la salinidad induce la producción de NO en las células del mesófilo, afectando a la estabilidad de la PEPCk y aumentando su actividad e incrementando la expresión. Al tratar la planta con 2-(4-carboxifenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO), un eliminador de NO, el efecto sobre la PEPCk se revierte, confirmando la regulación por NO (Monreal et al., 2013b).

Regulación por fosforilación reversible

La regulación por fosforilación reversible de la PEPC se describió por primera vez en la planta CAM *Bryophyllum fedtschenkoi* (Nimmo et al., 1984), y más tarde en maíz (Budde y Chollet, 1986) y en sorgo (Guidici-Orticoni et al., 1988). Todas las PTPCs son reguladas por fosforilación reversible en un residuo de serina del extremo N-terminal. Esta serina fosforilable se localiza en el motivo E/DR/KxxS*IDAQL/MR, presente en todas las PTPCs, pero no en las BTPCs (Chollet et al., 1996; Kai et al., 1999; Lepiniec et al., 1994; Sánchez y Cejudo, 2003; O'Leary et al., 2011b). La fosforilación es realizada por una pequeña proteína quinasa que se conoce como fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCk), de las que existen distintas isoformas dependiendo de la especie vegetal. La fosforilación induce una mayor actividad enzimática puesto que disminuye la sensibilidad de la PEPC a los inhibidores alostéricos y aumenta su afinidad por el PEP y la sensibilidad a los activadores (Echevarría y Vidal, 2003; Nimmo, 2003). En el caso de la PEPC C₄ de sorgo, su fosforilación produce un efecto débil sobre su K_m pero llega a duplicar su V_{max}, aumenta siete veces la K_i para el inhibidor malato y 4,5 veces la K_a para la glucosa-6-fosfato en condiciones de pH y concentración de PEP subóptimos (Duff y Chollet, 1995; Echevarría et al., 1994).

Además, la PEPC se desfosforila por acción de una proteína fosfatasa de tipo 2A (PP2A) (Carter et al., 1990). Sin embargo, los cambios en el nivel de fosforilación de la PEPC parecen ser resultado de variaciones en la actividad PEPCk, puesto que la actividad PP2A *in vitro* se mantiene prácticamente constante en las transiciones luz-oscuridad (Echevarría et al., 1990).

La fosforilación de la PEPC ha sido investigada mediante mutagénesis dirigida, existiendo diferentes estudios. En una PEPC C₄ recombinante de sorgo se introdujo una carga negativa al sustituir el residuo de serina fosforilable del extremo N-terminal por ácido aspártico, con lo que se obtuvo un efecto similar a la fosforilación de la PEPC, es decir, aumentó la velocidad catalítica y disminuyó la sensibilidad al malato (Wang et al., 1992; Duff y Chollet, 1995; Chollet et al., 1996). También la sustitución de un residuo

básico de lisina, localizado 3 aminoácidos antes de la serina fosforilable por asparagina (Ueno et al., 1997), o la eliminación del péptido N-terminal mediante enteroquinasa en el residuo 33 (Izui et al., 2004), ambos en la PEPC C₄ de maíz, simulan parcialmente el efecto de la fosforilación. En este mismo sentido, también se ha logrado simular la fosforilación generando un cambio conformacional mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido sintético de 20 aminoácidos del extremo N-terminal, que contiene el sitio de fosforilación de la enzima C₄ de hojas de sorgo (Pacquit et al., 1995).

Las isoenzimas no fotosintéticas de la PEPC también están reguladas por fosforilación reversible, de manera similar a las isoenzimas C₄ o CAM (Chollet et al., 1996; Vidal y Chollet, 1997; Gousset-Dupont et al., 2005). Diversos estudios *in vivo* con ³²P han demostrado la fosforilación reversible de PEPC en tejidos donde sólo se encuentran las isoenzimas no fotosintéticas, como por ejemplo en nódulos de raíces de soja (Zhang et al., 1995), semillas de trigo y cebada (Osuna et al., 1996, 1999; Feria et al., 2008), estomas (Du et al., 1997), frutos (Law y Plaxton, 1997) y hojas de trigo de plántulas deficientes en nitrógeno (Duff y Chollet, 1995; Van Quy et al., 1991), e incluso en la planta acuática *Egeria densa* (Casati et al., 2000; Lara et al., 2001).

Además, mediante estudios *in vitro*, se ha logrado detectar la existencia de actividad PEPCk en nódulos de raíces de soja (*G. max*) y alfalfa (*M. sativa*) (Schuller y Werner, 1993; Vance et al., 1994), hojas de trigo (*T. aestivum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Duff y Chollet, 1995; Wang y Chollet, 1993), semillas de cebada (*H. vulgare*) (Feria et al., 2008), semillas en desarrollo de ricino (*Ricinus communis*) (Murmu y Plaxton, 2007; O'Leary et al., 2011b) y en semillas y raíces de sorgo (*S. vulgare*) (Pacquit et al., 1993; Nhiri et al., 2000). Demostrando con esto la similitud de esta actividad quinasa con la de las plantas C₄ y CAM en cuanto a su independencia de Ca²⁺, propiedades cromatográficas y subunidad catalítica (Pacquit et al., 1993; Wang y Chollet, 1993; Duff y Chollet, 1995). En las hojas de las plantas C₃, la actividad PEPCk se encuentra regulada *in vivo* de forma reversible por una compleja interacción entre fotosíntesis y metabolismo del nitrógeno, o por el requerimiento de fotosintatos en los nódulos de raíces fijadoras de nitrógeno (Duff y Chollet, 1995). La iluminación de hojas de plantas C₃ induce la actividad PEPCk, presentando características comunes a la inducción que se produce en plantas C₄ (Duff y Chollet, 1995; Chollet et al., 1996; Li et al., 1996; Gousset-Dupont et al., 2005). Todo esto sugiere la existencia de mecanismos de señalización similares en los dos tipos de plantas.

Del mismo modo que en la PEPC C₄, la fosforilación reduciría la inhibición alostérica de la PEPC. En consecuencia, el control por metabolitos y la modulación por regulación covalente de la enzima en presencia de luz, permiten un control preciso del flujo de esqueletos carbonados a través del ciclo anaplerótico y de la ruta de síntesis de aminoácidos de la familia del aspartato (Gousset-Dupont et al., 2005). En las plantas C₃, la PEPC tiene una función importante en la coordinación del metabolismo del carbono y del nitrógeno. Por tanto, el papel de la fosforilación reversible, en oposición a la inhibición alostérica de la PEPC, puede aplicarse a todo contexto fisiológico en el que la

concentración del metabolito sea alta; en el caso de la PEPC C₃, durante el flujo anaplerótico del carbono (Vidal et al., 2002).

La luz es el principal factor en la regulación de la fosforilación de la PEPC, sin embargo, existen otros factores que contribuyen a la regulación por fosforilación reversible. En plantas CAM, esta fosforilación tiene lugar durante la noche y se encuentra regulada por un oscilador circadiano (Nimmo, 2003). El estrés salino en plantas C₄ (Echevarría et al., 2001), la falta de CO₂ en plantas CAM y el estrés oxidativo (Izui et al., 2004) también pueden controlar la fosforilación de la PEPC. Además de otros estreses abióticos que también inducen la fosforilación de la PEPC como la falta de fósforo (Gregory et al., 2009; Ma et al., 2021) o el estrés por amonio (Arias-Baldrich et al., 2017) o por cadmio (Willick et al., 2019).

6. LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA QUINASA

La fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCK) es una proteína quinasa de serina/treonina que utiliza ATP como donador de fosfato para fosforilar a la PEPC en el residuo previamente mencionado. Perteneció a la familia de las quinasas dependientes de Ca²⁺ y/o calmodulina (superfamilia CDPK-SnRK). Sin embargo, la PEPCK no tiene ningún dominio de unión a Ca²⁺ o secuencia autoinhibitoria, por lo que su actividad es independiente de Ca²⁺ y se encuentra constitutivamente activa. Por tanto, su regulación se lleva a cabo principalmente a través de cambios en la velocidad de síntesis (Jiao et al., 1991; Hartwell et al., 1996, 1999; Echevarría y Vidal, 2003). Las PEPCKs son proteínas pequeñas con una masa molecular de aproximadamente 31 kDa (274, 279 y 284 aminoácidos en *Kalanchoe fedtschenkoi*, *M. crystallinum* y *Arabidopsis*, respectivamente), que presentan una alta especificidad de fosforilación por su sustrato, las PEPCs (Jiao et al., 1991; Hartwell et al., 1996, 1999; Nimmo, 2003).

6.1. Familia génica de la PEPCK: Genes *PPCK*

Las PEPCKs son proteínas con escasa abundancia en los tejidos, por lo que con frecuencia se han estudiado mediante la clonación de su ADNc para la obtención de proteínas recombinantes. Este ADNc codifica secuencias entre 274-307 residuos de aminoácidos con un masa molecular de 31-33 kDa (Nimmo, 2003; Izui et al., 2004).. Hoy se conocen PEPCKs en un gran número de especies vegetales, tales como *Arabidopsis* (Fontaine et al., 2002), soja (Sullivan et al., 2004), *Mesembryanthemum crystallinum* (Taybi et al., 2000) o la leguminosa *Lotus japonicus* (Nakagawa et al., 2003), entre muchas otras. En cada especie suelen existir varias isoformas distintas, cuyos patrones de expresión se relacionan con la función específica que cumplan dichas isoformas (Nimmo, 2003). Las secuencias de las distintas isoformas de PEPCK son bastante diversas, presentando una identidad y una similitud en su secuencia de aminoácidos de, aproximadamente, un 25 % y un 19 %, respectivamente. En contraste, la alta variabilidad se concentra en los dominios IV, V y VIA, mientras que los dominios X y XI están muy conservados y son propios de la PEPCK (Izui et al., 2004).

En *Arabidopsis*, existen dos genes que codifican PEPCK: *AtPPCK1* y *AtPPCK2*, teniendo el primero mayor expresión en hojas (Fontaine et al., 2002; Nimmo, 2003). Por otra parte, en sorgo existen tres genes codificantes de PEPCK: *SbPPCK1*, *SbPPCK2* y *SbPPCK3*. Solo se han caracterizado los dos primeros, puesto que el último se ha descrito por homología de secuencia del genoma de sorgo con los genes *PPCK* de maíz (Paterson et al., 2009). El gen *SbPPCK1*, homólogo a *ZmPPCK1*, se expresa en respuesta a luz en las células del mesófilo fosforilando a la PEPC C₄. El gen *SbPPCK2*, muy similar a *ZmPPCK2* y *ZmPPCK3*, se expresa en las células de la vaina y responde mucho menos a los cambios luz-oscuridad. El gen *SbPPCK3* está filogenéticamente relacionado con el gen *ZmPPCK4* (Shenton et al., 2006; Paterson et al., 2009), y recientemente se ha descrito que este gen se expresa en hojas y raíces de sorgo (Monreal et al., 2013b; Arias-Baldrich et al., 2017).

6.2. Regulación de la PEPCK

6.2.1. Regulación transcripcional

El nivel transcripcional es el principal nivel de regulación de la PEPCK (Hartwell et al., 1999). En plantas C₄, se regula por la intensidad luminosa (Echevarría et al., 1990) a través de una cadena de señalización de la que se conocen numerosos componentes (Giglioli-Guivarc'h et al., 1996; Coursol et al., 2000; Echevarria y Vidal, 2003; Monreal et al., 2010b). El incremento de la actividad PEPCK como respuesta a luz es relativamente lento, en hojas de maíz se alcanza su máxima actividad después de 90 min de iluminación (Echevarría et al., 1990), esto sumado a que este proceso es inhibido por cicloheximida (CHX) sugiere una síntesis de *novoo* de la enzima tras la transducción de señales (Jiao et al., 1991; Bakrim et al., 1992; Hartwell et al., 1999).

En la activación de la PEPCK C₄ por luz interviene la fotosíntesis, puesto que es inhibida en presencia de inhibidores del flujo de electrones en la fotosíntesis (DCMU), de desacoplantes, y también de inhibidores del ciclo de Calvin (Chollet et al., 1996; Vidal y Chollet, 1997; Echevarria y Vidal, 2003). La cascada de señalización que lleva finalmente a la fosforilación de la PEPC implica estos elementos: Es necesaria una intensidad luminosa superior a 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el ciclo de Calvin de las células de la vaina se produce ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) que parece ser la señal que genera la inducción de la PEPCK en plantas C₄ (Giglioli-Guivarc'h et al., 1996). Esta molécula difunde al mesófilo actuando como mensajero intercelular y allí se transporta al cloroplasto en su forma parcialmente protonada. Este transporte implica un bombeo de protones que conduce a la basificación del citosol (Pierre et al., 1992), aunque no se conoce con exactitud el papel de este cambio de pH en la transducción de señales para la síntesis de PEPCK en el mesófilo de plantas C₄. Además, en este proceso interviene la activación de una fosfolipasa C dependiente de inositol (PI-PLC) y la producción de inositol trifosfato (IP₃) (Coursol et al., 2000), lo que conlleva la apertura de los canales Ca²⁺ del tonoplasto y de la membrana plasmática. En la apertura de estos canales, también intervendría una fosfolipasa D (PLD) y el ácido fosfatídico (PA). El aumento del Ca²⁺ activa una quinasa dependiente de Ca²⁺ (CDPK) que, posteriormente, conducirá a la

síntesis de la PEPCK y finalmente, a la fosforilación a la PEPC (Fig. 21) (Giglioli-Guivarc'h et al., 1996; Coursol et al., 2000; Echevarria y Vidal, 2003; Osuna et al., 2004).

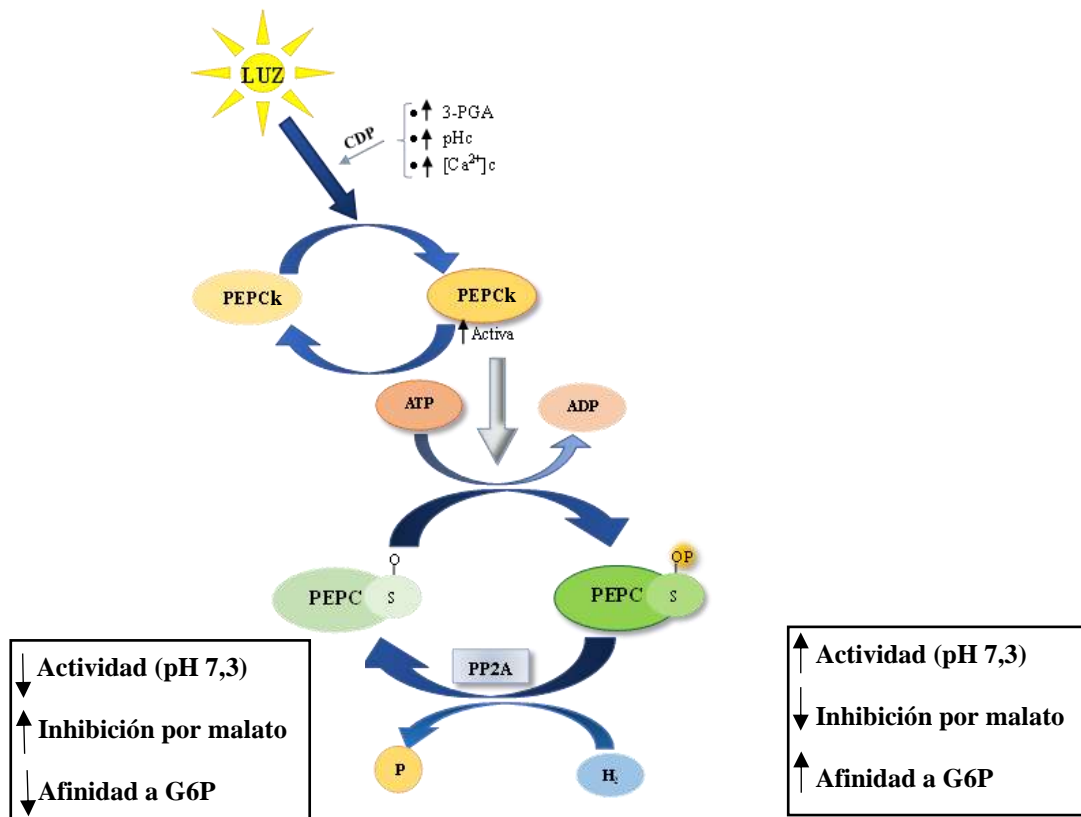


Figura 21. Regulación de la PEPC por fosforilación reversible en plantas C₄. La luz es el principal mecanismo regulador de la síntesis y actividad de PEPCK, al ser regulada por 3-PGA, por el pHc y por el $[Ca^{2+}]_c$, interviniendo también la enzima CDPK. La PEPCK fosforila a la PEPC en una serina en el extremo N-terminal de la proteína produciendo cambios en las propiedades cinéticas y de regulación de la enzima. La desfosforilación de la PEPC la realiza una PP2A. CDPK, proteína quinasa dependiente de calcio; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; pHc, pH citosólico; $[Ca^{2+}]_c$, Ca^{2+} citosólico; PP2A, fosfatasa de tipo 2A; G6P, glucosa 6-fosfato. Adaptado de Chollet et al., 1996.

En plantas CAM existe una cascada de transducción similar a la encontrada en plantas C₄ (Bakrim et al., 2001), aunque en el caso de las plantas CAM existe un control circadiano (Taybi et al., 2000) en el que el malato juega un papel esencial, cosa que no ocurre en las plantas C₄ donde la mayor expresión de PEPCK y la fosforilación de la PEPC C₄ ocurren durante el período de luz (Bakrim et al., 2001). En plantas CAM, durante la noche, el ácido málico es transportado a la vacuola mediante un simporte acoplado a H⁺-ATPasas del tonoplasto (Cushman y Bohnert, 1999), este proceso puede ser el responsable de la basificación del pH citosólico en el mesófilo, lo que induciría la expresión de PEPCK, aumentando la fosforilación de la PEPC. Por el contrario, durante el día, cuando el malato es liberado desde la vacuola al citosol, la expresión y actividad de la PEPCK, y el estado de fosforilación de la PEPC disminuyen (Giglioli-Guivarc'h et al., 1996; Vidal y Chollet, 1997; Coursol et al., 2000). Los metabolitos, como el malato, no solo regulan la síntesis de PEPCK en plantas CAM, sino que también tienen efectos en algunas plantas C₃ y C₄ (Nimmo, 2003).

En plantas C₃, la regulación de la PEPCK es parecida a la de las plantas C₄. Las PTPCs de plantas C₃ también son fosforiladas por la PEPCK en la serina del mismo dominio, y la luz activa la síntesis de ésta. Proceso en el que intervienen también la basificación del citosol, el ciclo del inositol fosfato y el flujo de calcio (Duff y Chollet, 1995; Zhang et al., 1995; Li et al., 1996; Osuna et al., 1996, 1999; Tripodi et al., 2005; Ferial et al., 2016; Murmu y Plaxton, 2007; Shane et al., 2013).

Además, se ha descrito un nuevo mecanismo de control de la expresión de *PPCK*, llamado iniciación alternativa de la transcripción. Este mecanismo ha sido descrito para otros genes en *Arabidopsis* (Lumbreras et al., 1995; Cunillera et al., 1997). Este mecanismo fue descrito en un gen *PPCK* de arroz (*OsPPCK2*). Éste presenta dos transcritos distintos, uno corto (*OsPPCK2-S*) y otro largo (*OsPPCK2-L*). El transcrito *OsPPCK2-S* se detecta siempre y en todos los órganos, indicando funciones básicas en el mantenimiento celular, mientras que *OsPPCK2-L* se detecta en hojas en condiciones de iluminación. Además, la suplementación con nitrato de las hojas induce la expresión de ambos tipos de transcritos y la falta de fosfato induce la expresión del transcrito *OsPPCK2-S*. Esto parece indicar que la iniciación alternativa de la transcripción tiene relevancia fisiológica en esta planta (Fukayama et al., 2006).

Pese a que la luz es el principal regulador de la expresión de *PPCK*, también otros factores, como diferentes tipos de estrés, pueden modificar la expresión y la estabilidad de la PEPCK. En sorgo se ha demostrado que el estrés salino o el estrés por amonio aumentan la expresión y la estabilidad de la PEPCK (Monreal et al., 2007a, 2007b, 2013a; Arias-Baldrich et al., 2017).

Nuestro grupo ha encontrado que la salinidad causa un gran aumento de la actividad PEPCK en hojas de sorgo (Echevarría et al., 2001; García-Mauriño et al., 2003). Este fenómeno podría estar implicado en la economía del carbono por el reciclaje del CO₂ respiratorio, puesto que en condiciones de estrés salino se produce una reducción drástica en el aporte fotosintético de carbono, como consecuencia del cierre estomático provocado por la salinidad. Una parte del aumento de la actividad PEPCK está asociado a una disminución en la degradación de la proteína, lo que se relaciona con un control negativo de la vía ubiquitina-proteosoma ejercido por el ABA (Monreal et al., 2007a; Ferial et al., 2008). Algunos de sus efectos sobre las células oclusivas de los estomas están regulados por NO (García Mata y Lamattina, 2001). El estrés salino incrementa el NO en el mesófilo, y dicho aumento se relaciona con la menor degradación de la PEPCK encontrada en dichas condiciones (Monreal et al., 2013b).

6.2.2. Regulación postraducciona

Pese a que el principal mecanismo de regulación se centra en la síntesis/degradación de la PEPCK, existen otros agentes que regulan la actividad de esta enzima. Su actividad se ve afectada por el pH, siendo su óptimo *in vitro* de 8 (Echevarría et al., 1994; Chollet et al., 1996). También se ve afectada indirectamente por metabolitos, como el malato, que inhibe la fosforilación de la PEPC (Echevarría et al., 1994; Chollet et al., 1996; Bakrim et al., 1998; Echevarría y Vidal, 2003) o la G6P, que revierte dicha inhibición (Echevarría

et al., 1994), aunque estos cambios se deben a cambios conformacionales de la PEPC provocados por esos metabolitos (Echevarria et al., 1994; Chollet et al., 1996; Bakrim et al., 1998; Echevarria y Vidal, 2003). Además, la PEPCK podría estar regulada mediante su fosforilación en el extremo C-terminal por una CDPK todavía desconocida (Monreal et al., 2013b).

También existe un inhibidor proteico, de unos 100.000 kDa, de la PEPCK, que ha sido aislado en hojas de plantas C₄ (maíz) y CAM (*K. fedtschenkoi*). Esta proteína interactúa directamente con la PEPCK, provocando una inhibición reversible. Aunque no es un elemento esencial en la regulación luz/oscuridad ni circadiana de la PEPCK, parece que interviene en inhibir los niveles basales de actividad PEPCK presentes en oscuridad en plantas C₄ y en luz en plantas CAM (Nimmo et al., 2001). Además, en PEPCK purificada de maíz se ha encontrado una posible regulación redox, fenómeno que también se ha encontrado en *F. trinervia*. La PEPCK se inhibiría en condiciones oxidativas, mientras que se reactivaría por una reducción mediada por tioredoxina (Saze et al., 2001). Otro mecanismo de regulación de la fosforilación de la PEPC por PEPCK podría estar asociado a la propia interacción entre la PEPCK y la PEPC, debido a la existencia de un sitio secundario de interacción, encontrado en el extremo C-terminal de la PEPC y cuya presencia es necesaria para que se dé la fosforilación de la PEPC (Li et al., 1997; Álvarez et al., 2003).

6.2.3. Regulación de la degradación

Aún no existe un amplio conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la cantidad de PEPCK y existen pocos trabajos que estudien la degradación de esta proteína. Utilizando ensayos de actividad PEPCK *in vitro* con ³²P-ATP, se han logrado revelar dos especies moleculares de PEPCK con diferente peso molecular: 30 y 37 kDa, en plantas como maíz (*Z. mays*), tabaco (*N. tabacum*) o soja (*G. max*) (Li y Chollet, 1993, 1994; Li et al., 1996; Zhang y Chollet, 1997; Agetsuma et al., 2005). Sin embargo, de todos los genes *PPCK* identificados ninguno codifica una proteína de 37 kDa. La detección de una proteína de este tamaño podría estar asociada a una modificación covalente de la PEPCK de 30 kDa, por ejemplo, por la unión de la ubiquitina (76 aminoácidos, 6 kDa), lo que indicaría que la PEPCK podría degradarse por la ruta proteolítica del proteosoma 26S. En este sentido, Agetsuma et al., (2005), utilizando una PEPCK recombinante de *F. trinervia* expresada en *E.coli*, sugieren que la PEPCK podría ser degradada vía ubiquitina-proteosoma. Asimismo, nuestro grupo ha descrito la regulación de la actividad PEPCK mediante el control de la degradación de la PEPCK mediado por ABA, este disminuye la velocidad de la degradación de la PEPCK (Monreal et al., 2007a).

7. LA PEPC Y PEPC_k EN EL ESTRÉS ABIÓTICO

7.1. Estrés por metales y por falta de fósforo

Las respuestas de las plantas frente al estrés por metales (cadmio y aluminio) y por deficiencia de fósforo tienen en común la síntesis y secreción a la rizosfera de ácidos orgánicos, siendo este proceso en el que la enzima PEPC jugaría un papel importante (Begum et al., 2009; López-Arredondo et al., 2014; Willick et al., 2019). Estos ácidos orgánicos cumplen funciones distintas en ambos tipos de estrés, mientras que en el estrés por cadmio y aluminio los ácidos orgánicos actúan como quelantes de los iones metálicos para evitar los efectos tóxicos de estos (Kochian et al., 2015; Bali et al., 2020); en el estrés por deficiencia de P los ácidos orgánicos aumentan la solubilización de éste (López-Arredondo et al., 2014).

7.1.1. Estrés por cadmio y aluminio

La síntesis de ácidos orgánicos como respuesta a la presencia de metales biodisponibles como el cadmio y el aluminio es común en una gran diversidad de plantas [*Oryza sativa* (Liu et al., 2007), *Halimione portulacoides* (Duarte et al., 2007), *Arabidopsis thaliana* (Kobayashi et al., 2007), *Glycine max* (Yang et al., 2000; Liao et al., 2006), *Zea mays* (Cheng et al., 2018), *Brassica napus* (Ehsan et al., 2014), *Sorghum bicolor* (de Carvalho Gonçalves et al., 2005), *Triticum aestivum* o *Phaseolus vulgaris* (Kochian et al., 2015)], actuando como quelantes de los iones metálicos tanto en la rizosfera como en el interior de la planta (Rauser, 1999; Sanitá di Toppi y Gabbrielli, 1999; Kochian et al., 2015; Bali et al., 2020). La PEPC juega en este caso un papel relevante en la reposición de los esqueletos de carbono permitiendo la síntesis de estos ácidos de forma más eficiente. En *Arabidopsis* se ha demostrado que el cadmio induce la expresión de *AtPPC1* en hojas y raíces y de *AtPPC3* en raíces, lo que se traduce en un aumento de la actividad PEPC, especialmente en raíces (Willick et al., 2019), resultados similares han sido obtenidos en *Lycopersicon esculentum* (López-Millán et al., 2009), *Oryza sativa* (Huang et al., 2017c), *Zea mays* (Nocito et al., 2008). También se ha encontrado que el aluminio induce la expresión y la actividad PEPC en cultivares tolerantes a este metal de *Glycine max* (Ermolayev et al., 2003; Wang et al., 2016), similares resultados fueron obtenidos en sorgo (de Carvalho Gonçalves et al., 2005) y en maíz (Xu et al., 2018b). Además, la sobreexpresión de la PEPC C₄ en arroz aumenta la tolerancia de éste al estrés por aluminio (Begum et al., 2009).

El incremento en la actividad PEPC como respuesta a los metales no solo está asociado al aumento en su expresión y cantidad, sino también a cambios en su estado de fosforilación. En *Arabidopsis*, el cadmio también induce un incremento de la expresión de *AtPPCK1* y *AtPPCK2* en raíces, demostrando que la fosforilación de la PEPC está involucrada también en la respuesta frente a este metal (Willick et al., 2019). En arroz también se ha encontrado que el cadmio induce a *OsPPCK2* (Huang et al., 2017c). Nuestro grupo ha encontrado que las *PPCK* de sorgo también fueron inducidas por aluminio (Pérez-López et al. 2019).

7.1.2. Estrés por deficiencia de fósforo

La respuesta de la PEPC en la deficiencia de fósforo es común en un gran número de especies vegetales, habiendo sido demostrado el aumento de expresión, actividad y cantidad de PEPC en *Brassica nigra*, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Cicer arietinum*, *Triticum aestivum*, *Lupinus albus*, *Nicotiana sylvestris*, *Lycopersicon esculentum*, *Hordeum vulgare* o *Zea mays* (Duff et al., 1989; Usuda y Shimogawara, 1992; Pilbeam et al., 1993; Johnson et al., 1996; Neumann y Römheld, 1999; Moraes y Plaxton, 2000; Toyota et al., 2003; Uhde-Stone et al., 2003; Peñaloza et al., 2005; Morcuende et al., 2007; Ma et al., 2021).

Bajo la deficiencia de P, la PEPC tiene distintos papeles: La PEPC constituye un bypass metabólico, junto a la malato deshidrogenasa y a la enzima NAD-málico, frente a la piruvato quinasa citosólica (PK_c) limitada por ADP, lo que mantiene el flujo de piruvato al ciclo del TCA; al mismo tiempo permite el reciclaje de Pi obtenido en la reacción catalizada por la PEPC; finalmente, como aspecto más importante y como se ha explicado anteriormente, la inducción de la PEPC está asociada con la síntesis y secreción a la rizosfera de grandes cantidades de ácidos orgánicos (ácido málico y cítrico) para solubilizar el P del suelo (Gregory et al., 2009; Liang et al., 2014; López-Arredondo et al., 2014; Ma et al., 2021).

Además, el aumento de la actividad PEPC bajo el déficit de P no solo está asociado con un aumento de su síntesis, sino también con un incremento de su actividad asociado a un mayor estado de fosforilación de la enzima (Morcuende et al., 2007; Gregory et al., 2009).

En *Arabidopsis*, se ha comprobado que la deficiencia de P además de inducir a *AtPPC1* en hojas y raíces, y de *AtPPC3* en raíces, induce considerablemente la expresión de *AtPPCK1* y 2. Esto tiene como resultado un aumento de la actividad PEPC por incremento de la cantidad y del estado de fosforilación de la misma (Gregory et al., 2009). La fosforilación de la PEPC en respuesta al déficit de P ha sido encontrada también en otras especies como en *Lupinus albus* (Uhde-Stone et al., 2003), en *Hordeum vulgare* (Ma et al., 2021), en *Cucumis melo* (Fita et al., 2012), en *Citrus sinensis* (Yang et al., 2012) o en *Lupinus albus* y *Oryza sativa* (Plaxton y Tran, 2011). En este sentido (Chen et al., 2007) identificaron el factor de transcripción BHLH32, que actúa como un regulador negativo de varios genes inducibles por falta de P entre los que se encuentran *AtPPCK1* y *AtPPCK2*. Sin embargo, en otras especies vegetales proteínas de la familia de BHLH (PTF1) regulan a las PPCK en sentido opuesto, es decir inducen su expresión bajo la deficiencia de P (Liang et al., 2014), como sucede en arroz y maíz (Li et al., 2011; Plaxton y Tran, 2011).

7.2. Estrés salino

La PEPC interviene también en diversas respuestas frente a la salinidad en diversas especies vegetales. Por ejemplo, se ha descrito aumento en los niveles de PEPC en sorgo tratado con sal (Amzallag et al., 1990), en maíz con estrés osmótico (Sankhla y Huber,

1975), en relación con un incremento en el contenido de prolina (Rodríguez-Penagos y Muñoz-Clares, 1999). También se han obtenido resultados similares en cebada (Popova et al., 1995) o en *Aleuropus litorales* (Sankhla y Huber, 1975). Las implicaciones de la PEPC bajo este estrés serían: captura y reciclaje de CO₂ respiratorio, síntesis de malato para mantener un equilibrio de cargas, suministro de esqueletos carbonados para la síntesis de osmolitos compatibles, como la prolina (Liu et al., 2017).

El incremento de la actividad PEPC viene dado también por cambios en su estado de fosforilación. En nuestro grupo se ha comprobado que en las hojas de sorgo aclimatado a estrés salino aumenta la actividad PEPC, siendo más importantes los cambios en el estado de fosforilación de la PEPC y de la actividad PEPCk (Echevarría et al., 2001). Este aumento de la fosforilación y por ende de la actividad de la PEPC conlleva un incremento en la síntesis de malato a partir del CO₂ respiratorio en oscuridad. Este malato es utilizado en el siguiente período de luz, por lo que contribuye positivamente al balance global del carbono de la planta (García-Mauriño et al., 2003). También en nuestro grupo se ha demostrado que en el estrés salino el ABA disminuye la degradación de la PEPCk, permitiendo su acumulación en estas condiciones (Monreal et al., 2007a; Feria et al., 2008), además también la molécula señal NO participaría en el aumento de la actividad PEPCk y de la fosforilación de la PEPC en hojas de sorgo bajo estrés salino (Monreal et al., 2013b).

También la PEPC juega un papel importante en raíces de plantas tratadas con sal. En nuestro grupo se estudiaron *Arabidopsis silvestres* y mutantes Salk de distintas enzimas de PEPC y PEPCk con lo que se logró demostrar que la sal inducía la expresión y la fosforilación de la PEPC, por lo que aumentaba su actividad. En esta investigación se demostró la importancia en concreto de la isoenzima PPC3 frente a la respuesta a salinidad, mostrando que esta enzima era esencial en la síntesis de malato en las raíces como respuesta al estrés salino, respuesta que se daba en la *Arabidopsis silvestre*, pero no en la mutante *ppc3-* (Feria et al., 2016). Una posible razón del aumento de la PEPC y de la síntesis de malato es que éste podría actuar como un osmolito vacuolar (Doubnerová y Ryšlavá, 2011), disminuyendo el potencial hídrico celular y promoviendo por tanto la absorción de agua por parte de la planta. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado también que la PPC3 de sorgo juega un papel esencial en la respuesta a salinidad. Este estrés indujo la actividad PEPC en raíces y además esta actividad pudo asociarse a la expresión de PPC3, puesto que esta respuesta desaparecía en las plantas con el gen *PPC3* silenciado (de la Osa et al., 2022). En este trabajo, se encontró que las líneas con este gen silenciado eran más sensibles al estrés por salinidad, demostrando la importancia de esta isoforma frente al estrés por salinidad en sorgo.

OBJETIVOS

La PEPC es una enzima central en el metabolismo, cuyo papel en la fotosíntesis de plantas C₄ y CAM se encuentra ampliamente estudiado, pero que también presenta otras muchas funciones en distintos tejidos y contextos fisiológicos. Estudios realizados por nuestro grupo han mostrado la importancia de la isoforma PPC3 en el metabolismo no fotosintético, en el crecimiento, en la formación y germinación de las semillas y en la respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico. Así mismo, todas estas funciones hacen que la PEPC se encuentre altamente regulada. Uno de esos mecanismos consiste en las modificaciones postraduccionales, la más conocida de todas es la fosforilación. Ésta es llevada a cabo por la enzima PEPCk. Todo ello nos ha llevado a investigar el papel de la isoforma PPC3 en respuesta a distintos estreses abióticos y caracterizar las funciones de *SbPPCK1-3* en un importante cereal empleado como modelo, el sorgo. En este sentido, se proponen los siguientes objetivos para esta tesis doctoral.

1. Estudiar las respuestas al estrés por metales (cadmio y aluminio) en plantas de sorgo con el gen *SbPPC3* silenciado y evaluar la función de PPC3 en las mismas.
2. Investigar la respuesta de plantas de sorgo con el gen *SbPPC3* silenciado a la ausencia de fósforo o a la presencia de una fuente insoluble de fósforo, determinando el papel de PPC3 en las mismas
3. Obtener plantas de sorgo con los genes *SbPPCK1-3* silenciados mediante la técnica del ARN interferente, confirmar y cuantificar el nivel de silenciamiento logrado de estos genes y conseguir líneas homocigotas para su caracterización
4. Caracterizar las consecuencias del silenciamiento de *SbPPCK1-3* en plantas de sorgo. Estudiar sus efectos sobre el crecimiento vegetativo, y sobre el tiempo de floración y la producción y la calidad de las semillas.
5. Analizar la respuesta a estreses abióticos en las líneas de sorgo con los genes *SbPPCK1-3* silenciados y analizar los efectos del silenciamiento sobre la fosforilación de la PEPC en estas condiciones de estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Material vegetal

La especie vegetal utilizada en este trabajo ha sido el cereal C_4 *Sorghum bicolor* L. Moench (sorgo), cultivar público P898012 (USDA). Este cultivar fue el empleado para la obtención de todas las líneas silenciadas empleadas en esta Tesis: las líneas *Ppc3*, las cuales presentan el gen *SbPPC3* silenciado, obtenidas y descritas en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación (de la Osa et al., 2022), y las líneas *Ppck*, con los genes *SbPPCK1-3* silenciados cuya obtención y caracterización inicial se desarrollan en este trabajo. Todas las líneas silenciadas se han obtenido mediante la técnica del ARN de interferencia (ARNi).

1.1.1. Obtención de la línea transgénica *Ppc3*

La obtención de las líneas *Ppc3* de sorgo se llevó a cabo en colaboración con el Servicio de Transformación de Plantas de la Universidad de Missouri (EEUU), utilizando el vector pFGC161, diseñado para silenciar genes en cereales (Do et al., 2016). El plásmido generado (pFGC161-PPC3) contiene el casete hpARNi en el que se insertó un fragmento de 300 pb (nucleótidos 1260 a 1560 de la región codificante CDS) en la orientación sentido y anti-sentido procedente del gen *SbPPC3* de sorgo (Sb04g008720). Este vector se empleó para transformar los embriones inmaduros de sorgo y generar plantas modificadas genéticamente. Se obtuvieron 14 líneas independientes (T1) que portaban el inserto. En el trabajo de de la Osa et al. (2022), estas 14 líneas fueron clasificadas según el nivel de silenciamiento que mostraban para el gen *SbPPC3* en comparación con las plantas silvestres (WT), siendo la línea *Ppc3-1* la que mostraba mayor nivel de silenciamiento y *Ppc3-14* la que mostraba menor silenciamiento. Para este trabajo de Tesis se han utilizado las 2 líneas que presentaban mayor grado de silenciamiento, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*, que mostraban una reducción en la expresión del gen *SbPPC3* en torno al 90% respecto a la línea WT (de la Osa et al., 2022). Tras 2 eventos de autofecundación, se obtuvieron líneas homocigotas T3 para la presencia del inserto que son las utilizadas en este trabajo de Tesis.

1.1.2. Obtención de la línea transgénica *Ppck*

De forma similar a las plantas *Ppc3*, las líneas de sorgo *Ppck* fueron obtenidas en colaboración con el Servicio de Transformación de la Universidad de Missouri (EEUU), utilizando también el vector pFGC161 (Do et al., 2016). En este caso, se insertó la región codificante (CDS) completa del gen *SbPPCK1* de sorgo (855 pb) en el casete hpARNi en orientación sentido y anti-sentido. Al igual que en el caso anterior, este vector (pFGC161-PPCK) fue empleado para transformar los embriones inmaduros de sorgo y obtener líneas de sorgo modificadas genéticamente. En esta ocasión se lograron obtener 12 líneas independientes de la generación T1, que serían utilizadas para su caracterización y selección de aquellas con un mayor nivel de silenciamiento. Las plantas con un mayor grado de silenciamiento, junto a la WT, fueron autopolinizadas para recolectar semillas homocigotas correspondientes a la T2 y a la T3, generaciones que continuaron siendo caracterizadas.

1.2. Condiciones generales de cultivo hidropónico

Las semillas de sorgo fueron esterilizadas usando lejía con detergente comercial al 50 % (v/v) durante 30 min. Posteriormente, las semillas se lavaron dos veces con agua destilada, seguido de un lavado con una dilución de 10 mM de HCl, y finalmente de seis lavados con agua destilada (Abdul-Baki, 1974). Una vez esterilizadas, las semillas se colocaron en placas de Petri con papel de filtro, previamente esterilizado y empapado en agua destilada estéril, manteniéndose en oscuridad durante 72 h a 25 °C para la germinación de las semillas. Tras este tiempo, las semillas germinadas fueron traspasadas a un sistema hidropónico de Araponic® (Tocquin et al., 2003) usando una solución nutritiva con nitrato como única fuente de N (Hewitt, 1966) y agarosa 0,65 % (p/v) como sustrato en los soportes para semillas. Las plántulas se mantuvieron en este sistema hidropónico durante siete días. Tras este tiempo, las plantas fueron transferidas a botes de polietileno de 1 L con un medio de cultivo determinado y durante un tiempo variable, en función del tratamiento. Las plantas crecieron hidropónicamente bajo un ciclo de 12 h de luz (28 °C, 60% de humedad relativa) y 12 h de oscuridad (20 °C, 70% de humedad) en cámara de cultivo. La intensidad de luz fue de 350 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Las medidas de altura de la planta se realizaron desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más alta. En la medida de la longitud de raíces se midió la raíz más larga. El incremento de altura de la planta o de longitud de las raíces se calculó como la medida en el tiempo final menos la del inicio del tratamiento. El peso fresco (PF) fue medido al finalizar el tratamiento. El peso seco (PS) se calculó secando muestras de hojas y raíces en una estufa a 60 °C durante una semana.

1.2.1. Condiciones de cultivo de cada tratamiento

Tratamiento de estrés por aluminio

Para el tratamiento con aluminio, las plántulas de sorgo de 3 días fueron cultivadas durante 7 días en el sistema hidropónico Araponic®, posteriormente se transfirieron a un cultivo hidropónico en bote de polietileno de 1 L con medio Hewitt (**Tabla 2**; Hewitt, 1966) durante cuatro días. Después de este tiempo, la solución nutritiva fue sustituida por un medio consistente en 1 mM CaCl_2 , 5 μM H_3BO_3 a pH 4,5 sin o con AlCl_3 , para la situación control y el tratamiento, respectivamente (Yang et al., 2000, 2001; Eticha et al., 2010; You et al., 2011; Xu et al., 2018b; Zhou et al., 2018). Este medio, carente de nutrientes, fue empleado para evitar las interacciones entre el aluminio y otras sales como el fosfato, motivo también por el que se realizó un tratamiento de tan solo 48 h, esperando poder observar así únicamente los efectos causados por la toxicidad de este metal y no por deficiencias nutricionales (Kochian et al., 2005). En primer lugar, se utilizó la planta WT y un gradiente de concentraciones de AlCl_3 (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 y 2 mM). Finalmente, se emplearon las plantas WT y las líneas silenciadas (*Ppc3-1* y *Ppc3-2*) sin o con 1 mM de AlCl_3 . En la **tabla 2** se muestra la composición de las distintas soluciones nutritivas. Para los estudios de germinación bajo estrés por aluminio las semillas, una vez esterilizadas, se embebieron en distintas soluciones que contenían 0,5 ó 1 mM AlCl_3 .

Tratamiento de estrés por cadmio

Para el tratamiento con cadmio se emplearon plantas de sorgo de tres semanas. Las plántulas de 3 días, después de siete días en el sistema hidropónico Araponic®, fueron trasplantadas a un cultivo hidropónico en bote de polietileno de 1 L con medio Hewitt (Hewitt, 1966) durante otros siete días. Tras este tiempo, las plantas fueron sometidas al tratamiento de cadmio durante siete días (Zhan et al., 2017), tras el cual se recolectó el tejido (hojas y raíces). En primer lugar, se utilizó únicamente la variedad WT, empleando distintas concentraciones de acetato de cadmio (0, 25, 50 y 100 μM). Finalmente, se utilizaron las plantas WT y las líneas silenciadas *Ppc3-1* y *Ppc3-2* con o sin 100 μM de acetato de cadmio añadido sobre el medio Hewitt empleado en el tratamiento control. En la **tabla 2** se muestra la composición de las distintas soluciones nutritivas. Para los estudios de germinación bajo estrés por cadmio, las semillas, una vez esterilizadas, se embebieron en distintas soluciones que contenían 0,5 o 1 mM acetato de cadmio.

Condiciones de cultivo para la obtención de exudados en los tratamientos de aluminio y cadmio

Semillas de sorgo (WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*) esterilizadas se germinaron durante 3 días en papel de filtro humedecido con agua en placas de Petri en oscuridad. Tras esto, las semillas con una germinación homogénea se trasplantaron a tubos de 50 ml envueltos en papel aluminio que contenían 35 ml de medio Hewitt (1966), donde se mantuvieron durante 5 días. A las plantas tratadas con cadmio se les añadió 100 μM de acetato de cadmio en medio Hewitt, manteniéndose en estas condiciones durante otros 5 días, mientras que las tratadas con aluminio se mantuvieron en medio Hewitt durante ese tiempo. Por último, se sustituyó el medio Hewitt en todos los tubos por un medio control de 1 mM CaCl_2 , 5 μM H_3BO_3 a pH 4,5, añadiendo 100 μM de cadmio o 1 mM de aluminio, para los tratamientos de cadmio o aluminio, respectivamente, y las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante dos días para obtener los exudados radicales liberados durante este tiempo. Finalmente, se recogió y liofilizó el medio de cultivo para la determinación de los ácidos orgánicos exudados por las raíces mediante espectrometría UHPLC-MS, como se indica en el apartado 11, y, además, se recogió el tejido de las raíces para pesar el tejido y medir la actividad PEPC.

Tratamiento de estrés por falta de fósforo

En primer lugar, se realizó un gradiente de concentraciones de fosfato soluble (100, 300, 600 y 1340 μM de NaH_2PO_4) y de fosfato insoluble (50, 150, 300 y 670 μM de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), utilizando como base para el resto de nutrientes esenciales distintos al P el medio de cultivo Hewitt (1966). Finalmente, para el tratamiento por deficiencia de fósforo se usaron tres condiciones distintas: control con medio Hewitt (C), que contenía 1340 μM de NaH_2PO_4 ; sin fosfato (- P), que contenía el mismo medio Hewitt sin NaH_2PO_4 ; y con fosfato insoluble (PCa), que contenía medio Hewitt sin P al que se le añadió 0,67 mM de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fósforo. En todas las condiciones, se emplearon plantas crecidas previamente durante 7 días en el sistema hidropónico Araponic® en medio Hewitt control, que posteriormente fueron trasplantadas a un cultivo

hidropónico en botes de 1 L con cada uno de los tratamientos (C, -P y PCa). En estas condiciones se mantuvieron durante tres semanas, renovando el medio de cultivo cada 7 días. El material vegetal (hojas y raíces) fue recolectado al finalizar el tratamiento. En la **tabla 2** se muestra la composición de las distintas soluciones nutritivas.

Tratamiento de estrés salino

Para los tratamientos de salinidad, la concentración de NaCl se aumentó de forma gradual hasta llegar a una concentración máxima de 257 mM. Para ello, después de siete días en el sistema hidropónico Araponic® con medio Hewitt (1966), las plantas fueron trasplantadas a un cultivo hidropónico en bote de polietileno de 1 L con el mismo medio al que se le añadió 86 mM de NaCl durante 3 días; posteriormente la concentración de NaCl se elevó a 172 mM durante 7 días; finalmente se añadió 257 mM de NaCl, manteniéndose durante 5 días. Al finalizar el tratamiento se recogió el material vegetal (hojas y raíces). En los experimentos que se indica, las hojas cortadas se iluminaron antes de realizar las distintas mediciones. Para esto, las hojas fueron transferidas directamente a una cubeta de 3 ml con 10 mM Tris-HCl pH 8, luego se iluminaron durante 2 h (320 μmol de fotones m⁻² s⁻¹ PAR) o se mantuvieron en oscuridad el mismo tiempo. En la **tabla 2** se muestra la composición de las distintas soluciones nutritivas.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo de sorgo. Composición del medio de cultivo de sorgo (Hewitt, 1966) para la condición control y de los medios empleados para los distintos tratamientos.

Concentración (mM)	Macronutrientes (mM)					Tratamientos (mM)			
	KNO ₃	Ca(NO ₃) ₂	MgSO ₄	NaH ₂ PO ₄	CaCl ₂	AlCl ₃	Cd(CH ₃ CO ₂) ₂	Ca ₃ (PO ₄) ₂	NaCl
	Control	5	5	2	1,34	-	-	-	-
Aluminio	-	-	-	-	1	1	-	-	-
Cadmio	5	5	2	1,34	-	-	0,1	-	-
Sin fosfato	5	5	2	-	-	-	-	-	-
PCa	5	5	2	-	-	-	-	0,67	-
86 mM NaCl	5	5	2	1,34	-	-	-	-	86
172 mM NaCl	5	5	2	1,34	-	-	-	-	172
257 mM NaCl	5	5	2	1,34	-	-	-	-	257
	Micronutrientes (mM)								
	MnSO ₄ ·H ₂ O	CuSO ₄ ·5H ₂ O	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	H ₃ BO ₃	CoSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ MoO ₄	NaCl	FeNa-EDTA	
Control	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	5·10 ⁻²	2·10 ⁻⁴	5·10 ⁻⁵	0,1	0,1	
Aluminio	-	-	-	5·10 ⁻³	-	-	-	-	
Cadmio	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	5·10 ⁻²	2·10 ⁻⁴	5·10 ⁻⁵	0,1	0,1	
Sin fosfato	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	5·10 ⁻²	2·10 ⁻⁴	5·10 ⁻⁵	0,1	0,1	
PCa	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	5·10 ⁻²	2·10 ⁻⁴	5·10 ⁻⁵	0,1	0,1	
NaCl	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	5·10 ⁻²	2·10 ⁻⁴	5·10 ⁻⁵	0,1	0,1	

1.3. Condiciones de cultivo en invernadero

Las plantas de sorgo empleadas para la obtención de semillas se cultivaron en macetas con tierra y crecieron con una temperatura máxima de 28 ° C durante el fotoperiodo (12 h) y mínima de 18 °C durante el periodo de oscuridad. Las semillas secas se recolectaron

pasados 6-7 meses. Para evitar que se produjese el cruzamiento entre las distintas líneas de sorgo, las espigas se cubrieron con bolsas de papel transpirable, de manera que estas se auto-polinizaban.

2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS

Los extractos proteicos de hojas y raíces se obtuvieron homogeneizando 0,1 y 0,5 g de tejido, respectivamente, en un mortero a 4 °C con 0,5 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, glicerol al 5 % (v/v), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM y MgCl₂ 10 mM, suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, quimostatina 16,5 μM y leupeptina 2,2 μM como inhibidores de proteasas, ditioneitol (DTT) 10 mM y fluoruro de potasio (KF) 50 mM. El homogenado se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido es el extracto crudo.

3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La purificación de la PEPC C₄ desfosforilada se realizó a partir de hojas de sorgo de plantas en oscuridad. Se homogeneizaron 20 g de hojas en 100 ml de tampón A, conteniendo Hepes-KOH 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 1 mM, glicerol al 10 % (v/v), PMSF 1 mM, leupeptina 2,2 μM y quimostatina 16,5 μM, a 4 °C. El homogenado se centrifugó a 48.000 g durante 15 min a 4 °C, al sobrenadante se añadió polietilenglicol 8.000 al 8,5 % (p/v). Se mantuvo en agitación 30 min y se volvió a centrifugar a 48.000 g durante 30 min a 4 °C. Al sobrenadante se le volvió a añadir polietilenglicol 8.000 al 20 % (p/v), y se centrifugó como en el paso anterior, conservándose en este caso el precipitado obtenido.

Para la purificación se utilizó un *FPLC NGCTM Chromatoraphy System* (Bio-Rad). El pellet obtenido se resuspendió en tampón B, conteniendo Hepes-KOH 50 mM pH 8 y KH₂PO₄ 5 mM, y la solución resultante fue cargada a 2 ml min⁻¹ en una columna de hidroxiapatito cerámica de tipo II (intercambio catiónico, Bio-Rad) de 10 ml de volumen, pre-equilibrada en tampón B. La columna se lavó con tampón B al que se adicionó 150 mM de NaCl hasta que el valor de absorbancia A₂₈₀ disminuyó al valor basal. Las proteínas que habían sido retenidas en la columna fueron eluidas empleando un gradiente de tampón C que contenía Hepes-KOH 50 mM pH 8, NaCl 150 mM y KH₂PO₄ 0,5 M. Las fracciones correspondientes al pico de actividad PEPC se agruparon y se concentraron mediante centrifugación (4.000 rpm, 10 min) usando columnas de exclusión *Amicon Ultra-15*, con filtro de 100 kDa (Millipore).

A continuación, la muestra se cargó a 1 ml min⁻¹ en una columna de débil intercambio aniónico *Fractogel EMD DEAE (S)* de 10 ml (Merck), pre-equilibrada en tampón D que contenía Tris-HCl 100 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10 % (v/v), PMSF 1 mM, leupeptina 2 μM y quimostatina 16 μM. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal (5 volúmenes de columna) de tampón E, conteniendo tampón D y KCl 1 M. Las fracciones correspondientes al pico de actividad PEPC se agruparon y se concentraron de nuevo en columnas de exclusión *Amicon Ultra-*

15, con filtro de 100 kDa centrifugando 10 min a 4.000 rpm. El concentrado así obtenido se diluyó hasta un volumen final de 5 ml de tampón D, y se cargó a 1 ml min⁻¹ en una columna de fuerte intercambio aniónico *Macro-Prep High Q Support* (Bio-Rad) de 5 ml. Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con un gradiente lineal (5 volúmenes) de tampón E. Las fracciones correspondientes al pico de actividad PEPC se agruparon y se concentraron centrifugando 10 min a 4.000 rpm en una columna de exclusión *Amicon Ultra-15* con filtro de 100 kDa. El sobrenadante obtenido se diluyó hasta un volumen de 1 ml con Tris-HCl 100 mM pH 8. La solución final de PEPC se diluyó al 50 % de glicerol y se conservó a 20 °C hasta su uso.

4. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

4.1. Determinación de la actividad PEPC

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) se determinó utilizando un ensayo acoplado a la enzima malato deshidrogenasa (MDH). La MDH reduce el oxalacetato producido por la PEPC a L-malato con oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), reacción con estequiometría equimolar. Se registró la oxidación del NADH en un lector de placas (Molecular Devices) a 340 nm en 0,2 ml de un medio de reacción que contenía HEPES-KOH 0,1 M pH 8, PEP 2,5 mM, NaHCO₃ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NADH 0,2 mM y 5 U ml⁻¹ de MDH (Echevarria et al., 1994), siendo el coeficiente de extinción del NADH a 340 nm de 6,23 μmol⁻¹ ml cm⁻¹. El ensayo se inició con la adición del extracto curdo o solución que contenía PEPC, y se registró la oxidación del NADH durante 5 min a 30 °C. Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de PEPC que cataliza la carboxilación de 1 μmol de PEP por minuto a pH 8 y 30 °C.

4.2. Determinación de la actividad PEPCK

4.2.1. Actividad PEPCK *in vitro*

La actividad PEPCK se determinó mediante la tinción de proteínas fosforiladas con Pro-Q Diamond. Para ello, un volumen de extracto crudo correspondiente a 50 μg de proteínas se incubó durante 1 h a 30 °C en un medio de reacción formado por Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 20 % glicerol (v/v), MgCl₂ 5 mM, DTT 4 mM, KF 4 mM, EGTA 1 mM y 0,4 U de PEPCK C₄ no fosforilada purificada de hojas de sorgo. La reacción de fosforilación se inició con la adición de 1 mM de ATP. La reacción se detuvo calentando la muestra a 95 °C durante 5 min en presencia de tampón de disociación Tris-HCl 50 mM pH 6,8 glicerol al 10 % (v/v), docecilsulfato sódico (SDS) al 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 100 mM y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v). Las proteínas desnaturalizadas se separaron mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE (apartado 5.1).

En primer lugar, se detectaron las proteínas fosforiladas mediante la tinción de los geles con el colorante fluorescente Pro-Q Diamond (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Para ello, los geles de poliacrilamida se incubaron durante 12 h en solución de fijación, que contenía ácido acético al 10% y metanol al 50%. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua destilada de 10 min cada uno y los geles se incubaron con 10 ml de ProQ Diamond durante 1,5 h en oscuridad. Por último, se realizaron dos

lavados de 30 min cada uno con solución destaining que contenía acetato de sodio 50 mM a pH 4 y acetonitrilo al 20%. Finalmente, se realizaron dos lavados con agua destilada de 5 min de duración cada uno. Todo el proceso fue realizado a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad. Posteriormente, el gel fue revelado en el analizador de imágenes Fuji FLA-5100 (Fuji, Tokyo) utilizando un láser de 532 nm.

Tras la detección de las proteínas fosforiladas, los mismos geles se utilizaron para analizar el contenido total de proteínas. Para ello, los geles se incubaron toda la noche en primer lugar en una solución de SDS al 0,05% (p/v) para retirar el ProQ Diamon unido a los residuos fosfato de las proteínas. Posteriormente, fueron sumergidos en 25 ml de una dilución 1:5000 de SYPRO Ruby (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) en ácido acético al 7,5% (v/v) durante 1 h en agitación y en oscuridad. El gel se lavó con ácido acético al 7,5% y se mantuvo en esta solución hasta su revelado en el mismo analizador de imágenes Fuji FLA-5100 (Fuji, Tokyo) utilizando nuevamente un láser de 532 nm.

Para el análisis y cuantificación de las bandas de los geles de electroforesis revelados en ambas tinciones, se empleó el programa *MultiGauge V3.0* (Fujifilm). El cálculo del ratio ProQ/Sypro se realizó dividiendo la señal detectada para ambas tinciones con dicho programa para cada muestra cargada en el gel. Por último, estos datos fueron relativizados respecto al ratio ProQ/Sypro de la planta WT en condiciones control, otorgándole a ésta un valor del 100 %.

4.2.2. Determinación del grado de fosforilación *in vivo* de la PEPC. Test malato

En este test se estima la sensibilidad (IC_{50}) de la PEPC a su inhibidor alostérico L-Malato. El valor de IC_{50} indica la concentración de L-malato requerida para inhibir al 50% la actividad de la enzima. Para el cálculo de este parámetro, se determinó la actividad PEPC en extractos crudos de hojas en el medio de reacción descrito en el apartado 4.1 en condiciones subóptimas de pH 7,3 y PEP 2,5 mM para hojas o pH 7,3 y PEP 0,25 mM para raíces, en presencia de diferentes concentraciones de L-malato. La IC_{50} se calculó a partir de una gráfica de la actividad de la enzima frente a la concentración de L-malato (Nimmo et al., 1984). En estas condiciones de ensayo, la enzima fosforilada presenta una IC_{50} para el L-malato de 2 a 3 veces mayor que la enzima desfosforilada (Jiao y Chollet, 1991; Bakrim et al., 1992).

4.3. Determinación de actividades enzimáticas

El resto de actividades enzimáticas fueron medidas en el departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad del País Vasco.

Se pesaron 0,1 g de tejido congelado (hojas o raíces) y se homogenizaron en un 1 ml de tampón de extracción que contenía HEPES 50 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 10 mM, Triton-X-100 0,1 %, glicerol 10 % (v/v), albúmina de suero bovino (BSA) 0,05 %, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 0,5 %, y los siguientes inhibidores de proteasas: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, ácido ϵ -

aminocaproico 1 mM y leupeptina 10 μ M (Vega-Mas et al., 2019). Para la medición de la actividad nitrato reductasa (NR), al tampón de extracción se le añadió NiCl_2 4 mM para eliminar la interferencia de los glucósidos cianogénicos presentes en hojas de sorgo (Maranville, 1970). El homogenizado obtenido se centrifugó a 17.000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido constituye el extracto crudo y fue utilizado para la determinación de las actividades enzimáticas.

Las actividades enzimáticas fueron determinadas espectrofotométricamente en un lector de microplacas de 96 pocillos. En este ensayo se midieron las actividades de diversas enzimas: citrato sintasa (CS), aspartato aminotransferasa (AAT), glutamato dehidrogenasa (GDH), glutamina sintetasa (GS), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), málico deshidrogenasa (MDH), nitrato reductasa (NR), enzima NAD-málico (NAD-ME), glutamato sintasa (GOGAT), enzima málico-NADP (NADP-ME), siguiendo el método descrito por Vega-Mas et al. (2019); piruvato kinasa (PK) según Gibon et al. (2004) y aconitasa (ACO) según de Vos et al. (1986). Todas las actividades enzimáticas se cuantificaron utilizando 20 μ l de extracto crudo y 280 μ l de tampón de reacción, incubándose durante 20 min a 30 °C y midiendo la evolución del NAD(P)H a 340 nm, excepto para GS, NR y CS (Vega-Mas et al., 2019). La actividad GS fue determinada por formación de γ -glutamilmmonohidroxanato (γ -GHM) a 540 nm; la de NR por formación de KNO_2 a 546 nm; y la de CS por formación de ácido 5-tiobenzoico (TNB) a 412 nm. En estos casos se usaron los tampones de reacción descritos por Sarasketa et al., 2014.

5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizaron en condiciones desnaturalizantes según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se usaron geles discontinuos con un gel de compactación al 4 % de acrilamida/bisacrilamida (p/v) y un gel de separación al 8 o 10 % acrilamida/bisacrilamida (p/v) para raíces u hojas, respectivamente. Las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C tras añadirle tampón de disociación compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol al 10 % (v/v), docecilsulfato sódico (SDS) al 2 % (p/v), β -mercaptoetanol 100 mM y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v). Los geles se desarrollaron en una cubeta *Mini-Protean[®] Tetra System* (Bio-Rad) con tampón de electroforesis que contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1 % (p/v), con un voltaje de 200 V durante 50 min. Como marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas pre-teñidas de peso moleculares conocidos gTP-bio RGB Prestained Protein Ladder (Bio-Rad) o GangNam Stain[™] Prestained Protein Ladder (INtRON Biotechnology), en los geles destinados a ensayos de inmunoblot, o marcadores SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range (Bio-Rad), para los geles empleados en los ensayos de fosforilación y tinción con ProQ. Estos últimos marcadores contienen ovoalbúmina fosforilada (45 kDa).

5.2. Determinación del contenido de antocianinas

Para cuantificar el contenido de antocianinas en plantas de sorgo, se empleó el protocolo descrito por Mancinelli (1984). Se utilizaron 0,1-0,15 g de raíces o de hojas trituradas en nitrógeno líquido. La extracción de las antocianinas se realizó en 5 ml de tampón de extracción con 1 % (v/v) de HCl en metanol 80 % (v/v) durante 24 h a 4 °C. El sobrenadante se obtuvo tras una centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. La absorbancia de los sobrenadantes se midió espectrofotométricamente a 530 y a 657 nm, longitudes de ondas correspondientes a los picos de absorbancia de antocianinas y de clorofilas, respectivamente. La fórmula $A_{530} - 0,33A_{657}$ fue empleada en las muestras de hojas para eliminar la contribución de la clorofila a la absorbancia (Mancinelli et al., 1974; Mancinelli et al., 1984).

5.3. Cuantificación del contenido de ATP

La extracción de ATP se realizó utilizando 5 ml de HClO₄ 0,6 M por cada gramo de material vegetal (Bukhov et al., 1995). La determinación se realizó empleando 0,1 g de hojas y 0,2 g de raíces triturados en nitrógeno líquido con el molino de bolas MM301 Retsch® biometa. Después de triturar y de añadir el volumen correspondiente de HClO₄, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, el ácido fue neutralizado con K₂CO₃ 2 M en frío, añadiendo 0,75 ml por cada 5 ml de ácido. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue recogido y congelado a -20 °C hasta la determinación del ATP.

La determinación del ATP de las muestras se realizó utilizando el kit Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit (Sigma-Aldrich®). Para cada medición, se realizó una curva de ATP estándar empleando las siguientes concentraciones: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 3,57 · 10⁻⁶, 1,28 · 10⁻⁶, 0,46 · 10⁻⁶ y 0,164 · 10⁻⁶ M de ATP. La ecuación de la recta resultante se usó para calcular la cantidad de ATP de cada muestra. Todas las medidas se realizaron utilizando 300 µl de una mezcla que contenía 100 µl de ATP Assay Mix por cada 10 ml de ATP Assay Mix Dilution Buffer. Esta mezcla fue calentada a 28 °C antes de cada medida. Se añadieron 30 µl del estándar de ATP o de las muestras, midiendo la fluorescencia resultante en el luminómetro Luminoskan TL (LabSystems Oy, Helsinki, Finland).

5.4. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides) se extrajeron y cuantificaron homogenizando 0,05 – 0,1 g de hojas con 5 – 10 ml de acetona al 80 % (v/v) (Lichtenthaler, 1987). El homogenizado se centrifugó a 15.000 g durante 5 min a 4 °C y se midió la absorbancia a 663,2, 646,8 y 470 nm en un espectrofotómetro (modelo Helios α Thermo Spectronic, UV visible), usando acetona al 80 % como blanco.

Las concentraciones de clorofila a, b y carotenoides se calcularon usando las siguientes fórmulas:

$$Cl\ a\ (\mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}) = (12,25 \times A_{663,2}) - (2,79 \times A_{646,8})$$

$$Cl\ b\ (\mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}) = (21,50 \times A_{646,8}) - (5,10 \times A_{663,2})$$

$$Cl a + b (\mu\text{g ml}^{-1}) = (7,15 \times A663,2) - (18,71 \times A646,8)$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g ml}^{-1}) = [(1000 \times A479) - (1,82 \times Cl a) - (85,02 \times Cl b)]/198$$

5.5. Determinación de malondialdehído (MDA)

El nivel de peroxidación lipídica se determinó midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Hodges et al., 1999). La determinación de MDA se realizó a partir de 0,1 g de hoja que fueron homogenizados en mortero con arena usando 2 ml de etanol al 80 % (v/v). El homogenizado se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante. 300 µl de éste se añadieron a 700 µl de solución A [Ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v) y PVPP al 0,01 % (p/v)] y otros 300 µl, a 700 µl de solución B [solución A con TBA al 0,65 % (p/v)]. Las mezclas se agitaron e incubaron a 95 °C durante 30 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 rpm 5 min a 4 °C. La absorbancia del sobrenadante se midió a 440, 532 y 600 nm. El cálculo de la cantidad de MDA se llevó a cabo a partir de estos datos y con los siguientes cálculos:

$$M1 = (A_{532}B - A_{600}B) - (A_{532}A - A_{600}A)$$

$$M2 = (A_{440}B - A_{600}B) * 0,0571$$

$$M3 = [(M1 - M2) / 157000] * 10^6 \text{ nmol MDA ml}^{-1}$$

$$\text{nmol MDA g}^{-1} \text{ peso fresco (PF)} = M3/0,015 \text{ g PF}$$

5.6. Cuantificación del contenido de prolina

La cuantificación de prolina se realizó a partir de 0,1 g de hojas homogenizados en 2 ml de etanol al 80 % (v/v). El homogenizado se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se empleó para determinar el contenido de prolina según el método de Carillo y Gibon (2011). Una alícuota de 50 µl del sobrenadante se añadió a 100 µl de la mezcla de reacción, que contenía ninhidrina al 1 % (p/v) en ácido acético al 60 % (v/v) y etanol al 20 % (v/v). La mezcla fue incubada a 95 °C durante 20 min y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se utilizaron 100 µl de mezcla para la determinar la absorbancia a 520 nm en un lector de placas de 96 pocillos (Molecular Devices). El contenido final de prolina se determinó con los siguientes cálculos:

$$\text{Prolina } (\mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}) = ([A_{520}\text{Muestra} - A_{520}\text{Blanco}]/\text{pendiente}) * (V_{\text{extracto}}/V_{\text{alícuota}}) * (1/\text{PF})$$

- Pendiente = 0,0356 μmol^{-1}
- $V_{\text{extracto}} = 2 \text{ ml}$
- $V_{\text{alícuota}} = 50 \mu\text{l}$
- PF = 0,1 g

5.7. Cuantificación de elementos y de contenido total de fósforo

El análisis de elementos minerales y contenido de P se llevó a cabo en el Servicio de Investigación Agraria del Centro de Investigación y Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Se analizaron muestras de hojas y raíces de la línea silvestre y las líneas silenciadas (*Ppc3-1* y *Ppc3-2*) en condiciones control y sometidas a estrés por cadmio o estrés por falta de fosfato. Las plantas se cultivaron tal y como se recoge en el apartado 1.2.1. En las plantas tratadas con cadmio, se determinaron los elementos: magnesio, calcio, hierro, zinc y cadmio; mientras en las plantas sometidas a deficiencia de fósforo se determinó el contenido de P.

Las hojas y las raíces de cada tratamiento fueron recolectadas, congeladas y trituradas en nitrógeno líquido. Posteriormente, el tejido se secó en una estufa a 60 °C durante una semana.

Las muestras fueron enviadas al Servicio de Investigación Agraria de la US (CITIUS). Allí, 0,25 g de cada muestra fueron mineralizados mediante calcinación en un horno de mufla Carbolite, a 550 °C durante 8 horas. A los crisoles con las cenizas obtenidas se les añadieron 12 ml de HCl 1N, y se calentaron en una placa calefactora durante 15 min para obtener los digeridos de las muestras.

Los metales (Ca, Mg, Fe, Zn y Cd) fueron determinados en las muestras digeridas mediante espectrofotometría de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro iCE 3500 (Thermo Scientific).

Para la determinación del contenido de fosfato se partió de muestras digeridas de la misma forma. La cuantificación de P se llevó a cabo mediante la reacción con molibdato amónico y tartrato antimonil-potásico en medio ácido, según el método colorimétrico descrito por Murphy y Riley (1962), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer) a 880 nm.

5.8. Caracterización de semillas

5.8.1. Determinación de almidón en semillas

El almidón en semillas se cuantificó utilizando 0,1g de semillas secas trituradas. Este material fue digerido por enzimas amilolíticas, y los azúcares producidos por la hidrólisis del almidón fueron cuantificados siguiendo el método de Miller (1959).

5.8.2. Medición de fenoles en semillas

Los fenoles fueron extraídos empleando 0,1g de semillas secas trituradas con 1 ml de metanol al 80% (v/v) en agitación durante 24 h a 4°C. Tras esto, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 15.000 rpm. A continuación, se tomaron 75 µl del sobrenadante, a los que se les añadieron 37,5 µl del reactivo Folin-Ciocalteau (Singleton et al., 1999). Esta mezcla se incubó 10 min en oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 187,5 µl de Na₂CO₃ al 10% (p/v) y se incubó 1 h en las mismas condiciones. Por último, las muestras se centrifugaron 2 min a 15.000 rpm y se midió la absorbancia a 760 nm en el lector de placas (Molecular Devices). La concentración de fenoles se

determinó utilizando una recta patrón realizada con distintas concentraciones de ácido gálico en metanol al 80%.

5.8.3. Cuantificación de fitatos en semillas

Se determinó el contenido de fósforo en forma de fitato en semillas secas. Para esto, se emplearon 0,25g de semillas trituradas. Este material fue incubado en 5 ml de HCl 0,66 M durante 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras esto, se centrifugó 1 ml de esta muestra a 13.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 500 µl del sobrenadante y se mezclaron con 500 µl de NaOH 0,75 M. Posteriormente, se realizó la reacción de desfosforilación empleando el kit de determinación de fósforo Phytic Acid Assay Kit-Analysis, s.f. (Megazyme). Se realizaron reacciones para cuantificar el fósforo libre y el fósforo total de cada muestra siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos casos, el fósforo fue determinado colorimétricamente. Para ello, se tomaron 0,5 ml de muestra y 0,25 ml de una mezcla formada por ácido ascórbico (10% w/v) en ácido sulfúrico 1 M y molibdato de amonio (5 % w/v), en proporción 5/1. La mezcla fue homogenizada e incubada durante 1 h a 40 °C. Finalmente, se tomaron 250 µl de cada muestra y se midió la absorbancia en un lector de placas (Molecular Devices) a 655 nm. La concentración final de fitato se determinó utilizando una recta patrón realizada previamente empleando diluciones con concentración conocida de fósforo y utilizando el mismo método colorimétrico.

5.8.4. Cuantificación de taninos en semillas

Para la determinación de taninos se emplearon 50 mg de semillas trituradas y se utilizó el método de Porter (Porter, 1986). A estas se le añade 1 ml de acetona 70%, se agita y se toman dos muestras de 500 µl, a los que se le añaden 100 µl de sulfato amonio férrico al 2% en acetona y 900 µl de butanol:HCl (95:5). Se agitan en vórtex y se incuban a 100 °C durante 1h. Finalmente, se centrifugan 5 min a 4 °C y 15000 rpm. La absorbancia fue medida en un lector de placas (Molecular Devices) a 550 nm de longitud de onda.

5.8.5. Determinación del peso y el volumen de las semillas

La caracterización del tamaño de las semillas se llevó a cabo utilizando un grupo de 50 semillas para cada muestra. Estas fueron pesadas en grupos de 5 en una balanza de precisión (Precisa XT 220A). Además, se midió el eje longitudinal y transversal de las semillas con un calibre pie de rey digital y se calculó el volumen de las semillas, suponiendo forma esférica.

6. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

6.1. Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos anti-PEPC utilizados en este trabajo de Tesis son anticuerpos policlonales dirigidos contra la totalidad de la proteína PEPC C₄ (SbPPC1) de hojas de sorgo, y fueron producidos en conejo en los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla. La dilución utilizada para su utilización en los ensayos de inmunoblot fue de 1:3000 en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM (TBS).

6.2. Inmunoblot

Una vez finalizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida SDS-PAGE se sumergió durante 20 min en tampón TGM que contenía Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS al 0,037 % (p/v) y metanol al 5 % (v/v). Los polipéptidos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro (GE Healthcare) o a una membrana de PVDF de 0,2 μ m de diámetro de poro (GE Healthcare) mediante un sistema de transferencia de proteínas Trans Blot[®] Turbo[™] Transger System (Bio-Rad). Las transferencias se realizaron durante 20 min a un voltaje constante de 25 V y una intensidad límite de 1,0 A.

Tras la transferencia, la membrana se incubó durante 2 h en agitación continua con tampón TBS suplementado con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) para saturar los sitios de unión inespecífica en la membrana. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS y se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios anti-PEPC durante toda la noche a 4 °C en agitación.

Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces en TBS y Tween-20 al 0,1 % (v/v), y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-conejo (Invitrogen) marcados con peroxidasa. Tras esto, la membrana se volvió a lavar 3 veces con TBS Tween-20 al 0,1 % (v/v) y, finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia con uno de los siguientes kits de revelado: *SuperSignal[™] West Pico PLUS Chemilluminiscent Substrate* (Thermo Scientific) para proteínas abundantes o *WesternBrigh[™] Quantum* (Advansta) para proteínas minoritarias, en el sistema de imagen Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

6.3. Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos anti-PEPC se purificaron a partir del suero sanguíneo de conejo mediante cromatografía con Protein A-Sepharose[®] CL-4B (GE Healthcare) para retener específicamente a las inmunoglobulinas G. La capacidad de retención de la proteína A oscila entre 2 y 15 mg de inmunoglobulinas por cada ml de resina. La columna se preparó resuspendiendo 1 g de proteína A en 4 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 8) y colocándola en una columna cromatográfica de 20 ml (Bio-Rad). La columna se equilibró con tampón fosfato sódico 25 mM pH 7,5 y NaCl 0,9 % (p/v) (PBS). Posteriormente, se añadieron 2 ml de suero sanguíneo a la columna y se lavó con 25 ml de PBS, hasta que la absorbancia a 280 nm se estabilizó en torno a cero. La elución de las inmunoglobulinas retenidas se realizó con tampón citrato 200 mM pH 2,8, recogiendo 6 fracciones de 4 ml cada una a las que se les añadió rápidamente 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 para neutralizar la acidez. Las fracciones con inmunoglobulinas se unificaron y concentraron con sulfato de amonio al 50 % de saturación, centrifugándose a 20.000 g durante 15 min a 4 ° C. El precipitado se resuspendió en tampón B (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 y glicerol al 20% (v/v)). Los anticuerpos recogidos se dializaron durante toda la noche a 4 °C utilizando membranas de celulosa (Sigma). Los anticuerpos se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

7. TÉCNICAS MOLECULARES

7.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído a partir de 50-100 mg de hoja pulverizada congelada utilizando el sistema de columnas i-genomic Plant DNA Extraction Mini Kit (iNtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante, o el método Geejee's. Para este último, el tejido triturado se homogenizó mediante agitación en un vórtex con 900 µl de tampón de lisis STEL, que contenía 100 mM Tris pH 7,5, 2 % SDS y 10 mM EDTA. El homogenizado se incubó a 65 °C durante 20 min, y posteriormente las muestras se enfriaron durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 300 µl de solución de precipitación (10 M de acetato de amonio) y la mezcla se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. 750 µl del sobrenadante obtenido se mezclaron con el mismo volumen de isopropanol, y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70 %, volviéndose a centrifugar. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se secó el pellet y éste se resuspendió en 100 µl de agua MQ.

La cantidad y calidad (relación A_{260}/A_{280}) del ADN se analizó empleando el sistema NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN extraído se conservó a -20 °C hasta su utilización.

7.2. Extracción de ARN

El ARN total se extrajo a partir de 50 – 100 mg de hoja y raíz triturada en nitrógeno líquido. Para la extracción se usó el sistema de columnas *Plant RNA Isolation Mini Kit* (Agilent Technologies), excepto para el tratamiento de deficiencia de fosfato para el que se realizó una extracción de ARN con trizol. En este caso, el tejido pulverizado se homogenizó con 1 ml de *TRIsure*TM (Bioline) y se mantuvo en hielo 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm 10 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante al que se le añadió 200 µl de cloroformo. La mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 12.000 rpm 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa (500 – 600 µl) se recogió en un tubo de centrífuga nuevo y se le añadieron 500 µl de isopropanol, se agitó y se incubó 10 minutos en hielo. Tras esto, se volvió a centrifugar a 12.000 rpm 10 minutos a 4 °C, desechándose el sobrenadante. Por último, se añadió 1 ml de etanol al 70 % (v/v), se centrifugó a 7.500 rpm 5 minutos a 4 °C, descartando otra vez el sobrenadante. El pellet resultante se secó en una centrifuga de vacío *SpeedVac*[®] *SC110* (Savant) y, finalmente, se resuspendió en 20 µl de agua miliQ.

El ARN extraído fue tratada con ADNasa I (Sigma) para eliminar la contaminación por ADN genómico. La concentración de ARN de las muestras se determinó usando un Nanodrop 2000. La calidad de la extracción se evaluó mediante la relación A_{260}/A_{280} , considerando una calidad óptima valores de este ratio entre 1,6-2,0. El ARN obtenido se conservó a -80 °C hasta su utilización.

7.3. Retrotranscripción de ARN a ADNc

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg del ARN total. Para esto se empleó el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) según las indicaciones del fabricante. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo durante 10 min a 25 °C, seguidos de 30 min a 55 °C. Por último, la retrotranscriptasa se inactivó calentando a 85 °C durante 5 min. El ADNc sintetizado se diluyó 5 veces con agua mili-Q y se conservó a -20 °C hasta su uso.

7.4. Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

7.4.1. PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR a tiempo final se realizaron con el kit comercial *2X PCR Master Mix Solution [itaq]* (iNtRON Biotechnology) en un termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% (p/v) con tampón TAE que contenía Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM y EDTA 1 mM, utilizando *RedSafe™* (iNtRON Biotechnology) para visualizar los ácidos nucleicos. Estos geles se desarrollaron a un voltaje constante de 100 V durante 30 min en una cubeta *Gel XL Ultra V-2* (Labnet), y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (MaestroGen).

7.4.2. PCR en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se realizaron en un volumen final de 20 µl consistente en 5 µl del ADNc obtenido previamente, 0,2 µM de cebadores específicos (**Tabla 3**) y 10 µl de *Itaq universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), o de *TB Green Premix ExTaq™ (Tli RNaseH Plus) RR420* (Takara) para las muestras de estrés por déficit de fosfato.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *MiniOpticon™ Real-Time PCR System* (Bio-Rad), y los ciclos umbral (Ct) se determinaron usando el software de análisis *CFX Manager V1.6* (Bio-Rad). Para el estudio del estrés por falta de fosfato se utilizó el termociclador *Real-Time PCR LightCycler® 480 System* (Roche) y los Ct se determinaron mediante el software *LightCycler® 480 SW 1.5* (Roche).

Para la normalización de los valores obtenidos se utilizó como control interno la cantidad de transcrito del gen de actina de sorgo, empleando el método Livak (Livak y Schmittgen, 2001) para el tratamiento de los datos y el cálculo de la expresión relativa. Para validar los cebadores y el programa de amplificación utilizado, se usaron diluciones seriadas de ADNc para la construcción de una recta de eficiencia: $R^2 > 0,98$, imponiendo una eficiencia del 95 – 105 %.

Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo. Las bases subrayadas corresponden a los sitios de corte de las enzimas de restricción SpeI, AscI, SacI y AvrII.

Gen	Nº Acceso	Secuencia	
<i>18S ARNr</i>	M82330	F	5'-GGGGAAACTTACCAGGTCCA-3'
		R	5'-GGATGGCTCCGCATAGCTA-3'
<i>Sbactina</i>		F	5'-TCACCATCGGGCAGAG-3'
		R	5'-GGGAGGCAAGGATGGAC-3'
<i>SbPPC1</i>	Sb10g021330	F	5'-CAGCTTCGTTCCGCGTTCCC-3'
		R	5'-TCGTAGCACTCCTGGACAAATTCG-3'
<i>SbPPC2</i>	Sb02g021090	F	5'-CCGCCTCGCAACACCTGAAACA-3'
		R	5'-ACCGGGAGGTGGAACCGTGT-3'
<i>SbPPC3</i>	Sb04g008720	F	5'-TGTTGAACAGTTTCTGGAACCTCTT-3'
		R	5'-GCTTCACAAGGGCAAGCCAAAAG-3'
<i>SbPPC4</i>	Sb07g014960	F	5'-TGAGCTTCGGGCACAAGCAGATG-3'
		R	5'-GCTCCAAAGGCTCTAAGAAGTCTC-3'
<i>SbPPCK1</i>	Sb04g036570	F	5'-ATGAGCGGCGCCGCGGAGGA-3'
		R	5'-TCAGGCCACCGCCACACTTCC-3'
		attB1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACGGCGCCGCGGAGGAGGCG-3'
		attB2	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAGCTGGGTATCAGGCCACCGCCACACT-3'
<i>SbPPCK2</i>	Sb04g026490	F	5'-CTAGGTAAGAGCATCCCAA-3'
		R	5'-ATACCATACCAGCAGAGGA-3'
		attB1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAGTGCGGAGCTGAAG-3'
		attB2	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGGTTGGCCGCTCGAT-3'
<i>SbPPCK3</i>	Sb06g022690	F	5'-GTGCTTCGGGGCAGCCTCAG-3'
		R	5'-TGGATCCACGGGTGCCGGAG-3'
		attB1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAGTGAGCAACTGAAGCG-3'
		attB2	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGGTTGGCGTTGGCCG-3'
<i>SbIRT1</i>		F	5'-GACCGCAACCTCTTCGT-3'
		R	5'-GGTGGTGAAGGAGAAATCGG-3'
<i>SbIRO2</i>		F	5'-CGGAGATCATGGTTCAGGT-3'
		R	5'-CTTGTTCGAAGGTGGAGT-3'
<i>SbNRAMP1</i>		F	5'-GCATCATCGTGTCCCTCTTAT-3'
		R	5'-CATCGGCAACCTTTGATTTGTC-3'
<i>SbYS1</i>		F	5'-GAAGTACGCGAGGTTTGTG-3'
		R	5'-CAGCCTCCTTCTTGTTCATC-3'
<i>SbPHT</i>		F	5'-GGCCAAGGTGCTCAAGAAG-3'
		R	5'-GGAGGAACTGCACCGAGAAG-3'
<i>PPC3 ARNi</i>		F	5'-ATACTAGTGGCGCGCCATAGCTGACGGAAGTCTT-3'
		R	5'-CCGAGCTCGCCTAGGGCCAAAGCAATCTGCTGG-3'
<i>PPCK ARNi</i>		F	5'-ATACTAGTGGCGCGCCATGAGCGGCGCCGCGGAG-3'
		R	5'-CCGAGCTCGCCTAGGTCAGGCCACCGCCACACT-3'
<i>Waxy</i>		F	5'-GTAGCCGAGTTGGTCAAAGGA-3'
		R	5'-TTCTTGGGTGGCTAGGGGATA-3'
<i>Bar</i>		F	5'-AAACCCACGTCATGCCAGTT-3'
		R	5'-CATCGAGACAAGCACCGTCA-3'
<i>35 S</i>		F	5'-CAGAAGTCCCGTGAAGACT-3'
		R	5'-CGGCAGAGGCAGATCTTGAA-3'

8. MEDIDAS DE INTERCAMBIO GASEOSO

Para la realización de estas medidas el sistema tipo IRGA (analizador de gases en el infrarrojo) utilizado fue el analizador de gases portátil *LI-6400XT Portable Photosynthesis System* de LI-COR® (Evans y Santiago, 2014). Las medidas se realizaron en la hoja más joven totalmente desplegada a una intensidad de 350 mol de fotones m⁻²s⁻¹ PAR. Se calcularon la fotosíntesis neta (A) y el intercambio gaseoso (gs) utilizando las ecuaciones estándar (von Caemmerer y Farquhar, 1981).

9. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA

El estado del aparato fotosintético se estimó en función de los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos con el aparato FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments). Concretamente, se midió el rendimiento cuántico máximo de PSII (Fv/Fm) y el rendimiento de la fluorescencia en ausencia de luz fotosintética (F₀) (Maxwell y Johnson, 2000).

10. OTROS MÉTODOS

10.1. Transformación de plantas mediante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación, selección y crecimiento de embriones hasta la obtención de las semillas T1 se realizó en el servicio de transformación de plantas de la Universidad de Missouri (EEUU) (www.pst.missouri.edu/muptcf). Para obtener las plantas de sorgo genéticamente modificadas mediante la técnica del ARN interferente (líneas *Ppc3-n* y líneas *Ppck-n*), se utilizó el vector de silenciamiento pFGC161 (Do et al., 2016). En esta transformación se empleó la estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y embriones inmaduros de sorgo como material vegetal para ser transformando, siguiendo el método descrito por Do et al. (2018). Semillas inmaduras de panículas de sorgo de entre 11 y 14 días tras la polinización fueron esterilizadas con lejía al 50 % (v/v) durante 15 min. Los embriones inmaduros se aislaron mediante disección manual con una cuchilla estéril y se colocaron en tubos con medio de inoculación (IM) conteniendo *MS Murashige and Skoog salts* (Sigma-Aldrich) 4,3 g l⁻¹, sacarosa 68,5 g l⁻¹, glucosa 36 g l⁻¹, MES 0.5 g l⁻¹, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1.5 ml l⁻¹ y vitaminas B5 10 ml l⁻¹ a pH 5,2. Los embriones inmaduros fueron incubados a 43 °C durante 3 min y se inocularon con *A. tumefaciens* albergando el vector pFGC161-PPC3 o pFGC161-PPCK a 25 °C (Do et al., 2018). Los embriones se mantuvieron 3 días en placas con medio de co-cultivo (Co-M) que contenía MS 4,3 g l⁻¹, sacarosa 20 g l⁻¹, glucosa 10 g l⁻¹, L-prolina 0,7 g l⁻¹, MES 1,5 ml l⁻¹, agar 8 g l⁻¹, ácido ascórbico 10 g l⁻¹, polivinilpirrolidona (PVPP) 10 g l⁻¹, vitamina B5 10 ml l⁻¹, acetosiringona (AS) 0,0196 g l⁻¹, pH 5,8. Finalmente, los embriones se transfirieron a placas con medio de descanso (R) que contenía MS 4,3 g l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, L-prolina 1 g l⁻¹, MES 0,5 g l⁻¹, 2,4-D 1,5 ml l⁻¹, agar 8 g l⁻¹, PVPP 10 g l⁻¹, vitamina B5 10 ml l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g l⁻¹, cefotaxima 400 mg l⁻¹, 10 μM CuSO₄ a pH 5,8 durante 10 días antes de la inducción de callos.

10.2. Inducción de callos y plántulas

La inducción de callos se llevó a cabo transfiriendo los embriones a placas con medio de inducción de callos (CIM), conteniendo medio de descanso R con cefotaxima 300 mg l⁻¹ y glufosinato de amonio (BASTA®) 0,625mg l⁻¹ para la selección de las plantas transformadas, durante 10 días en oscuridad.

Tras ese tiempo, las primeras hojas se cortaron y los callos se transfirieron a placas con medio de inducción de hojas (SM), conteniendo CIM sin KH₂PO₄, pero con 6-benzylaminopurina (BAP) 1 g l⁻¹ y ácido indolacético (IAA) 1 mg l⁻¹. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 24 °C, con una intensidad de luz 80 μmol m⁻²s⁻¹ PAR para inducir la formación de hojas. Cada 2 semanas se realizaron subcultivos de callos usando SM fresco durante 6-10 semanas. Cuando presentaban 3-4 hojas sanas, se transfirieron a cajas estériles con medio de enraizamiento (RM) que consistía en CIM sin KH₂PO₄, pero con ácido indol-3-butírico (IBA) 1 mg l⁻¹ durante 3 semanas, con las mismas condiciones de luz. Finalmente, las plantas obtenidas fueron transferidas a macetas con tierra y cultivadas en invernadero. Estas plantas constituyeron la generación T0 de plantas transformadas. Cuando emergieron las primeras flores, las panículas se cubrieron con bolsas de papel para evitar el cruzamiento de las plantas. Las semillas (generación T1) se recolectaron cuando estuvieron totalmente secas y se analizaron para confirmar la transformación.

10.3. Selección de transformantes por resistencia a herbicida

Las plantas transformadas fueron inicialmente seleccionadas mediante la aplicación con un algodón en varias hojas de una misma planta de 1 mg l⁻¹ glufosinato de amonio (BASTA®), 3 veces durante una semana. Las plantas no transformadas mostraron necrosis foliar, aumentando con el número de aplicaciones, debido a que estas plantas no albergaban el gen de resistencia *bar* al glufosinato de amonio.

10.4. Cuantificación de proteínas y medidas de pH

Cuando se menciona, la determinación de proteínas en los extractos proteicos se realizó según el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976) utilizando BSA como estándar para realizar la recta patrón. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas (Molecular Devices).

Las medidas de pH se realizaron en un medidor de pH GLP21 provisto de un electrodo (Crison).

10.5. Tinción con violeta de pirocatecol

Para la observación de la unión del aluminio a las raíces se realizó la tinción con violeta de pirocatecol (PCV) (Watanabe et al., 1998). Tras el tratamiento con aluminio, las raíces fueron lavadas en agua destilada y, posteriormente, se sumergieron en un

tampón 2,5% NH₄-OH-hexamina pH 6,2 conteniendo un 0,02% (p/v) de PCV durante 5 min. Finalmente, las raíces volvieron a ser lavadas con agua destilada.

11. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EXUDADOS

La determinación de los ácidos orgánicos exudados por las raíces de plantas de sorgo se realizó en el Servicio de Espectrometría de Masas del Centro de Investigación y Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Se envió el medio de cultivo en el que habían crecido plantas de la línea silvestre (WT) y de las líneas silenciadas (*Ppc3-1* y *Ppc3-2*) en condiciones control y bajo estrés por aluminio o por cadmio.

Al finalizar los distintos tratamientos, el medio de cultivo fue recogido y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido, liofilizado y enviado al Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Allí, las muestras fueron separadas cromatográficamente y los ácidos orgánicos identificados mediante un cromatógrafo líquido de ultra resolución (UHPLC) con bomba binaria Dionex Ultimate RS, acoplado a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-Orbitrap QExactive (ThermoFisher Scientific, USA) equipado con una fuente de electrospray (IIESI-II) operando en modo positivo a -2,5 Kv.

El análisis UHPLC se llevó a cabo con una columna analítica en fase reversa Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm), 1,8 µm de tamaño de partícula de Waters. El flujo empleado fue de 0,45 ml/min. La separación cromatográfica se realizó usando un gradiente binario de agua (A) y ACN:H₂O (95:5, v/v) (B), conteniendo ambos eluyentes ácido fórmico al 0,1% (v/v) para favorecer la ionización. El perfil de elución consistió en: isocrático durante 2 minutos a 0% B, gradiente lineal durante 2 min hasta 15% B, isocrático 1 min al 45% B, gradiente lineal durante 1 min hasta el 100% B, a continuación, isocrático con 100% B y finalmente, condiciones iniciales durante 3 min. El volumen de inyección fue de 5 µl. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua microfiltradas con filtros de nylon de 0,2 µm. El tratamiento de resultados se realizó con el software Tracefinder (Thermo Scientific)

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización de los análisis estadísticos se empleó el software informático *IBM SPSS Statistics 21.0* (IBM, Armonk, NY, United States). Los datos se analizaron mediante ANOVA (test de Duncan para datos con distribución normal y varianzas iguales, test de Games-Howell para datos con varianzas no homogénea, y test de Mann-Whitney para datos sin distribución normal, según se indica en cada caso). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un P valor < 0,05.

RESULTADOS

1. EFECTOS DEL ESTRÉS POR METALES EN PLANTAS DE SORGO CON EL GEN *SbPPC3* SILENCIADO POR ARNi

Diversos estudios han demostrado que uno de los principales mecanismos de respuestas frente a la toxicidad por metales consiste en la síntesis y secreción de ácidos orgánicos, ya que estos actúan como quelantes de los metales en la rizosfera reduciendo su incorporación a la planta e intervienen en la detoxificación y secuestro de los iones metálicos dentro de la planta (DalCorso et al., 2008; Ryan et al., 2009; Kochian et al., 2015; Fu et al., 2019; Su et al., 2019). Este proceso está asociado al aumento de expresión y actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono, como las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Su et al., 2019). En este sentido, también la enzima PEPC juega un papel relevante en la síntesis de ácidos orgánicos frente a la toxicidad por metales (Ermolayev et al., 2003; Begum et al., 2009; Xu et al., 2018b; Willick et al., 2019). Este capítulo estudia la importancia de la isoforma PPC3 de sorgo en la respuesta a dos metales altamente contaminantes y comunes en el suelo, el aluminio y el cadmio, puesto que esta es la isoforma más abundante en raíces y presenta un papel relevante en la respuesta a otros tipos de estreses como la sal o el amonio (de la Osa, 2020).

Además, la isoenzima *SbPPC3* presenta un papel crucial en la germinación de las semillas (Ruiz-Ballesta et al., 2014, 2016), al igual que su homólogo funcional *AtPPC3*. Esta juega un rol importante bajo diferentes condiciones de estrés, como la sal (Feria et al., 2016) y el cadmio (Willick et al., 2019). Además, también se ha encontrado una importante respuesta frente al estrés por aluminio en soja (Ermolayev et al., 2003). Por ello, se realizará para ambos metales un estudio sobre la germinación en diferentes concentraciones de aluminio y cadmio.

En definitiva, en este capítulo se investigaron los cambios en la fisiología de sorgo que causaba la carencia de la isoenzima PPC3 en situaciones de estrés por aluminio y por cadmio.

1.1. EFECTOS DEL ESTRÉS POR ALUMINIO EN PLANTAS DE SORGO CON EL GEN *SbPPC3* SILENCIADO POR ARNi

1.1.1. Impacto de la toxicidad de aluminio sobre la germinación de semillas *Ppc3*

En primer lugar, se realizó un estudio sobre la germinación de semillas homocigotas de la generación T3 de la planta WT y de las líneas silenciadas línea *Ppc3-1* y *Ppc3-2* en condiciones control y de estrés por aluminio y se determinó la tasa de germinación. Para la realización de este estudio, las semillas WT y silenciadas se colocaron en diferentes concentraciones de aluminio (0, 0,5 y 1 mM) y se estudió la germinación en estas condiciones.

Para determinar la velocidad de germinación de las semillas de sorgo, se establecieron 8 estadios de germinación (I-VIII) basándose en la longitud de la radícula y del epicótilo (Ruiz-Ballesta et al., 2014). Así, se determinó el estadio medio de germinación en el que se encontraban las semillas de sorgo en cada tratamiento a las 24, 48, 72 y 96 h. Se observó un retraso en la velocidad de germinación en las líneas silenciadas en condiciones control, el cual resultó significativo a las 48 y 72 h (**Fig. 22A**). Por otra parte, el aluminio provocó un ligero retraso en la germinación que fue mayor con la concentración más alta, siendo observable una menor velocidad de germinación en las líneas *Ppc3* respecto al WT en 1 mM de AlCl_3 , siendo significativo a las 48 y 96 h (**Fig. 22B,C**). Como se puede observar comparando todos los tratamientos (**Fig. 22D**) a las 72 h desde la imbibición, el aluminio tuvo un efecto leve sobre la germinación, ligeramente mayor en las líneas *Ppc3*, aunque solo fue significativo respecto a las semillas WT en condiciones control.

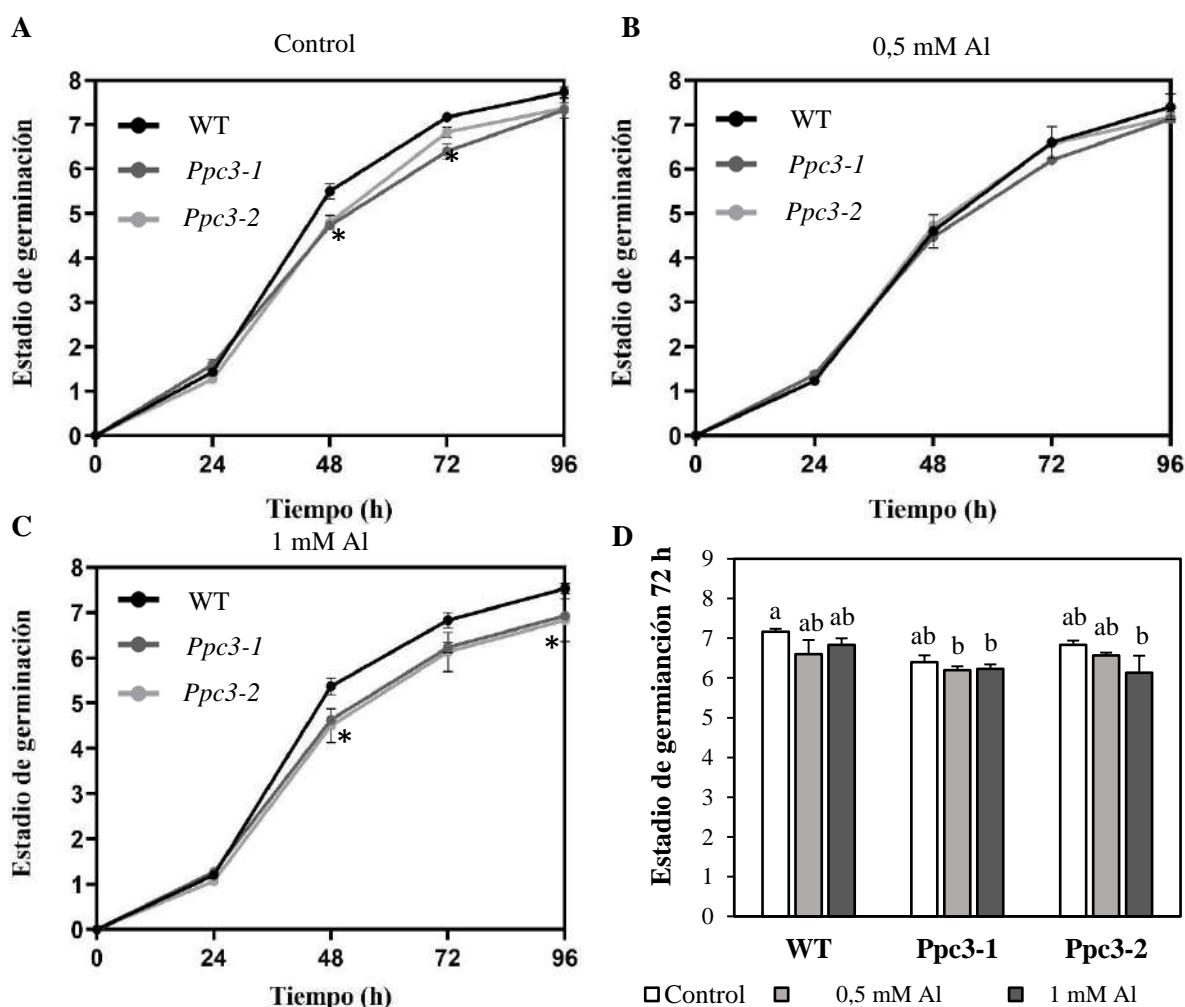


Figura 22. Efectos del aluminio sobre la velocidad de germinación de semillas *Ppc3*. Semillas fueron germinadas en placas de Petri (10 semillas/placa) como se describe en materiales y métodos y mantenidas en oscuridad a 25 °C. Se determinó el estadio medio de germinación en el que se encontraba cada línea a las 24, 48, 72 y 96 horas. **A.** Semillas germinadas en agua destilada. **B.** Semillas germinadas en una solución de AlCl_3 0,5 mM. **C.** Semillas germinadas en una solución de AlCl_3 1 mM. Los datos representan el estadio medio \pm EE (n = 3). * $P < 0,05$ vs WT (T test). **D.** Estado medio de germinación de las semillas a las 72 h de la imbibición. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

Las semillas germinadas en el estudio anterior fueron sometidas a un experimento igual al realizado para el cadmio con el objetivo de determinar la capacidad de recuperación tras la eliminación del metal del medio. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las líneas para el tratamiento con aluminio, por lo que los resultados no son mostrados.

1.1.2. Determinación de la unión del aluminio a las raíces de sorgo mediante tinción con violeta de pirocatecol

La toxicidad por aluminio en plantas se caracteriza por la rapidez con la que los iones de este metal se unen al ápice de las raíces, unión que puede ocurrir en cuestión de minutos (Kochian et al., 2004; Li et al., 2017). En este sentido, para la localización del aluminio unido a las raíces se utilizó la tinción con violeta pirocatecol (PCV). El PCV reacciona con el aluminio (Watanabe et al., 1998) y el complejo PCV-Al adquiere una tonalidad azul, que es proporcional al contenido de aluminio presente en la superficie.

Se realizó la tinción de raíces de plantas de sorgo de una semana tras 24 h de tratamiento con 1 mM de AlCl_3 . Al igual que en el caso anterior, la región apical de las raíces tanto de la raíz principal como de las secundarias se tiñó con mayor intensidad, indicando una mayor unión del aluminio a estas regiones (**Fig. 23**). Además, hay que destacar la fuerte tinción encontrada en la cofia de las raíces, principalmente, de las raíces secundarias (**Fig. 23**).

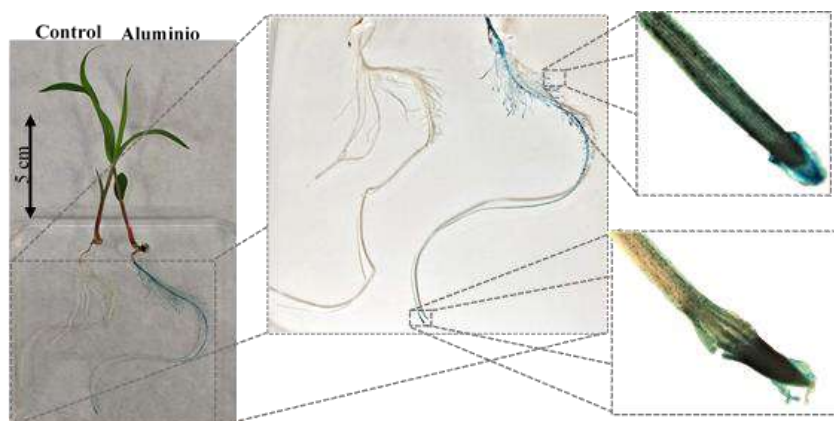


Figura 23. Tinción con violeta de pirocatecol del aluminio unido a las raíces de la planta WT. Plantas de una semana fueron tratadas durante 24 h con 1 mM de AlCl_3 . Tras este, las raíces se tiñeron con PCV como se describe en el apartado 10.5 de materiales y métodos. La imagen se tomó tras lavar las raíces con agua destilada. En la imagen de la izquierda se muestran las plantas control y tratada con aluminio tras ser teñidas, en la imagen central se destacan las raíces de las plantas, donde se puede ver una mayor tinción en los ápices de las raíces. A la derecha se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía óptica: arriba, el ápice radical de una de las raíces secundarias, donde se observa la fuerte tinción de la cofia; abajo, el ápice radical de la raíz principal.

1.1.3. Efectos de la concentración de aluminio sobre plantas WT

El aluminio, metal altamente reactivo, reacciona con el fósforo provocando su precipitando, y por tanto, haciendo que el P deje de estar disponible para la planta en el medio de cultivo (Wallihan, 1948). A su vez la ausencia de P implica respuestas

relacionadas con la actividad PEPC o con cambios en su estado de fosforilación (Chen et al., 2007; Gregory et al., 2009; O’Leary et al., 2011a). Para evitar este efecto indirecto del aluminio, se emplearon tratamientos de corta duración, usando un medio de cultivo sin fosfato. En primer lugar, se emplearon diferentes concentraciones de aluminio para poder determinar cuál es la concentración con mayor efecto sobre el crecimiento y sobre la actividad PEPC en raíces, y poder emplear ésta en el resto de experimentos.

En 48 h de tratamiento, el aluminio provocó una reducción importante del crecimiento de las raíces en todas las concentraciones empleadas (**Fig. 24A**). Además, la actividad PEPC aumentó en proporción a la concentración de aluminio, alcanzando su máximo a 1 mM (**Fig. 24B**). En consecuencia, ésta fue la concentración empleada en el resto de experimentos.



Figura 24. Efectos del aluminio sobre el crecimiento y la actividad PEPC en raíces de sorgo WT. Plantas de sorgo WT de dos semanas fueron tratadas con diferentes concentraciones de AlCl_3 (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 y 2 mM) durante 48 h. **A.** Variación de longitud de raíces desde el inicio al final del tratamiento. **B.** Actividad específica PEPC en raíces. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

1.1.4. Efecto del estrés por aluminio sobre el desarrollo vegetativo de plantas de sorgo *Ppc3*

En primer lugar, se estudiaron los efectos del aluminio sobre el crecimiento de las raíces. La unión de este metal a las mismas se produce en minutos, provocando una rápida inhibición de su crecimiento, siendo este el primer efecto observable en plantas expuestas a aluminio (Kochian et al., 2004; Begum et al., 2009; Sun et al., 2010). Por ello se analizaron los efectos del estrés por aluminio sobre la longitud y velocidad de crecimiento de las radículas de plantas WT y *Ppc3-1*, sometidas al tratamiento después de tres días desde la imbibición.

La línea silenciada presentó una tasa de crecimiento significativamente menor que la WT en situación control. Por otra parte, el aluminio disminuyó de forma significativa la velocidad de crecimiento de las radículas en ambas líneas (**Fig. 25A**). La longitud de las radículas fue significativamente menor en la línea *Ppc3-1* tanto en condiciones control como con aluminio respecto a la longitud alcanzada por las radículas WT en ambas condiciones (**Fig. 25B**).

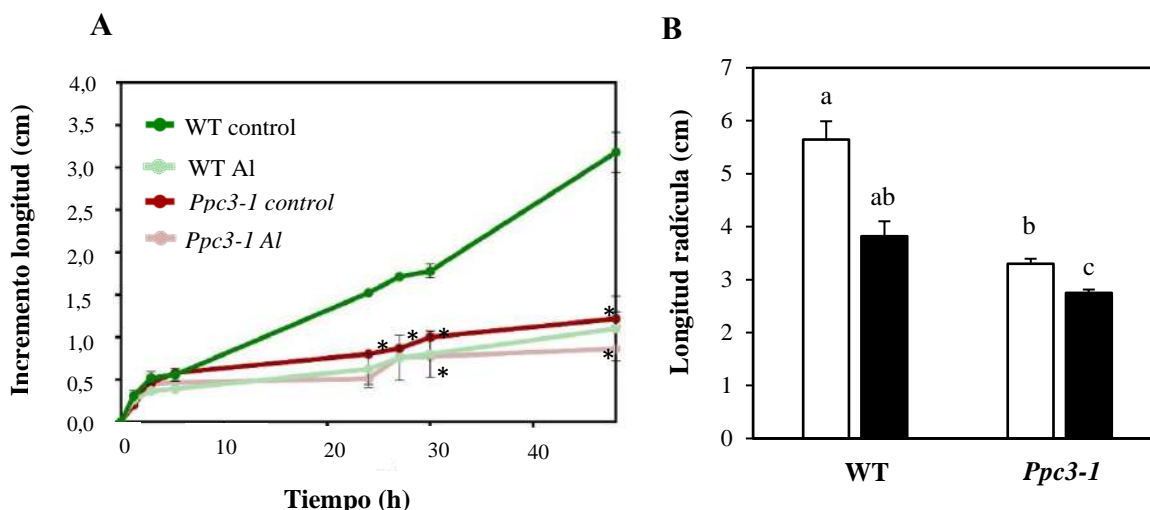


Figura 25. Efectos del estrés por aluminio en el crecimiento de las radículas. Plántulas de sorgo se cultivaron hidropónicamente con 1 mM de CaCl_2 y 5 μM de H_3BO_3 a pH 4,5 sin AlCl_3 (control) y con 1 mM de AlCl_3 durante 48 h. **A.** Tasa de elongación de la longitud de las radículas. Se midió el incremento de la longitud de las radículas con el tiempo. Los datos representan la media \pm EE (n = 3). *, $P < 0,05$ versus control (t test). **B.** Longitud final de las radículas. Se cuantificó la longitud de las radículas al finalizar el tratamiento. Los datos representan la media \pm EE (n = 3). Las distintas letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

Finalmente, se estudió el efecto del estrés por aluminio en plantas de sorgo de dos semanas, las cuales fueron cultivadas como se indica en materiales y métodos y tratadas con 1 mM de AlCl_3 durante 48 h. En estas plantas se determinó el efecto del silenciamiento y del estrés por aluminio sobre el crecimiento y la producción de biomasa. Los datos se muestran en la **Tabla 4**. El aluminio provocó una disminución de la biomasa producida tanto en PF como PS y del incremento de altura de la parte aérea y de las raíces. No se observaron diferencias significativas en el PF de la parte aérea y de las raíces entre la planta WT y las líneas *Ppc3*, mientras que el PS de raíces fue menor en las líneas silenciadas tanto en condiciones control como con aluminio. Cabe destacar que el aluminio provocó una mayor reducción del ratio de elongación tanto de la parte aérea como de las raíces en las líneas *Ppc3* que en la planta WT.

Tabla 4. Efectos del estrés por aluminio sobre el crecimiento de plantas de sorgo. Plantas de dos semanas tratadas con 1 mM de AlCl₃ durante 48 h como se describe en materiales y métodos. Las medidas se realizaron al finalizar el tratamiento. Los datos corresponden a la media \pm EE (n = 9 para la parte aérea y n=3 para los datos de raíces, cada réplica biológica corresponde con las raíces de tres plantas distintas). Las diferentes letras indican diferencias significativas (Games-Howell, P<0,05) dentro de cada columna.

		Parte aérea			Raíces		
		Incremento (cm)	PF (g)	PS (g)	Incremento (cm)	PF (g)	PS (g)
WT	Control	7,89 \pm 0,78 ^a	1,28 \pm 0,04 ^a	0,19 \pm 0,007 ^a	4,5 \pm 0,408 ^a	2,15 \pm 0,09 ^a	0,17 \pm 0,019 ^a
	AlCl ₃	4,72 \pm 0,69 ^{ab}	0,98 \pm 0,04 ^b	0,15 \pm 0,007 ^{bc}	2 \pm 0,623 ^{bc}	1,02 \pm 0,02 ^b	0,091 \pm 0,02 ^{bc}
Ppc3-1	Control	6,72 \pm 0,47 ^a	1,16 \pm 0,06 ^a	0,179 \pm 0,01 ^{ab}	2,67 \pm 0,54 ^{ab}	1,78 \pm 0,14 ^a	0,114 \pm 0,003 ^b
	AlCl ₃	3 \pm 0,59 ^b	0,93 \pm 0,03 ^{ab}	0,143 \pm 0,005 ^c	0,33 \pm 0,272 ^c	0,98 \pm 0,04 ^b	0,074 \pm 0,004 ^c
Ppc3-2	Control	5,78 \pm 1,35 ^a	1,17 \pm 0,11 ^a	0,177 \pm 0,01 ^{ab}	3,33 \pm 0,72 ^{ab}	1,97 \pm 0,26 ^a	0,118 \pm 0,01 ^{ab}
	AlCl ₃	2 \pm 0,36 ^b	0,98 \pm 0,02 ^{ab}	0,144 \pm 0,005 ^c	0,67 \pm 0,27 ^c	0,99 \pm 0,06 ^b	0,053 \pm 0,015 ^c

La toxicidad provocada por la mayor parte de los metales en plantas afecta directa o indirectamente a la fotosíntesis. El aluminio inhibe la fotosíntesis, principalmente al afectar directamente al fotosistema II (Su et al., 2019). Sin embargo, el tratamiento con aluminio aplicado no influyó sobre la fotosíntesis neta y sobre la conductancia estomática (**Tabla 5**). Esto indica que los efectos del aluminio sobre la producción de biomasa o sobre el ratio de elongación están asociados a los efectos del aluminio sobre el crecimiento de las raíces y no a sus efectos sobre la fotosíntesis.

Metales como el aluminio aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kochian et al., 2004; Su et al., 2019) generando estrés oxidativo y provocando peroxidación lipídica (Silva, 2012). Una forma de determinar el nivel de estrés oxidativo consiste en la determinación de la cantidad de malondialdehído (MDA) presente en las muestras (Morales y Munné-Bosch, 2019). Además, la mayor cantidad de daño oxidativo se produce en hojas debido al desacoplamiento del transporte de electrones de la fotosíntesis que producen estos metales (Chen et al., 2010a), por lo que se cuantificó este marcador de daño oxidativo en hojas. Además, también se ha cuantificado también en hojas el contenido de prolina puesto que este aminoácido actúa como osmoprotector y antioxidante en condiciones de estrés abiótico, también por estrés por aluminio (Giannakoula et al., 2008).

Estos dos marcadores de estrés, fueron medidos en hojas (**Tabla 5**). Tanto el MDA como la prolina fueron mayores en las líneas silenciadas que en la planta WT en condiciones control, fenómeno que ya había sido observado en estas líneas (de la Osa et al., 2022). El tratamiento con aluminio no afectó de forma importante al contenido de MDA en hojas y en el caso de la prolina, sólo la incrementó significativamente en hojas WT respecto a su control.

Tabla 5. Parámetros fotosintéticos e indicativos de estrés en plantas *Ppc3* tratadas con aluminio. Plantas de dos semanas tratadas con 1 mM de AlCl₃ durante 48 h como se describe en materiales y métodos. Las medidas se realizaron al finalizar el tratamiento. Los datos de la fotosíntesis neta, la conductancia estomática, el MDA y la prolina son la media \pm EE (n = 6). Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, P<0,05) dentro de cada columna.

		HOJAS			
		Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	MDA (nmol/g PF)	Prolina (nmol/g PF)
WT	Control	$18 \pm 0,4^a$	$0,06 \pm 0,004^a$	$20,6 \pm 1,3^a$	599 ± 23^a
	AlCl ₃	$17,2 \pm 0,46^{ab}$	$0,053 \pm 0,003^a$	$23,1 \pm 1,05^{ab}$	734 ± 38^b
<i>Ppc3-1</i>	Control	$16,3 \pm 0,06^b$	$0,059 \pm 0,004^a$	$27,5 \pm 0,75^c$	850 ± 59^b
	AlCl ₃	$16,8 \pm 0,05^{ab}$	$0,052 \pm 0,003^a$	$27,3 \pm 1,2^c$	805 ± 55^b
<i>Ppc3-2</i>	Control	$16,3 \pm 0,05^b$	$0,052 \pm 0,002^a$	$23,7 \pm 0,54^{ab}$	747 ± 25^b
	AlCl ₃	$17,8 \pm 0,05^a$	$0,051 \pm 0,003^a$	$24,5 \pm 0,66^{bc}$	863 ± 43^b

Las antocianinas intervienen en la respuesta a la toxicidad por metales, al actuar también como agentes quelantes de diversos iones metálicos entre los que destaca el aluminio. Éste incrementa la síntesis y acumulación de estos pigmentos (Schreiber et al., 2010; Landi et al., 2015). Por este motivo, se cuantificó el contenido en antocianinas en hojas y raíces de las plantas tratadas con aluminio (**Fig. 26**).

En hojas, el aluminio también incrementó significativamente el contenido de antocianinas, alcanzando niveles significativamente mayores en las plantas silenciadas (**Fig. 26A**). Por otro lado, el aluminio también provocó un aumento significativo en la acumulación de antocianinas en raíces, sin embargo, este fue similar en todas las líneas (**Fig. 26B**).

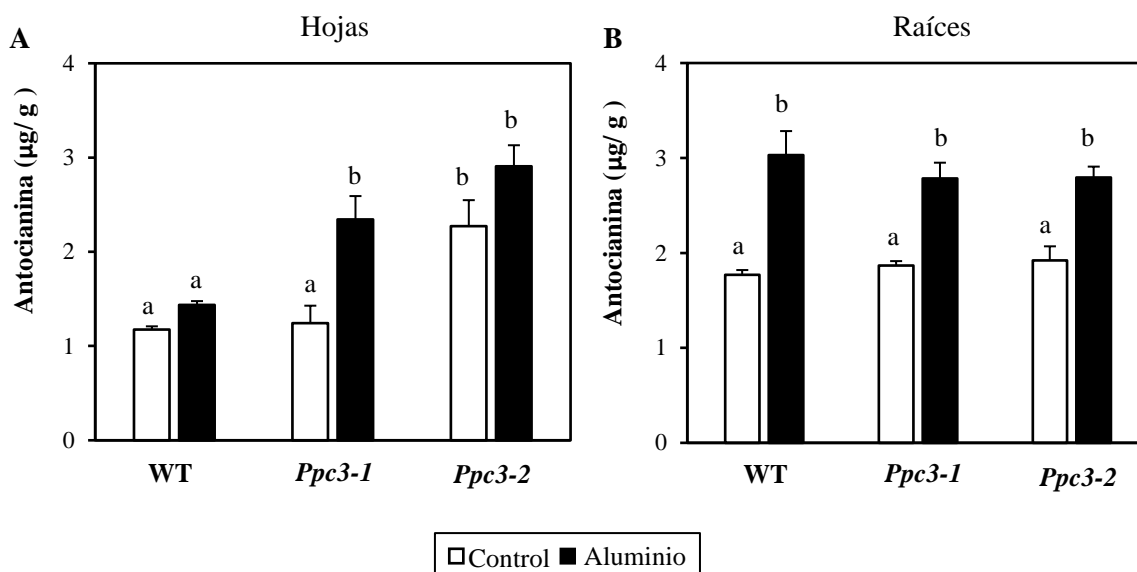


Figura 26. Efectos del aluminio sobre el contenido de antocianinas en hojas y raíces. Plantas de sorgo de 2 semanas fueron tratadas con 1 mM de AlCl_3 durante 2 días. Las antocianinas se midieron como se indica en materiales y métodos. **A.** Antocianinas en hojas. **B.** Antocianinas en raíces. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$, cada réplica biológica está formada por 3 plantas). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

1.1.5. Efectos del aluminio en la actividad PEPC y en la expresión de los genes *SbPPC*

La PEPC es importante en la síntesis de ácidos orgánicos como respuesta a metales (Begum et al., 2009; Yang et al., 2012; Huang et al., 2017a; Willick et al., 2019). En sorgo, es la isoenzima PPC3 la predominante en raíces y la que presenta mayor respuesta frente a estreses como el amonio o la sal (Arias-Baldrich et al., 2017; de la Osa et al., 2022). De acuerdo con esto, tanto la actividad PEPC como la cantidad de PEPC inmunodetectada fueron drásticamente reducidas en radículas (**Fig. 27A,C**), y en raíces de plantas de dos semanas de la línea *Ppc3-1* (**Fig. 27B,D**).

El aluminio provocó un incremento significativo de la actividad PEPC en radículas y raíces de las plantas WT, este estuvo asociado con un aumento en la cantidad de PEPC inmunodetectada (**Fig. 27**). En esta inmunodetección se observaron dos bandas de PEPC inmunorreactiva. Esto se debe a que las isoformas no fotosintéticas de PEPC pueden ser modificadas postraduccionalmente mediante monoubiquitinación (Uhrig et al., 2008b; Ruiz-Ballesta et al., 2014). Sin embargo, los efectos del aluminio y el silenciamiento fueron similares en ambas bandas de PEPC, monoubiquitinada y no-ubiquitinada (**Fig. 27C,D**).

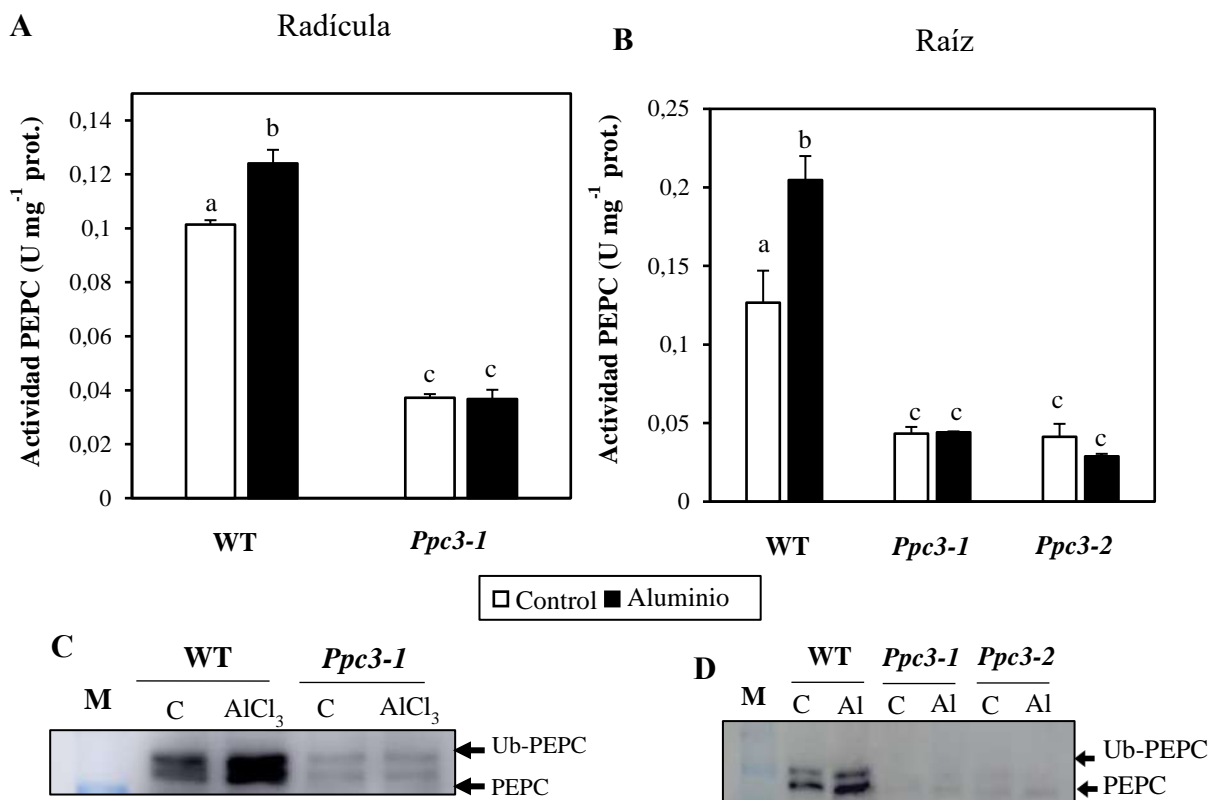


Figura 27. Efectos del aluminio sobre la actividad PEPC en radículas y raíces. A. Plántulas (3 días) fueron tratadas con 1 mM de AlCl₃ durante 1 día. B. Plantas (2 semanas) se trataron con 1 mM de AlCl₃ durante 2 días. C y D. Immunoblot utilizando 50 µg de proteínas de extractos radículas o de raíces, respectivamente. Ambos fueron revelados con anticuerpos anti-PEPC. M. Marcador; C, tratamiento control; Al, tratamiento con aluminio. Los datos son la media ± EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

Además de estos estudios inmunológicos y enzimáticos, mediante qPCR se analizó la expresión de los genes *SbPPC* raíces de plantas de sorgo de dos semanas tratadas con aluminio durante 48 h (**Fig. 28**). *SbPPC1* codifica la PEPC-C₄ y se expresa solo en hojas. *SbPPC5* (tipo-C₃) y *SbPPC6* (tipo bacteriano) presentan niveles de expresión muy bajos en hojas y raíces. Por estos motivos, los genes evaluados fueron *SbPPC2*, *SbPPC3* y *SbPPC4* en raíces. En este análisis se volvió a confirmar que la expresión de *SbPPC3* era muy inferior en la línea silenciada y que, al contrario que en raíces WT, la exposición a aluminio no aumentaba su expresión (**Fig. 28**). Además, cabe destacar que el aluminio incrementó significativamente la expresión de *SbPPC2*, siendo este aún mayor en la línea silenciada que en el WT. Sin embargo, este aumento de expresión de *SbPPC2* no consigue compensar la falta de *SbPPC3* a nivel de actividad en las plantas silenciadas (**Fig. 28**).

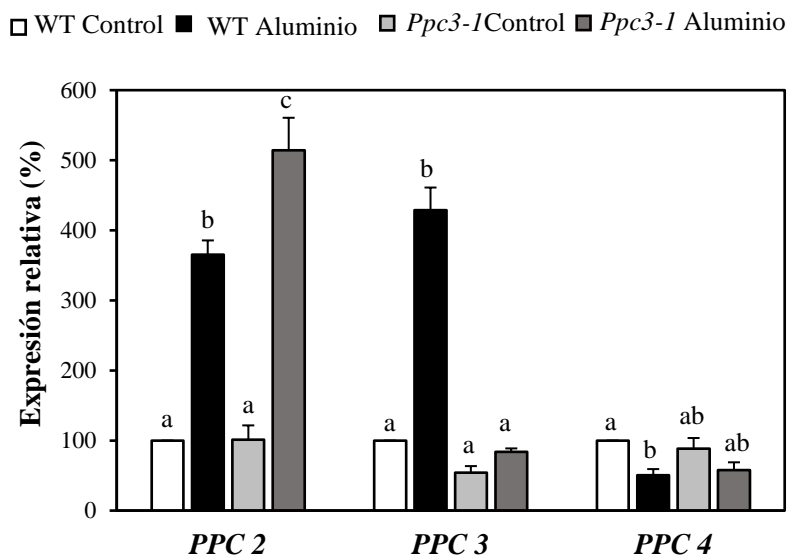


Figura 28. Expresión de genes *SbPPC* en raíces tratadas con aluminio. Plantas de dos semanas tratadas con 1 mM de AlCl_3 durante 48 h como se describe en materiales y métodos. Los datos se representan en porcentaje respecto al WT control, al que se le dio un valor de 100% para cada gen. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$, donde cada réplica biológica está formada por 3 plantas). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$) para cada gen.

En hojas, el aluminio no tuvo efectos sobre la actividad PEPC ni en plantas WT ni en las líneas silenciadas y tampoco sobre la cantidad de PEPC inmunodetectada (**Fig. 29A,B**). Por otro lado, el aluminio disminuyó la expresión de *SbPPC1* e incrementó la de *SbPPC2* en hojas WT, encontrando menor efecto en las plantas silenciadas. El aluminio no afectó a la expresión de *SbPPC3* en hojas. También en este tejido la expresión de este gen se vio drásticamente reducida en las plantas *Ppc3* (**Fig. 29C**).

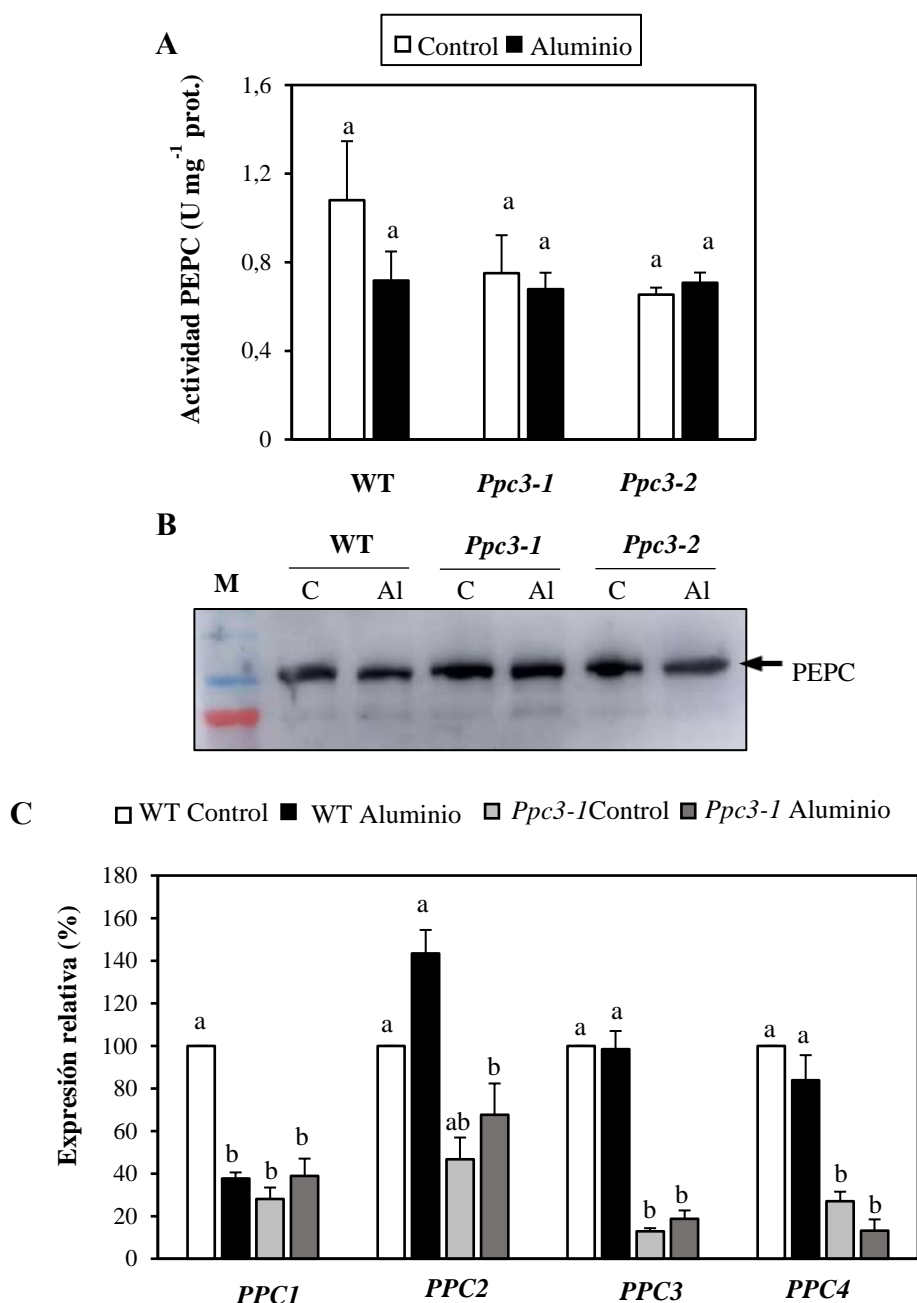


Figura 29. Efectos del estrés por aluminio sobre la actividad PEPC y la expresión de genes *SbPPC* en hojas. Plantas de dos semanas tratadas con 1 mM de AlCl_3 durante 48 h como se describe en materiales y métodos. **A.** Medida de la actividad PEPC específica en extractos de hojas. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$). **B.** Inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC de extractos de hojas con 10 μg de proteínas. M. Marcador; C, tratamiento control; Al, tratamiento con aluminio. **C.** Expresión de genes PPC en hojas. Los datos se representan en porcentaje respecto al WT control, al que se le dio un valor de 100% para cada gen. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$) para cada gen.

1.1.6. Efectos de la toxicidad por aluminio sobre la expresión de genes *SbPPCK* y la actividad *PEPCk in vitro*

Además, se cuantificó la expresión de los genes *SbPPCK* mediante qPCR y se ensayó la actividad *PEPCk* medida *in vitro*. Para determinar si el aluminio además de aumentar la cantidad de *PEPC*, también afectaba a su estado de fosforilación.

En raíces, el aluminio aumentó significativamente la expresión de *SbPPCK2* y *SbPPCK3* tanto en la línea WT como en la línea silenciada, además este incremento fue mayor en la línea *Ppc3-1* para ambos genes (**Fig. 30A**). Para determinar la actividad *PEPCk in vitro*, se realizó un ensayo de fosforilación utilizando *PEPC* exógena y extractos de raíces o de hojas como se describe en materiales y métodos. La *PEPC* fosforilada fue determinada mediante la cuantificación de la intensidad y tamaño de bandas de un gel de electroforesis teñido con el tinte de fosfoproteínas ProQ. Luego, el mismo gel fue teñido con Sypro para observar la cantidad total de proteínas. La intensidad y tamaño de la banda de *PEPC* fue igualmente cuantificado en este segundo revelado. Finalmente, se calculó la proporción ProQ/Sypro, relativizando respecto al WT control. La proporción ProQ/Sypro aumentó significativamente en el tratamiento de aluminio respecto a la condición control, siendo, además mayor en la línea silenciada (**Fig. 30B,C**). Por tanto, en raíces, el incremento de expresión de los genes *SbPPCK* se correspondió con un aumento en la actividad *PEPCk* medida *in vitro* (**Fig. 30**).

En hojas, el aluminio solo provocó cambios significativos en la expresión de *SbPPCK1* de la planta WT, pero no en la línea *Ppc3-1* y en la expresión de *SbPPCK3* en la línea silenciada. Por otra parte, *SbPPCK-2* aumentó ligeramente su expresión en presencia de aluminio, sobre todo en la línea silenciada (**Fig. 31A**). También, en hojas, se determinó la actividad *PEPCk in vitro* (**Fig. 31B**) y se observó que no había cambios significativos en la actividad *PEPCk in vitro*, aunque si hubo un ligero aumento de la misma en hojas WT tratadas con aluminio (**Fig. 31B,C**).

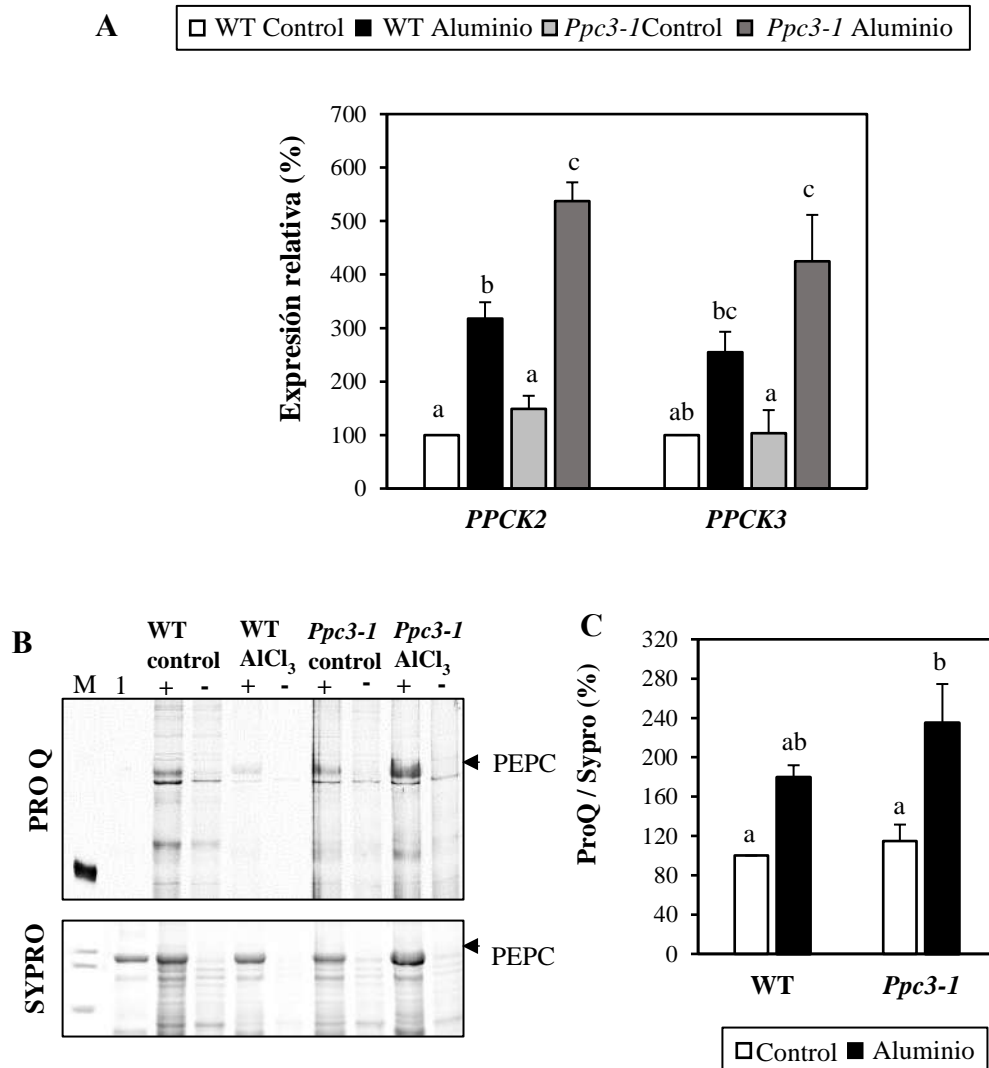


Figura 30. Efecto del aluminio en la expresión relativa de los genes *SbPPCK* y en la actividad PEPCk medida *in vitro* en raíces. Plantas de sorgo de dos semanas fueron tratadas con 1 mM de AlCl_3 . **A.** Expresión relativa de genes *SbPPCK*. Los datos se representan en porcentaje respecto al WT control, al que se le dio el valor de 100% para cada gen. **B.** Imagen representativa de un resultado de actividad PEPCk *in vitro*. El ensayo de actividad se realizó con (+) y sin (-) PEPC exógena semipurificada. En el carril 1 se cargó una alícuota de PEPC exógena incubada sin ATP. **C.** Se representa el ratio ProQ/SyPro en tanto por ciento, respecto a la planta WT control (100%). Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

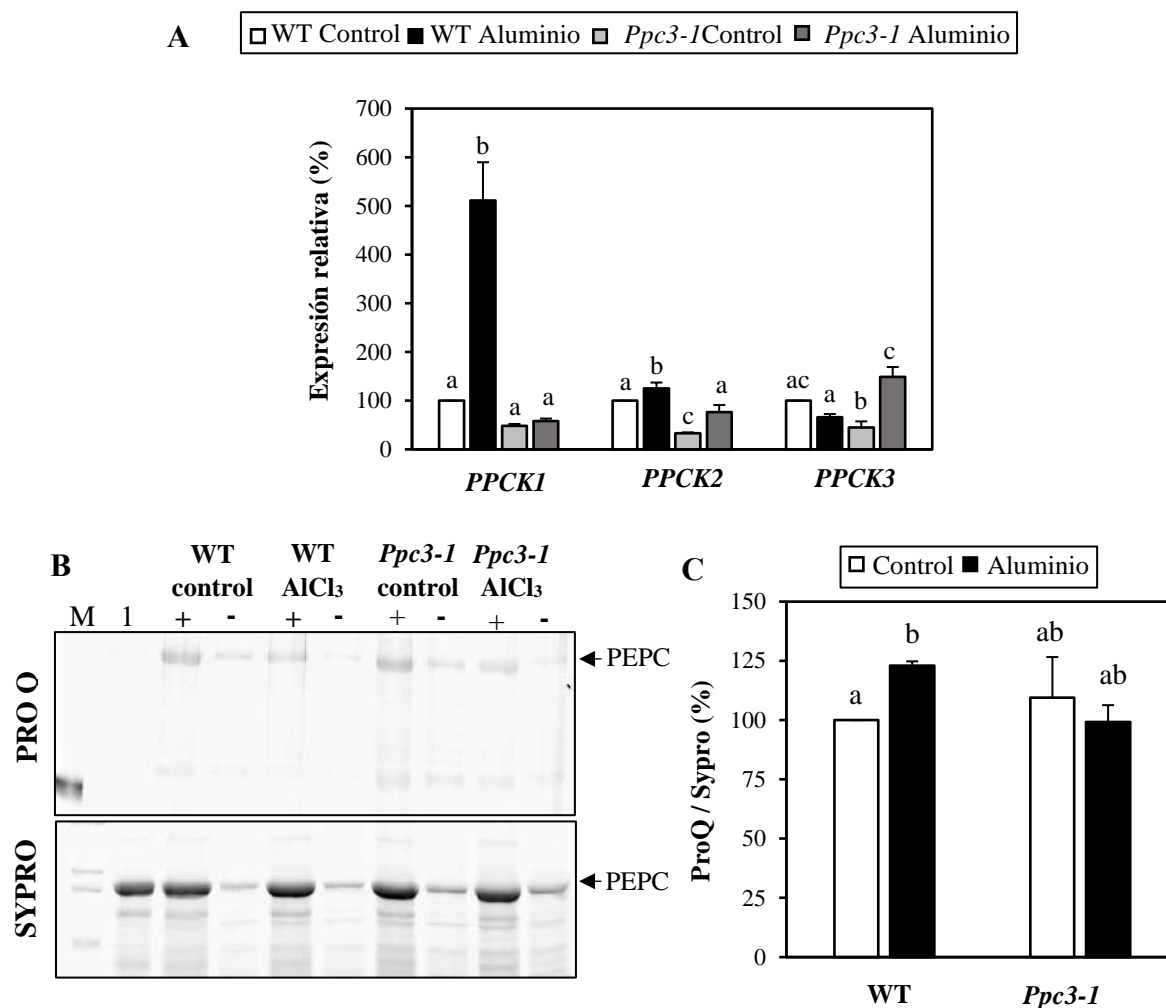


Figura 31. Efectos del aluminio sobre la expresión relativa de los genes *SbPPCK* y la actividad PEPCk medida *in vitro* en hojas. Plantas de sorgo de dos semanas se trataron con 1 mM de AlCl_3 . **A.** Expresión relativa de los genes *SbPPCK*. Los datos se representan con respecto al WT control, al que se le dio el valor de 100% para cada gen. **B.** Imagen representativa de un resultado de actividad PEPCk *in vitro*. El ensayo de actividad se realizó con (+) y sin (-) PEPC exógena semipurificada. En el carril 1 se cargó una alícuota de PEPC exógena incubada sin ATP. **C.** Las bandas fueron cuantificadas mediante el programa Multigauge V3.0. Se representa la ratio ProQ/SyPro en tanto por ciento, respecto a la planta WT control. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

1.1.7. Efecto del aluminio en la secreción de ácidos orgánicos por plantas *Ppc3*

Una de las principales respuestas de las plantas frente al estrés por metales consiste, como se ha visto, en la secreción de ácidos orgánicos capaces de actuar como quelantes de los iones metálicos reduciendo su toxicidad sobre las funciones fisiológicas de la planta (DalCorso et al., 2008; Ryan et al., 2009; Kochian et al., 2015; Fu et al., 2019; Su et al., 2019). La PEPC, participando en la síntesis de estos ácidos orgánicos, podría jugar un papel importante en esta respuesta (Xu et al., 2018b; Willick et al., 2019). Por este motivo, se determinaron los ácidos orgánicos en los exudados mediante espectrometría de masa. Para ello, plántulas de sorgo se cultivaron en tubos de 50 ml, siendo tratadas con aluminio durante 48h como se indica en materiales y métodos.

De esta forma, se cuantificaron los ácidos orgánicos presentes en los exudados, encontrando que fueron cuatro los mayoritarios: citrato y malato, relacionados directamente con la actividad PEPC y con la respuesta frente a la presencia de aluminio (López-Arredondo et al., 2014); y succinato y lactato (**Fig. 32**). En sorgo, el aluminio induce principalmente la secreción de citrato (Melo et al., 2018). En este trabajo se ha visto que el tratamiento con aluminio incrementaba drásticamente la presencia de citrato en el medio, aunque la respuesta fue similar en todas las líneas (**Fig. 32A**). Los cambios causados por el aluminio en el resto de ácidos orgánicos cuantificados, aunque significativos, fueron menos relevantes. El aluminio incrementó la secreción de succinato, en mayor medida en la planta WT. Además, en condiciones control la cantidad de succinato detectada también fue menor en las líneas silenciadas (**Fig. 32B**). El aluminio redujo la cantidad de malato en las plantas WT y no afectó al exudado por las líneas *Ppc3*, donde se mantuvo igual que en condiciones control. Condiciones en las que la cantidad de malato fue inferior al encontrada en plantas WT (**Fig. 32C**). Las líneas *Ppc3* secretaron una menor cantidad de lactato que las plantas WT en todos los tratamientos, además el aluminio redujo la secreción de este ácido orgánico, especialmente en las líneas *Ppc3* (**Fig. 32D**).

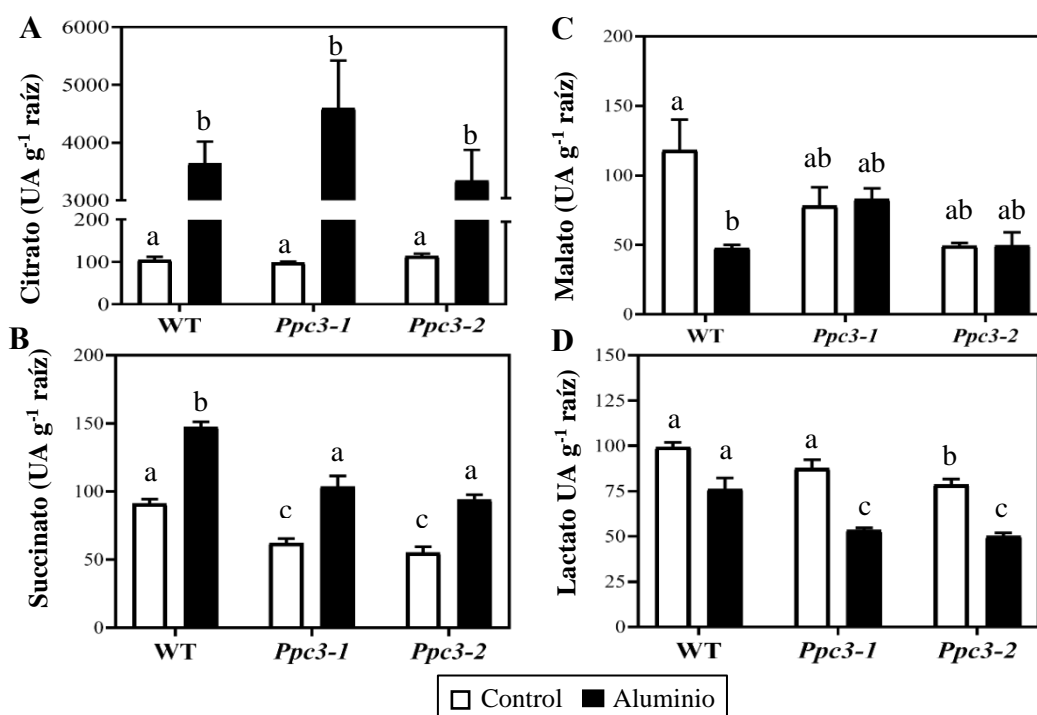


Figura 32. Determinación de ácidos orgánicos exudados por raíces de plantas de sorgo tratadas con aluminio. Se determinaron los ácidos orgánicos presentes en los exudados radicales de plantas de sorgo de 15 días. Las plantas de 8 días se pasaron a bote de 50 ml con medio Hewitt durante 5 días. Posteriormente, el medio fue sustituido con 35 ml de una solución de 1 mM CaCl₂, 5 μM H₃BO₃ a pH 4,5 con 1 mM AlCl₃. El medio fue recogido y enviado para su análisis mediante espectrometría de masas. **A.** Citrato. **B.** Succinato. **C.** Malato. **D.** Lactato. Los datos son la media ± EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Games-Howell, P<0,05).

En este nuevo método de cultivo para la cuantificación de los ácidos orgánicos exudados también se cuantificó la actividad PEPC de las raíces. Los resultados obtenidos fueron similares a los mostrados en puntos anteriores de este mismo capítulo. El aluminio incrementó significativamente la actividad PEPC medida en raíces de la planta WT, pero no en las líneas silenciadas, en las que la actividad PEPC de raíces fue significativamente menor en todas las condiciones comparándolas con la actividad medida en la planta WT (Fig. 33).

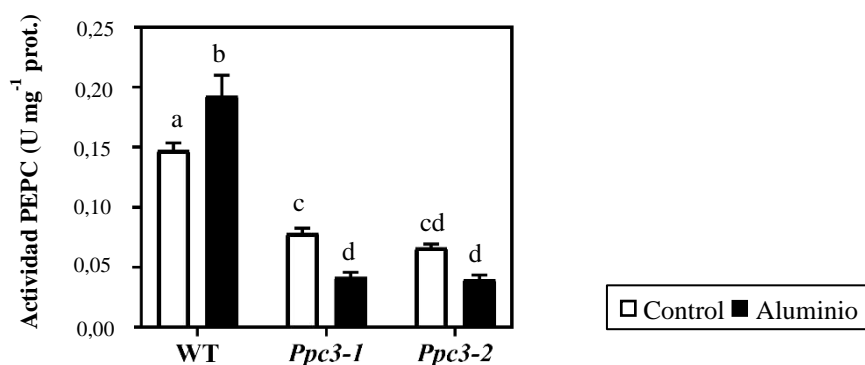


Figura 33. Actividad PEPC medida en raíces de sorgo tratadas con aluminio. Se determinó la actividad PEPC en raíces de plantas de sorgo de 15 días. Las plantas se cultivaron como se indica en la Figura 32. Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

1.2. EFECTOS DEL ESTRÉS POR CADMIO EN PLANTAS DE SORGO CON EL GEN *SbPPC3* SILENCIADO POR ARNi

1.2.1. Impacto del cadmio sobre la germinación de semillas *Ppc3*

En primer lugar, se realizó un estudio de la germinación de semillas WT y *Ppc3* en distintas concentraciones de cadmio (0, 0,5 y 1 mM). Para esto se siguió el mismo procedimiento realizado en el apartado del efecto del aluminio sobre la germinación, determinando el estadio medio de germinación (Ruiz-Ballesta et al., 2014) a las 24, 48, 72 y 96 h (**Fig. 34**).

Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento retrasaba significativamente la germinación de las líneas *Ppc3* respecto al WT en condiciones control (**Fig. 34A**). Por otra parte, el cadmio retrasó severamente la germinación de manera proporcional a la concentración del metal. Además, el efecto del cadmio fue mayor en las líneas silenciadas, encontrando diferencias significativas a las 72 y 96 h en la línea *Ppc3-2* y en la línea *Ppc3-1* para 0,5 y 1 mM de cadmio, respectivamente, comparándolas con el WT para cada condición (**Fig. 34B,C**). Finalmente, se comparó el estadio medio de germinación para cada condición a las 96 h. A 0,5 mM de cadmio hubo una reducción significativa en el estadio de germinación en todas las líneas respecto a las condiciones control, si bien el efecto fue mayor en la línea *Ppc3-2* e intermedio en la línea *Ppc3-1*. A 1 mM la reducción fue significativamente mayor, destacando que en las líneas modificadas los efectos del cadmio fueron significativamente mayores que en las semillas WT (**Fig. 34D**).

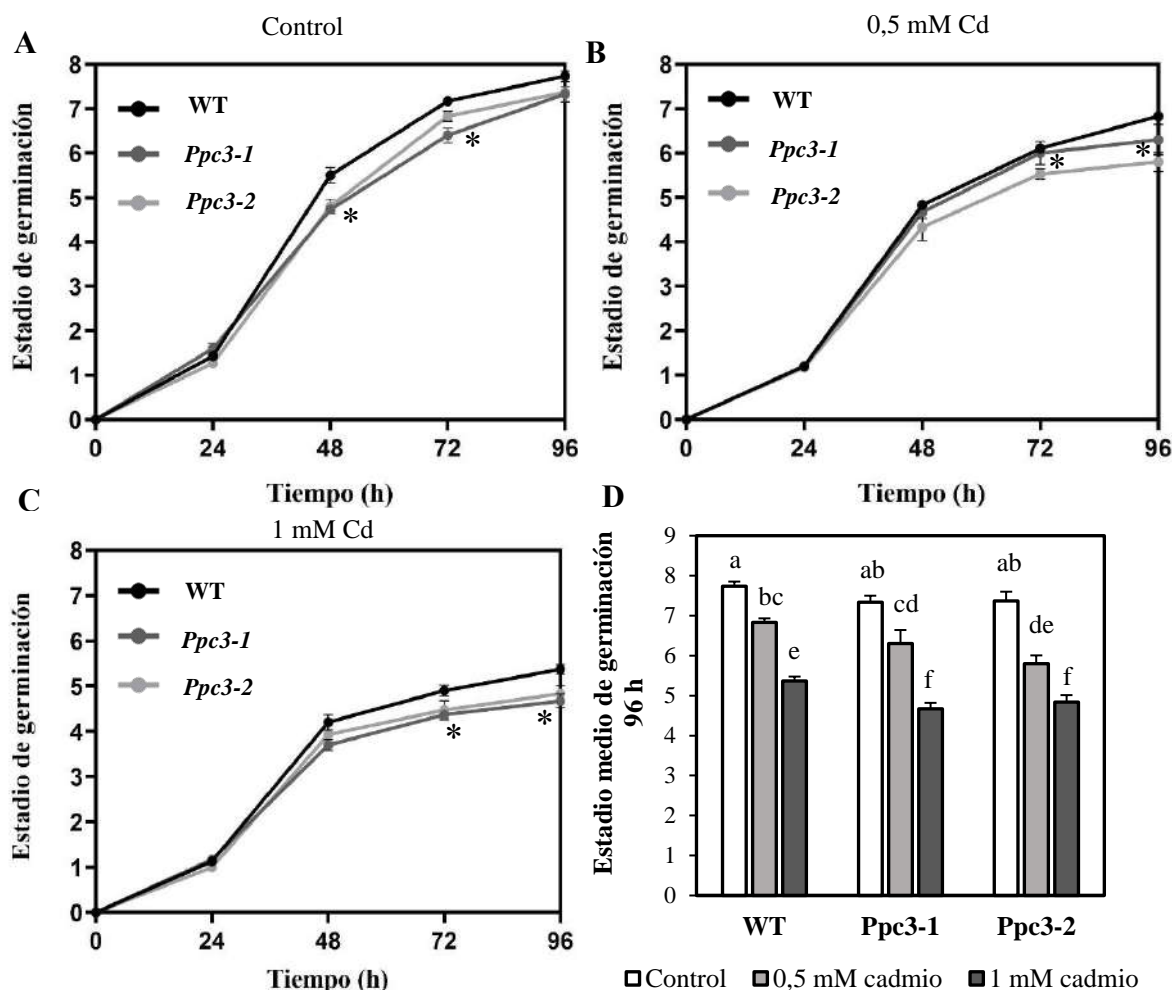


Figura 34. Efectos del cadmio sobre la germinación de semillas *Ppc3*. Semillas WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2* fueron germinadas en placas como se describe en materiales y métodos y mantenidas en oscuridad a 25 °C. Se determinó el estado de germinación en el que se encontraba cada línea a las 24, 48, 72 y 96 horas. **A.** Semillas germinadas en agua destilada. **B.** Semillas germinadas en una solución de cadmio 0,5 mM. **C.** Semillas germinadas en una solución de cadmio 1 mM. Los datos representan el estado medio \pm EE (n = 3). * $P < 0,05$ vs WT (T test). **D.** Estadio medio de germinación de las semillas a las 96 h de la imbibición (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Las semillas germinadas en el estudio anterior fueron pasadas a un medio hidropónico donde se mantuvieron en presencia o no de 0,5 mM de cadmio durante 5 días, como se describe en “materiales y métodos”. Tras esto, se cambió la solución por medio Hewitt sin metal para determinar si las plántulas eran capaces de recuperarse tras la exposición prolongada al metal se cuantificó la altura de las mismas con el tiempo.

En condiciones control, las líneas silenciadas presentaron un crecimiento significativamente menor al WT control (**Fig. 35A,B**). La eliminación del cadmio del medio de cultivo no permitió una recuperación considerable de la velocidad de crecimiento. Además, de nuevo, fueron las líneas *Ppc3*, previamente germinadas y tratadas con cadmio, las que presentaron la menor velocidad de crecimiento,

especialmente la línea *Ppc3-1* (Fig. 35A). Los resultados a los 5 días tras la retirada del metal muestran que el crecimiento fue significativamente menor en la línea *Ppc3-1* y que tuvo un valor intermedio en la línea *Ppc3-2* (Fig. 35B).

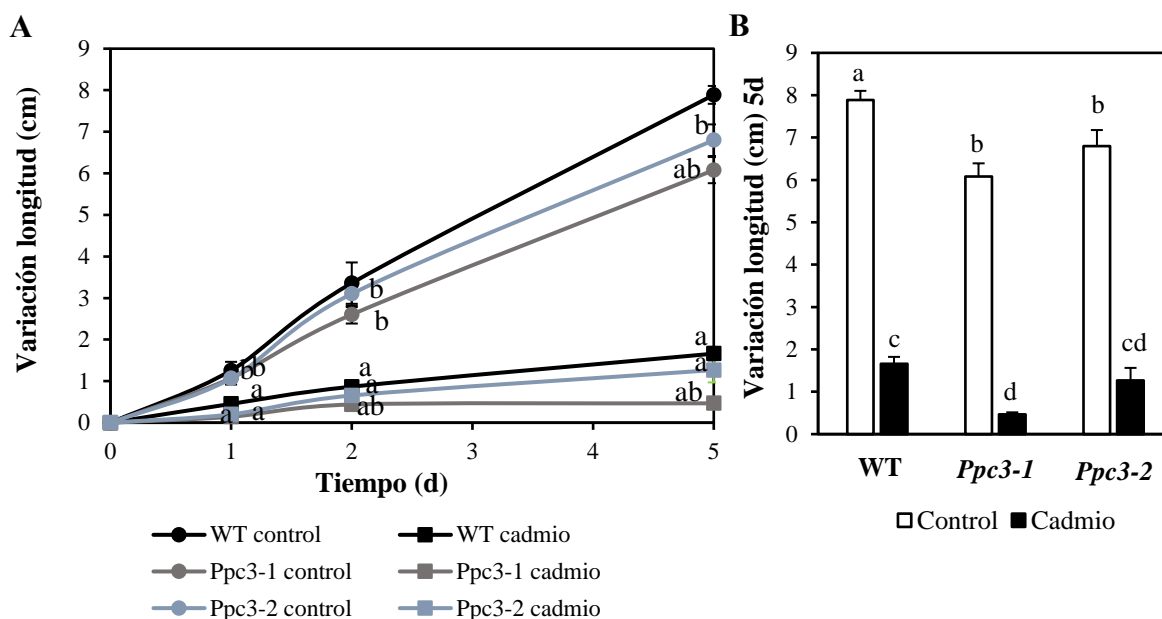


Figura 35. Efecto del silenciamiento de SbPPC3 sobre la capacidad de recuperación de plántulas tratadas con cadmio. Las semillas germinadas en condiciones control y con 0,5 mM de cadmio fueron colocadas en un cultivo hidropónico con Hewitt. A este medio se le añadió 0 ó 0,5 mM de cadmio, manteniéndose en estas condiciones durante 5 días. Tras esto, el medio fue sustituido por medio Hewitt sin metal. **A.** Se midió el incremento de altura de las plántulas con el tiempo (0, 1, 2 y 5 días). Los datos representan la media \pm EE (n = 3); a, $P < 0,05$ vs WT C; b, $P < 0,05$ vs WT Cd (T-test). **B.** Variación en la altura de la plántula a los 5 días de ausencia de metal. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

1.2.2. Efecto del estrés por cadmio sobre el desarrollo vegetativo en plantas de sorgo *Ppc3*

Para el estudio de los efectos del silenciamiento de SbPPC3 y del estrés por cadmio se emplearon plantas de dos semanas crecidas en medio Hewitt, que fueron expuestas a 100 μ M de cadmio durante una semana. Los datos del efecto del estrés por cadmio sobre el incremento en altura y la biomasa en PF y PS se muestran en la **tabla 6**. El cadmio redujo la elongación de la parte aérea, siendo los efectos mayores en las líneas silenciadas, esto estuvo asociado también a una menor producción de biomasa en estas, aunque en este caso los resultados no fueron significativos. El cadmio también redujo el crecimiento de las raíces. En este caso, el incremento en longitud y la producción de biomasa fueron ligeramente menores en las líneas *Ppc3* tratadas con cadmio que en las plantas WT.

Tabla 6. Efecto del cadmio sobre el crecimiento de plantas de sorgo *Ppc3*. Plantas de sorgo de dos semanas cultivadas con medio Hewitt fueron expuestas a 100 μ M de acetato de cadmio durante 1 semana, como se describe en materiales y métodos. Los datos se tomaron al final del tratamiento. Los datos son la media \pm EE (n = 9 para la parte aérea y n = 3 para raíces, cada réplica biológica corresponde a las raíces de tres plantas). Las distintas letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

		Parte aérea			Raíces		
		Incremento (cm)	PF (g)	PS (g)	Incremento (cm)	PF (g)	PS (g)
WT	Control	21,4 \pm 0,74 ^a	2,7 \pm 0,13 ^a	0,35 \pm 0,02 ^a	9,1 \pm 0,8 ^a	5,2 \pm 0,34 ^a	0,39 \pm 0,03 ^a
	Cd	10,3 \pm 2 ^b	1,3 \pm 0,1 ^b	0,19 \pm 0,01 ^b	5,6 \pm 0,48 ^d	2,1 \pm 0,2 ^c	0,16 \pm 0,02 ^{cd}
<i>Ppc3-1</i>	Control	18,3 \pm 0,78 ^a	2,3 \pm 0,17 ^a	0,27 \pm 0,03 ^a	6,4 \pm 0,38 ^{bc}	4,5 \pm 0,55 ^b	0,2 \pm 0,02 ^{bc}
	Cd	6,2 \pm 2,6 ^c	1,02 \pm 0,1 ^b	0,15 \pm 0,01 ^b	4,4 \pm 0,31 ^d	1,34 \pm 0,1 ^d	0,1 \pm 0,02 ^d
<i>Ppc3-2</i>	Control	18,4 \pm 1,86 ^a	2,79 \pm 0,3 ^a	0,32 \pm 0,03 ^a	8,2 \pm 0,5 ^{ab}	5,54 \pm 0,4 ^a	0,28 \pm 0,03 ^b
	Cd	5,92 \pm 1,8 ^c	1,07 \pm 0,04 ^b	0,17 \pm 0,01 ^b	4,3 \pm 0,7 ^d	1,7 \pm 0,13 ^c	0,13 \pm 0,01 ^{cd}

El cadmio, al igual que otros metales, afecta a la actividad fotosintética. Afecta al fotosistema II (Ekmekçi et al., 2008; Das et al., 2016) e induce el cierre estomático (DalCorso et al., 2008). Además, el cadmio afecta al contenido de pigmentos fotosintéticos, debido a sus efectos sobre la síntesis y la degradación de estos (DalCorso et al., 2008; Wahid et al., 2008). Por estos motivos se cuantificaron distintos parámetros fotosintéticos (fotosíntesis neta y conductancia estomática) y se midió el contenido en pigmentos fotosintéticos (**Fig. 36**).

En condiciones control, la conductancia estomática (gs) de las líneas *Ppc3-1* y *Ppc3-2* fue significativamente menor que en las plantas WT (**Fig. 36B**). Este resultado tuvo también implicaciones sobre la fotosíntesis neta (A), aunque en este caso las diferencias encontradas entre WT y las líneas silenciadas fueron más leves, siguieron siendo significativas (**Fig. 36A**). Estos datos coinciden con resultados previos obtenidos por nuestro grupo (de la Osa et al., 2022). El cadmio redujo significativamente ambos parámetros fotosintéticos, aunque lo hizo de forma similar entre las líneas de sorgo (**Fig. 36A,B**).

El cadmio provocó una reducción generalizada del contenido de clorofilas respecto a la condición control (**Fig. 36C,D y E**). La clorofila A disminuyó significativamente respecto a la condición control de forma similar en todas las líneas (**Fig. 36C**). El contenido en clorofila B fue reducido por el estrés por cadmio en mayor proporción que la clorofila A. Además, las líneas *Ppc3* tratadas con cadmio presentaron un nivel de clorofila B significativamente menor al encontrado en plantas WT en esta misma condición (**Fig. 36D**), indicando una mayor sensibilidad a cadmio en estas dos líneas. Evidentemente, esto tuvo repercusión en el contenido total de clorofilas, que también fue menor en las líneas silenciadas (**Fig. 36E**). Por último, el contenido de carotenoides no se vio afectado por el estrés por cadmio en ninguna de las líneas de sorgo (**Fig. 36F**).

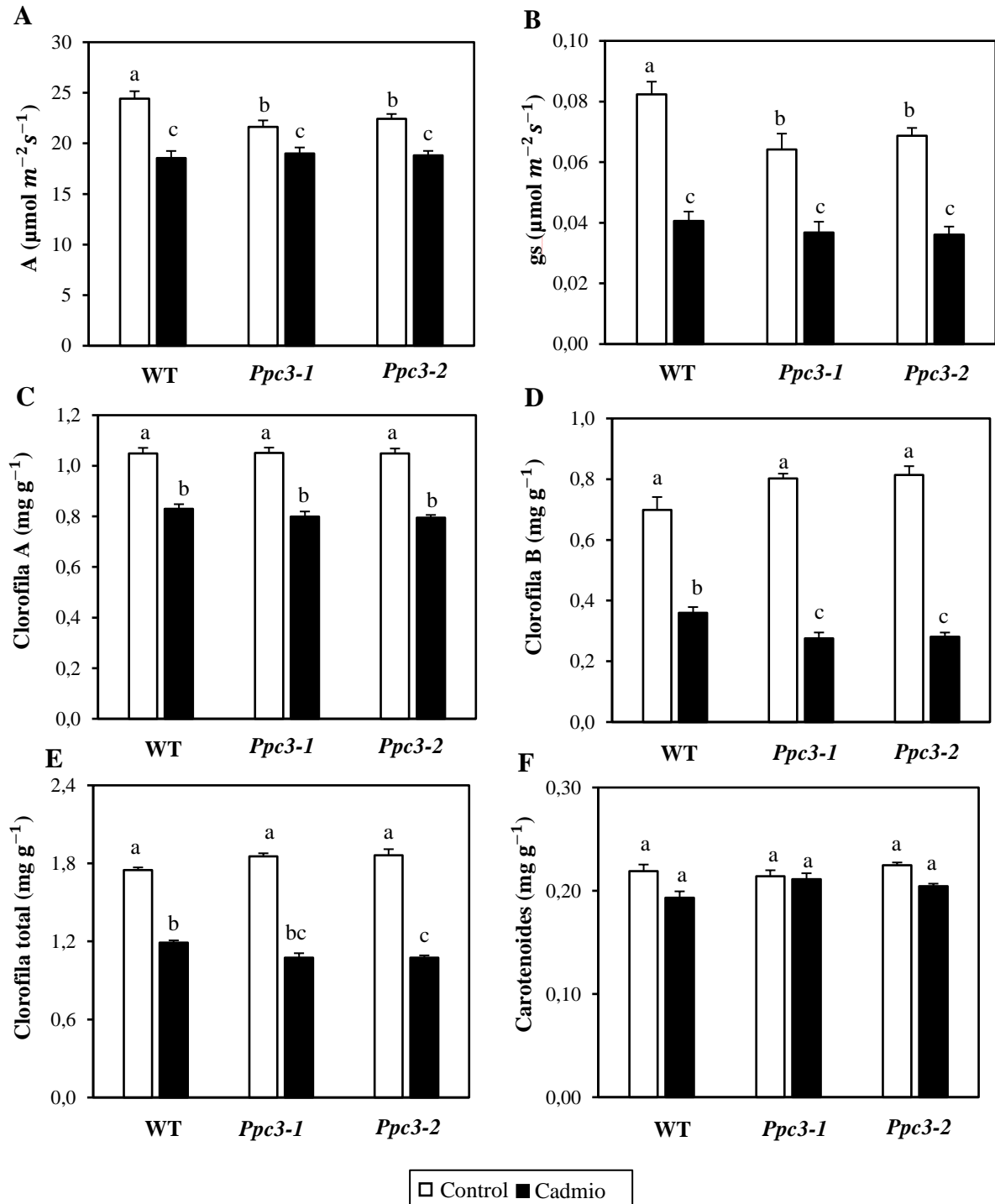


Figura 36. Efecto del cadmio sobre la actividad y los pigmentos fotosintéticos. Plantas de sorgo de dos semanas cultivadas con medio Hewitt fueron expuestas a 100 μM de cadmio como se describe en la Tabla 6. **A.** Fotosíntesis neta (**A**). **B.** Conductancia estomática (gs). Los datos son la media \pm SE ($n = 3$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$). Se determinaron los pigmentos fotosintéticos como se indica en materiales y métodos. **C.** Clorofila A. **D.** Clorofila B. **E.** Clorofila total. **F.** Carotenoides. Los datos son la media \pm EE ($n = 6$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Mann Whitney y Games-Howell, $P < 0,05$ para clorofilas A y B, y clorofila total, respectivamente).

Al igual que el aluminio, el cadmio aumenta la formación de ROS, por lo que también aquí se utilizó el MDA (Tiryakioglu et al., 2006; Li et al., 2013; Ur Rahman et al., 2021) y la prolina como indicadores del nivel de estrés (Ur Rahman et al., 2021).

La tendencia en respuesta al cadmio del contenido de MDA y prolina en hojas fue similar entre las distintas líneas. El cadmio redujo el contenido de ambos en la planta WT, pero no en las líneas modificadas (**Fig. 37**). El MDA aumentó significativamente en la línea *Ppc3-1* y levemente en la línea *Ppc3-2* en presencia de cadmio (**Fig. 37A**). La prolina presentó la misma tendencia, aunque los resultados no fueron significativos (**Fig. 37B**). Estos resultados sugieren que las líneas *Ppc3* son más sensibles a la presencia de cadmio que la planta WT, en la que los mecanismos activados por cadmio para disminuir los niveles de estrés son más efectivos que en las líneas silenciadas, donde son insuficientes.

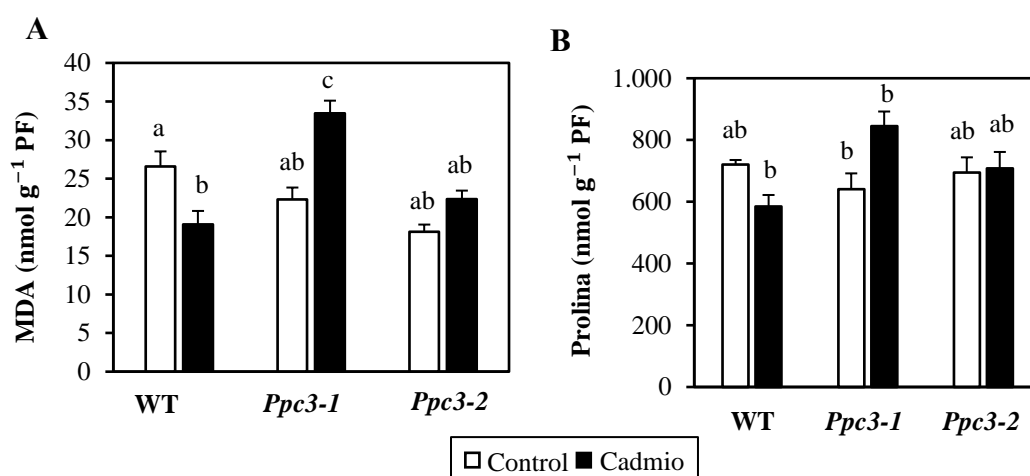


Figura 37. Efectos del cadmio sobre marcadores de estrés en hojas. Plantas de sorgo cultivadas y tratada con cadmio como se describe en la Figura 36. **A.** Contenido de MDA en hojas. **B.** Contenido de prolina en hojas. Los datos son la media \pm EE (n = 6). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

El cadmio afecta a la absorción de otros nutrientes en una gran variedad de especies vegetales, al afectar a la permeabilidad de la membrana plasmática o por competencia directa por los mismos transportadores de membrana. Especialmente, el cadmio afecta a la absorción y transporte de otros cationes divalentes (Zhang et al., 2002; Wahid et al., 2008; Hanikenne et al., 2021), como el calcio (Ca^{2+}) (Huang et al., 2017b), el magnesio (Mg^{2+}) (Hasan et al., 2009; Haider et al., 2021), el hierro (Fe^{2+}) (Benavides et al., 2005; Dubeaux et al., 2018; Cointry y Vert, 2019) o el zinc (Zn^{2+}) (Haider et al., 2021). Por esto, se determinó el contenido en estos cationes en hojas y raíces de plantas WT y silenciadas (*Ppc3-1* y *Ppc3-2*) en condiciones control y tratadas con 100 μM de cadmio (**Fig. 38**).

El cadmio causó un incremento en el contenido de Fe y Zn en raíces (**Fig. 38A,B**), este aumento fue mayor en las raíces WT, siendo especialmente destacable en el caso del Fe. Por el contrario, el cadmio redujo el contenido de Ca y Mg también en raíces, siendo

los efectos mucho mayores en el caso de Mg (**Fig. 38C,D**). Sin embargo, los efectos fueron similares entre las distintas líneas de sorgo analizadas. Contrariamente a lo observado en raíces, en hojas el cadmio redujo significativamente el contenido de Fe y Zn, (**Fig. 38E,F**) y más ligeramente también redujo el contenido de Mg, aunque estos cambios fueron similares en todas las líneas de sorgo (**Fig. 38H**). Por último, el cadmio incremento el Ca en hojas en todas las líneas, aunque no fue significativamente en *Ppc3-1* (**Fig. 38G**).

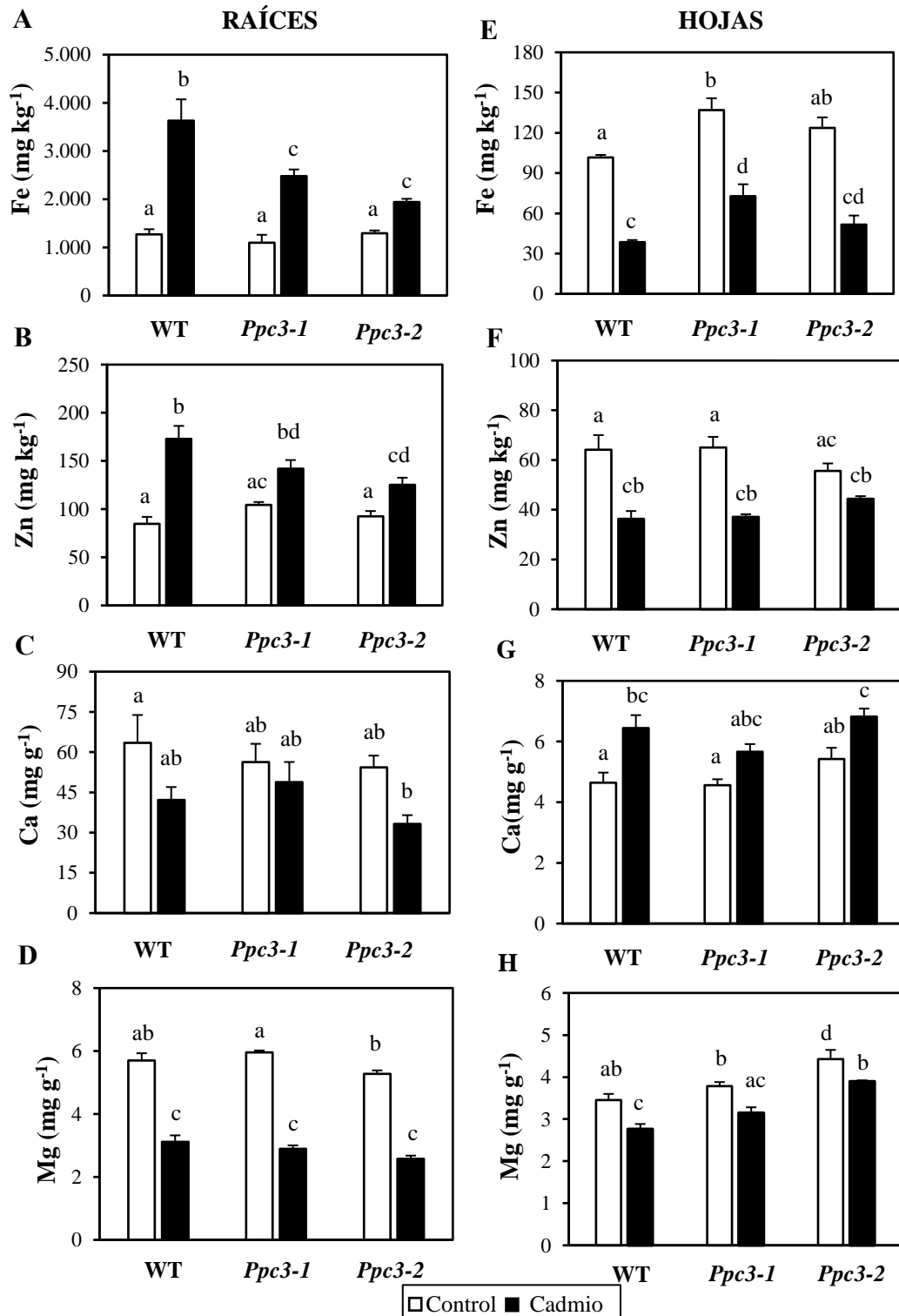


Figura 38. Efectos del cadmio sobre el contenido de Fe, Zn, Ca y Mg en raíces y hojas. Plantas de sorgo tratadas con cadmio como se describe en la Figura 36. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las distintas letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Las plantas presentan dos tipos de estrategia de captación del Fe del suelo. La estrategia I, típica de dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y que consiste en la quelación del Fe (III) del suelo y su reducción a Fe (II) por la enzima quelato-férrico reductasa-oxidasa (FRO) antes de ser absorbido por las raíces a través del transportador regulado por hierro (IRT1). En esta estrategia se secretan compuestos fenólicos, protones y ácidos orgánicos para quelar el Fe del suelo (Marschner y Römheld, 1994; Kobayashi y Nishizawa, 2012). La estrategia II, típica de gramíneas, y en ella el Fe (III) del suelo es quelado por fitosideróforos e incorporado a la planta, sin ser reducido, a través de transportadores de la familia YS1 (Yellow Stripe 1) (Kobayashi y Nishizawa, 2012). No obstante, estas estrategias no son excluyentes. Por ejemplo, se ha comprobado que en arroz, pese a tener una estrategia de tipo II, presenta componentes típicos de la estrategia I (Kobayashi y Nishizawa, 2012; Wairich et al., 2019). También el sorgo es una planta con una estrategia II (Wairich et al., 2019; Prity et al., 2021), sin embargo algunas investigaciones ponen en duda esta clasificación como en Prity et al. (2021) donde la deficiencia de Fe no indujo la expresión de transportadores típicos de la estrategia II o Marschner y Römheld (1994) donde no encontraron diferencias significativas en la secreción de sideróforos en deficiencia de hierro.

Estos transportadores de Fe suponen también una vía de entrada para otros metales como el Cd o el Zn, que compiten por el Fe. En consecuencia, una alta cantidad de cadmio provoca la inducción de la expresión de genes relacionados con la deficiencia de Fe (Nakanishi et al., 2006; Yoshihara et al., 2006; Meda et al., 2007; Kobayashi y Nishizawa, 2012). Por esto, se procedió a analizar la expresión de algunos de estos genes. Concretamente, se ha estudiado la expresión de dos genes asociados a la estrategia I: *IRT1* (transportador de Fe²⁺) y *NRAMP* (Proteína Natural de Macrófago asociada a Resistencia); y otros dos de la estrategia II: *YS1* (transportador de Fe-fitosideróforos) e *IRO2* (factor de transcripción bHLH relacionado con Fe) (**Fig. 39**). En cuanto a la estrategia I, el cadmio redujo significativamente la expresión de *IRT* (**Fig. 39A**), mientras que indujo drásticamente la expresión de *NRAMP* (**Fig. 39B**), ambos casos los efectos fueron similares entre las distintas líneas de sorgo. De la estrategia II, el cadmio indujo la expresión del factor de transcripción *IRO2*, alcanzando mayores niveles de expresión en las líneas silenciadas (**Fig. 39C**). Por último, el estrés por cadmio no afectó a la expresión del gen *YS1* (**Fig. 39D**). En resumen, el cadmio incrementó la expresión de un gen de la estrategia I, el transportador *NRAMP*, y de un gen de la estrategia II, el factor de transcripción *IRO2*. Esto podría explicar la mayor acumulación de Fe y Zn observada en raíces, ya que ambos iones podrían entrar a través de la mayor cantidad de transportadores *NRAMP*. Estos resultados muestran que las plantas de sorgo responden al déficit de Fe provocado por el cadmio y que esta respuesta es diferente en el WT y en las líneas silenciadas.

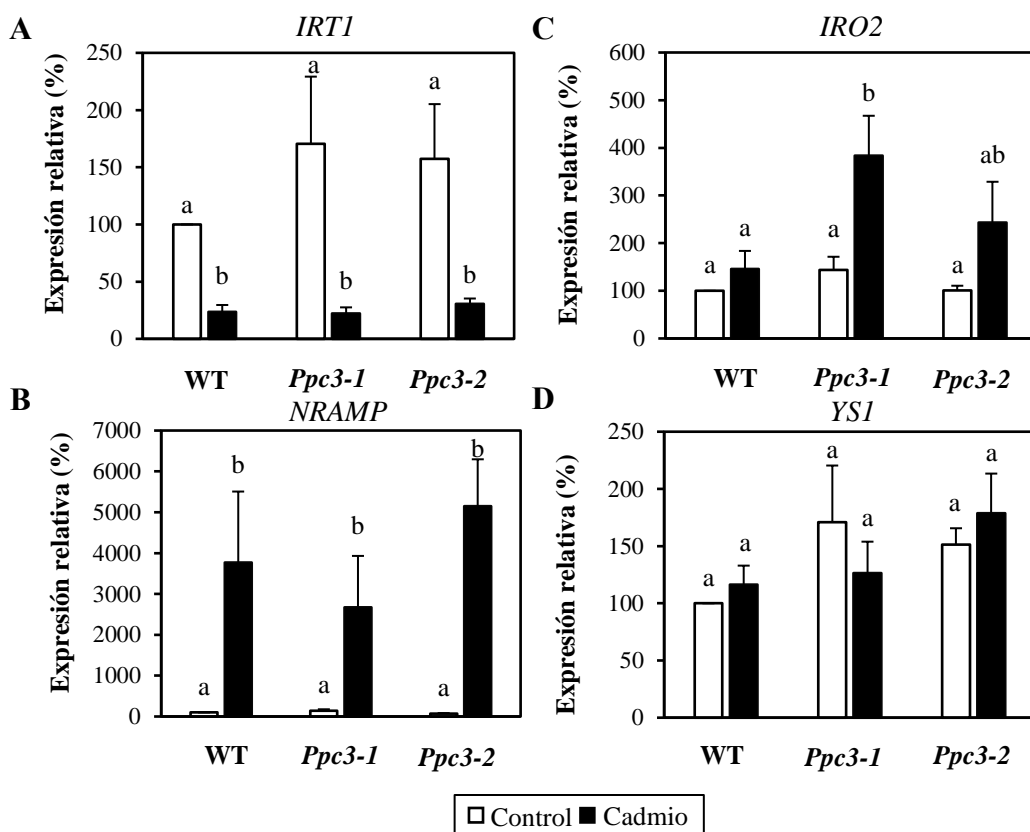


Figura 39. Efecto del cadmio sobre la expresión relativa de genes relacionados con el déficit de hierro en raíces. Plantas de sorgo tratadas con cadmio como se describe en la Figura 36. Los datos se representan en porcentaje respecto al WT control, al que se le asignó el valor de 100% para cada gen. **A.** *IRT1*. **B.** *NRAMP*. **C.** *IRO2*. **D.** *YSI*. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

1.2.3. Efectos del cadmio en la actividad PEPC y la expresión de los genes *SbPPC*

En primer lugar, se seleccionó la concentración de cadmio a utilizar en este trabajo. Para ello, se consultó la bibliografía especializada y se probaron diferentes concentraciones (0, 25, 50 y 100 μM) hasta encontrar aquella en la que se producía el mayor incremento de actividad y cantidad PEPC. Este tratamiento se llevó a cabo durante una semana en plantas WT (**Fig. 40**). El cadmio incrementó la actividad específica PEPC en raíces de forma dosis-dependiente (**Fig. 40A**), estos resultados se correlacionaron con un incremento en la cantidad de PEPC detectada por inmunodetección (**Fig. 40B**). La mayor actividad y cantidad de PEPC se alcanzó a los 100 μM de cadmio. Por tanto, esta fue la concentración empleada en los experimentos de este trabajo en tratamientos de una semana, aplicado sobre plantas de dos semanas.

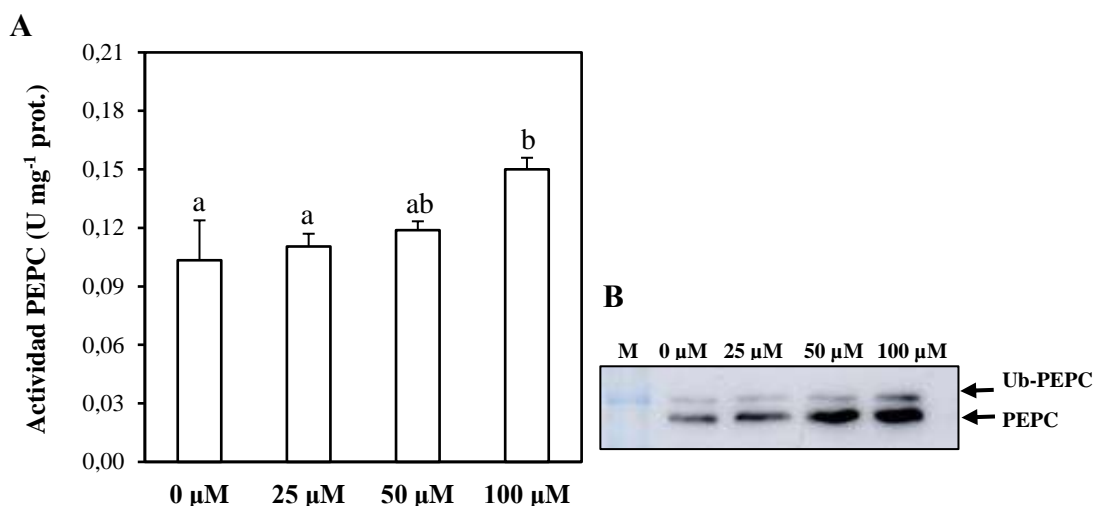


Figura 40. Efectos del cadmio en la actividad PEPC de raíces WT. Plantas de sorgo de dos semanas crecidas con medio Hewitt fueron expuestas a distintas concentraciones de acetato de cadmio (0, 25, 50 y 100 μM) durante 1 semana. **A.** Actividad específica PEPC en raíces. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$). **B.** Inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC, utilizando 50 μg de proteínas. M: marcador de peso molecular.

Al igual que en el caso del aluminio, se procedió a estudiar el papel de la isoforma SbPPC3 en el estrés por cadmio en las líneas con este gen silenciado. En *Arabidopsis*, ya se había visto que el homólogo funcional de ésta (*AtPPC3*) era inducida en presencia de cadmio (Willick et al., 2019).

En hojas, el cadmio incrementó levemente la actividad PEPC, pero no la cantidad PEPC inmunodetectada (**Fig. 41A,B**). Por otro lado, en raíces si se observó un importante incremento de la actividad PEPC únicamente en plantas WT, pero no en las líneas silenciadas. Estos resultados se correlacionaron con la cantidad de PEPC inmunodetectada. En las líneas *Ppc3* el nivel de actividad y cantidad de PEPC de raíces fue drásticamente menor que en las plantas WT (**Fig. 41C,D**). Estos resultados se correlacionaron con los niveles de expresión de *SbPPC3* en raíces. El cadmio indujo fuertemente su expresión en plantas WT, pero no en la línea silenciada. También indujo la expresión de *SbPPC2* en raíces, especialmente en la línea modificada (**Fig. 41E**). Estos resultados muestran la predominancia de la isoforma PPC3 en la respuesta al cadmio a nivel de actividad PEPC, puesto que el incremento de la expresión de *SbPPC2* no consigue reemplazar la falta de PPC3 en las líneas *Ppc3*.

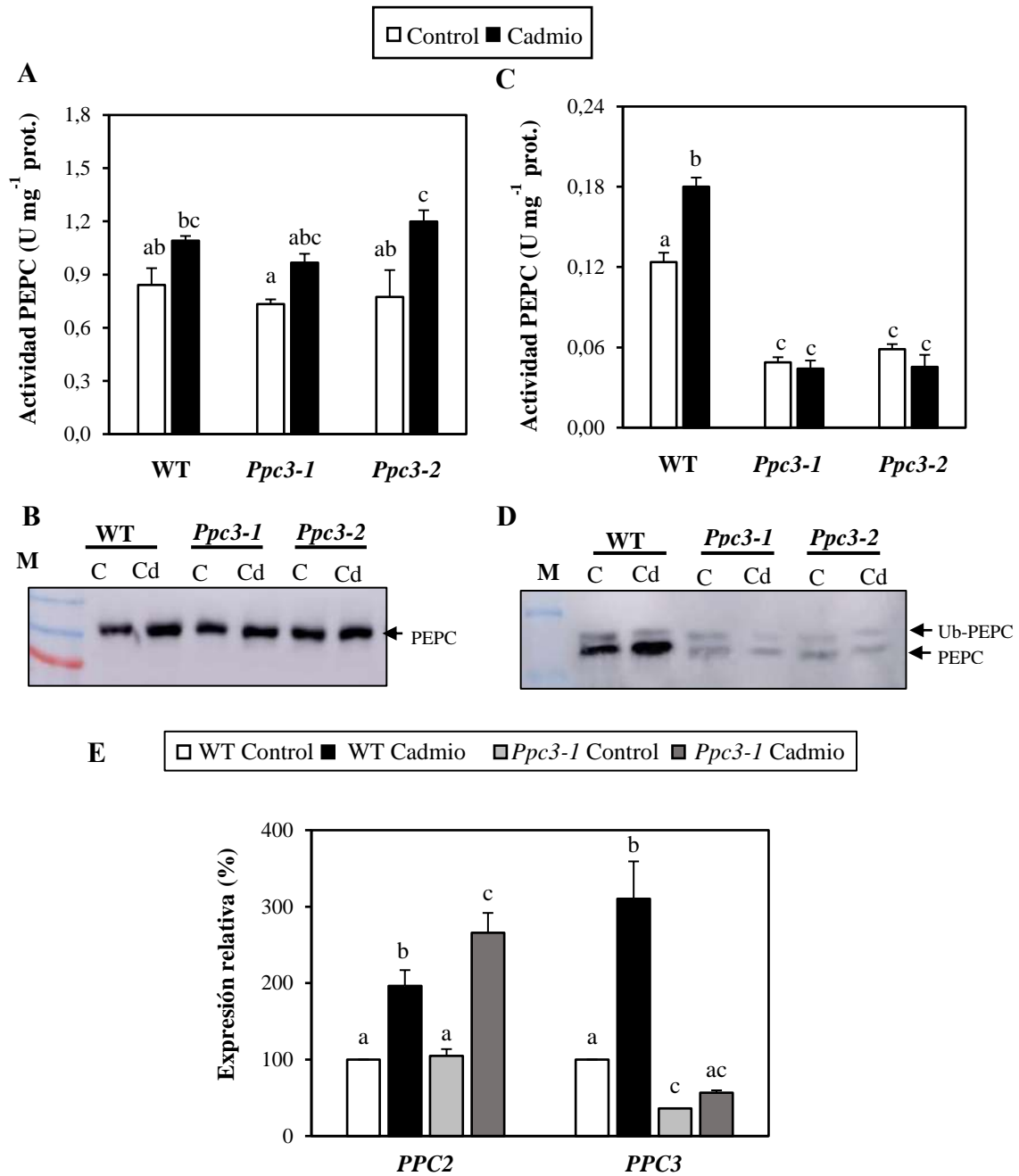


Figura 41. Efectos del cadmio sobre la actividad y expresión de SbPPC en plantas de sorgo. Plantas de sorgo fueron tratadas con 100 μ M de cadmio durante una semana. **A.** Actividad específica PEPC de hojas. **B.** Immunoblot con anticuerpos anti-PEPC de extractos de hojas con 10 μ g de proteínas. **C.** Actividad específica PEPC de raíces. **D.** Immunoblot con anticuerpos anti-PEPC de extractos de raíces con 50 μ g de proteínas. **M.** Marcador. **E.** Expresión relativa de genes SbPPC. Los datos se representan respecto al WT control, al que se le dio el valor de 100% para cada gen. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

1.2.4. Efectos del cadmio sobre la expresión de genes *SbPPCK* y la actividad *PEPCK* *in vitro*

El cadmio aumentó la expresión de *SbPPCK2* y una disminución de la expresión de *SbPPCK3* en raíces. En ambos casos, los efectos fueron mayores en la línea *Ppc3-1* (**Fig. 42A**). La actividad *PEPCK* *in vitro* aumentó en presencia de cadmio en la línea *Ppc3-1* pero no en la planta WT (**Fig. 42B,C**). Estos resultados sugieren que el aumento en la actividad *PEPCK* de la línea *Ppc3-1* podría estar asociado al aumento de expresión de *SbPPCK2*.

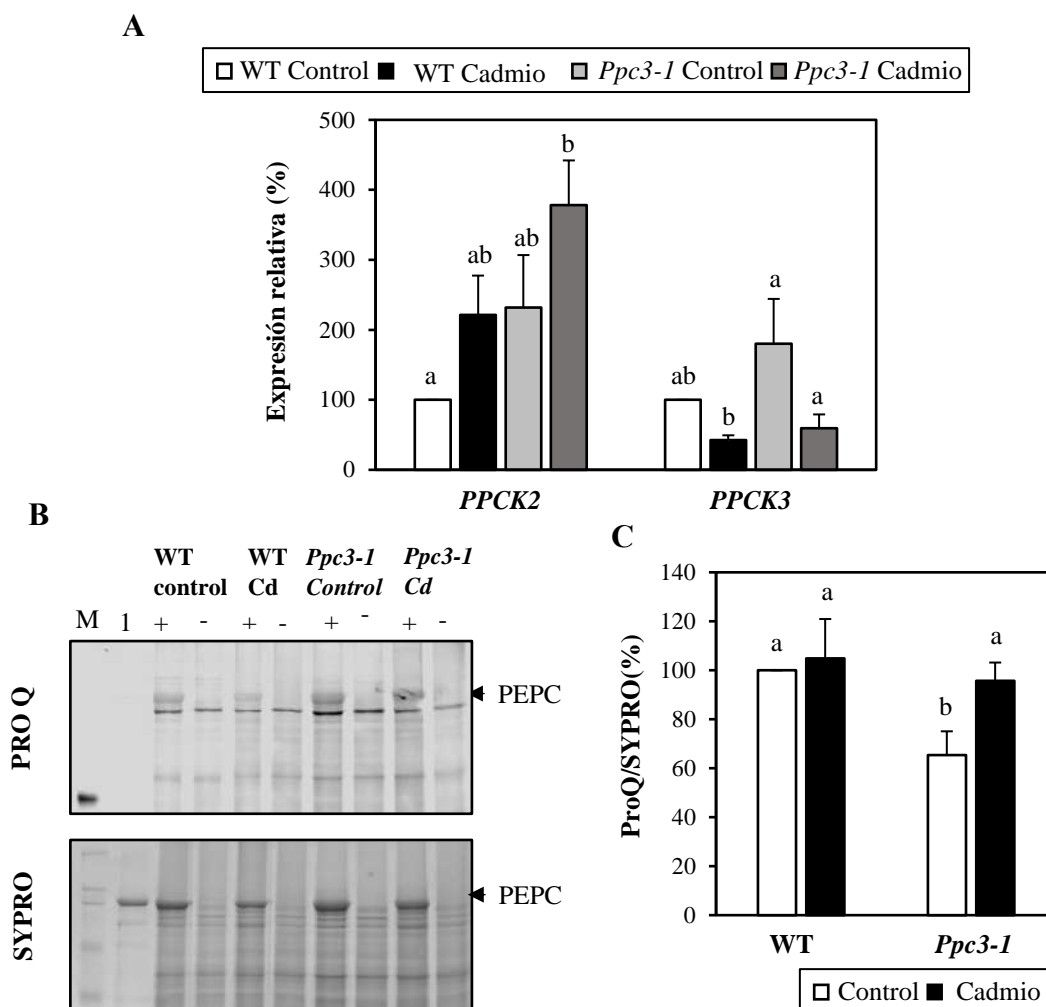


Figura 42. Efecto del cadmio sobre la expresión relativa de los genes *SbPPCK* y la actividad *PEPCK* medida *in vitro* en raíces de sorgo. Plantas de sorgo fueron tratadas con cadmio como se describe en la Figura 36. **A.** Expresión relativa de los genes *SbPPCK2* y *3*. Los datos se representan en porcentaje respecto al WT control, al que se le dio el valor de 100% para cada gen. **B.** Imagen representativa de los resultados de actividad *PEPCK* *in vitro*. La actividad *in vitro* se midió con (+) o sin (-) *PEPCK* exógena semipurificada. En el carril 1 se cargó una alícuota de *PEPCK* exógena incubada sin ATP. **C.** Se representa la ratio ProQ/SyPro en tanto por ciento, respecto a la planta WT control. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

En hojas, el cadmio disminuyó la expresión de *SbPPCK1* en plantas WT, mientras que la aumentó moderadamente en las líneas silenciadas, mientras que la expresión de *SbPPCK2* solo aumentó en hojas WT. El cadmio no afectó a la expresión de *SbPPCK3* (Fig. 43).

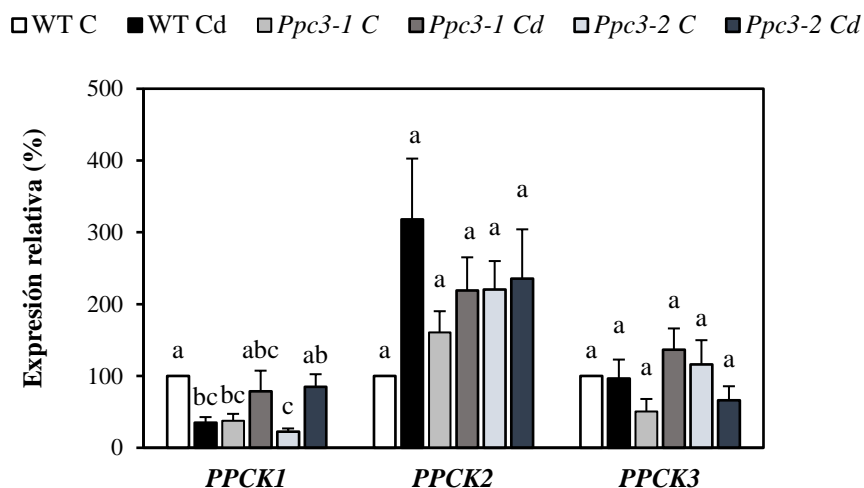


Figura 43. Efectos del silenciamiento y del estrés por cadmio sobre la expresión de genes *SbPPCK* en hojas. Las plantas de sorgo fueron tratadas con cadmio como se describe en la Figura 36. Los datos se representan en porcentaje respecto al WT control para cada gen. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P < 0,05).

1.2.5. Efectos del cadmio en la exudación de ácidos orgánicos

Al igual que en el estrés por aluminio, también se determinaron los cambios en la secreción de ácidos orgánicos como respuesta al estrés por cadmio en plantas WT y en las líneas silenciadas *Ppc3-1* y *Ppc3-2*. Para ello, plántulas de sorgo se cultivaron en botes de 50 ml con medio Hewitt. Estas fueron tratadas durante 5 días con 100 μ M de cadmio en este mismo medio. Éste fue sustituido por 35 ml de un medio consistente en 1 mM CaCl_2 y 5 μ M H_3BO_3 , con o sin 100 μ M de cadmio. El medio fue recogido después de 48 h y enviado para la determinación de los ácidos orgánicos exudados mediante espectrometría de masas.

La determinación de ácidos orgánicos permitió encontrar 4 ácidos orgánicos mayoritariamente secretados en la rizosfera: citrato, malato, succinato y lactato (Fig. 44). El cadmio incrementó severamente la cantidad de citrato exudada por las raíces, esta respuesta fue drásticamente mayor en las plantas WT que en ambas líneas silenciadas (Fig. 44A). El cadmio aumentó moderadamente la secreción de malato en la planta WT, pero no en las líneas modificadas. Además, en condiciones control el malato detectado en las líneas *Ppc3* fue menor que en la planta WT, (Fig. 44B). Estos resultados establecen una relación clara entre el contenido de citrato y malato exudado por las raíces y la actividad de la isoenzima PPC3.

Por otra parte, el cadmio provocó una reducción significativa de la cantidad de succinato y lactato secretados, que fue similar entre la planta WT y las líneas silenciadas. Cabe destacar que la cantidad tanto de succinato como de lactato fue mayor en la planta WT que en las líneas modificadas en condiciones control (**Fig. 44C,D**).

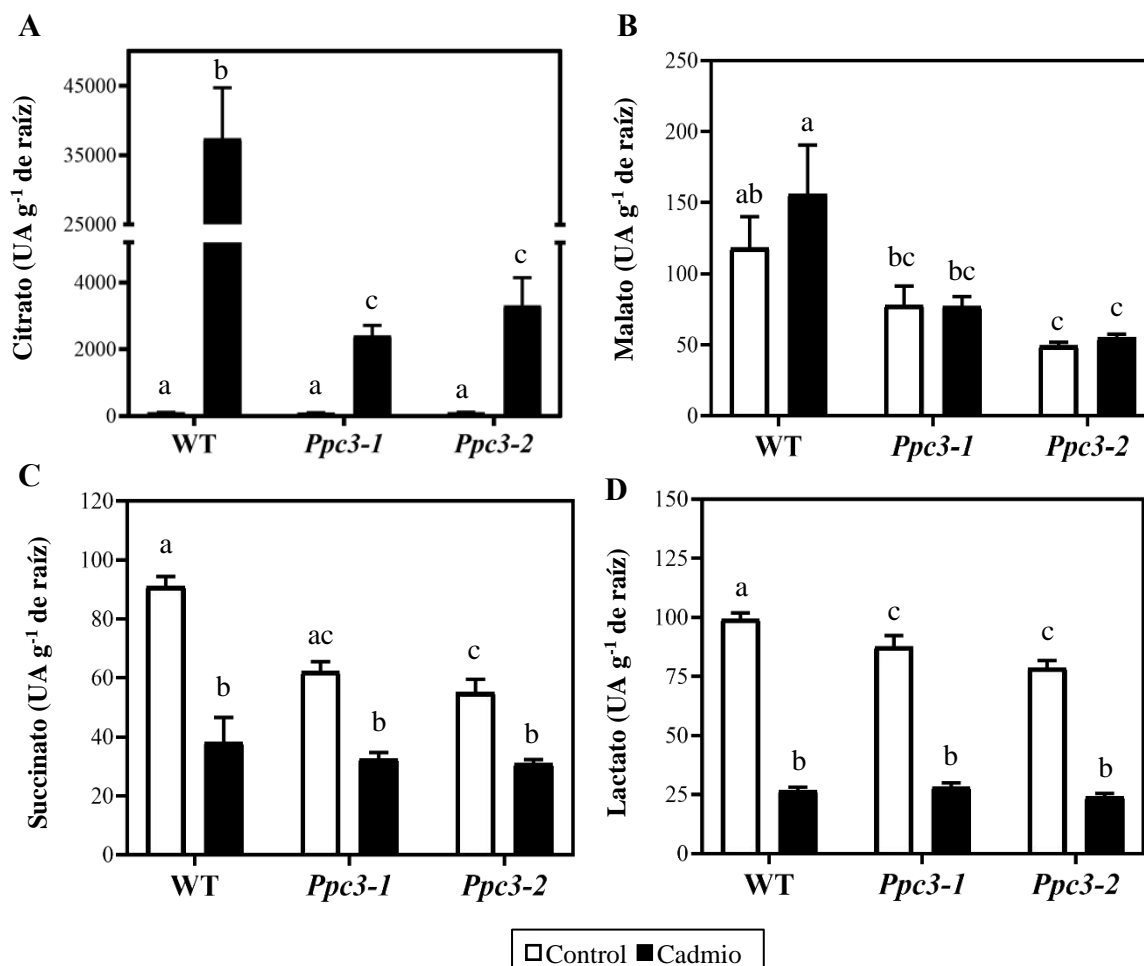


Figura 44. Determinación de ácidos orgánicos exudados por raíces de plantas de sorgo tratadas con cadmio. Se determinaron los ácidos orgánicos presentes en los exudados radicales de plantas de sorgo. Las plantas de 8 días pasaron a medio Hewitt con o sin 100 μM de cadmio durante 5 días. Finalmente, el medio fue sustituido con una solución de 1 mM CaCl_2 , 5 μM H_3BO_3 a pH 4,5 en control, sin o con 100 μM de cadmio, para las condiciones control y de tratamiento con cadmio, respectivamente. El medio fue recogido y enviado para su análisis mediante espectrometría de masas. **A.** Citrato. **B.** Malato. **C.** Succinato. **D.** Lactato. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Games-Howell, $P < 0,05$).

En estas condiciones también se cuantificó la actividad PEPC de las raíces. Se confirmó nuevamente que el cadmio incrementaba significativamente la actividad PEPC en raíces de la planta WT, pero no en las líneas silenciadas, en las que la actividad PEPC de raíces fue significativamente menor en todas las condiciones comparándolas con la actividad medida en la planta WT control (**Fig. 45**).

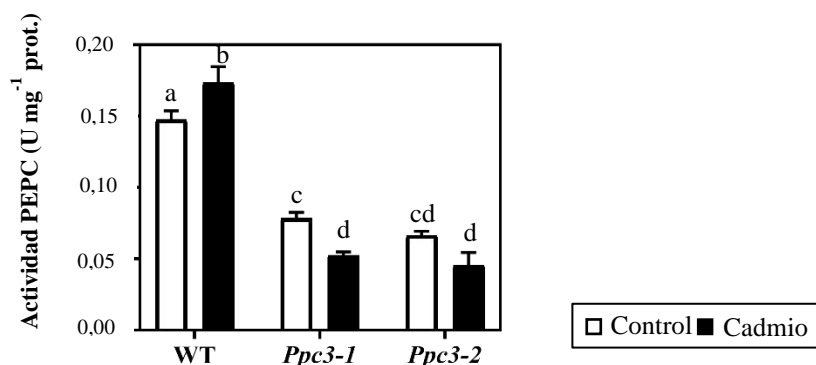


Figura 45. Actividad PEPC medida en raíces de plantas de sorgo tratadas con cadmio. Las plantas fueron cultivadas como se describe en la Figura 44. Se cuantificó la actividad PEPC y el contenido de proteínas a partir de los extractos crudos de las raíces. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las distintas letras denotan diferencias significativas (Duncan, P < 0,05).

1.2.6. Efectos del silenciamiento de *SbPPC3* en la acumulación de cadmio en raíces

Por último, se determinó la cantidad de cadmio presente en raíces mediante espectrofotometría de absorción atómica para estudiar si los cambios en la actividad PEPC y en la secreción de ácidos orgánicos detectados en las líneas silenciadas afectaban a la entrada y acumulación de cadmio en estas plantas. El cadmio en raíces fue cuantificado a la semana y a las dos semanas de tratamiento. Se observó que en la primera semana las líneas *Ppc3* absorbieron una menor cantidad de cadmio, mientras que a la segunda semana el nivel de cadmio alcanzado en estas líneas fue similar al encontrado en las raíces WT. Al analizar la variación entre ambas semanas de tratamiento, se observa que el incremento es mucho mayor en las líneas silenciadas (**Tabla 7**).

Tabla 7. Efecto del silenciamiento sobre la acumulación de cadmio en raíces. Plantas de sorgo de dos semanas crecidas con medio Hewitt fueron expuestas a 100 μ M de cadmio durante 1 ó 2 semanas. Se muestra la cantidad de cadmio en raíces como la media \pm EE (n = 3) a la primera y la segunda semana. Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, P < 0,05). También se muestra la variación en el contenido de cadmio entre ambas semanas (Δ).

	Semana 1	Semana 2	Δ
WT	3429 \pm 144 ^a	3975 \pm 322 ^a	545
<i>Ppc3-1</i>	2479 \pm 106 ^b	4040 \pm 519 ^a	1561
<i>Ppc3-2</i>	2257 \pm 49 ^b	3754 \pm 250 ^a	1497

2. EFECTOS DEL DÉFICIT DE FÓSFORO EN PLANTAS DE SORGO CON EL GEN *SbPPC3* SILENCIADO POR ARNi

El fósforo es uno de los elementos esenciales más limitantes en la producción agrícola debido a su baja biodisponibilidad (Hammond et al., 2004; López-Arredondo et al., 2014; Daneshgar et al., 2018). Por este motivo, las plantas presentan un amplio abanico de respuestas encaminadas al aumento de la solubilización, de la captación y de la eficiencia en el uso del mismo dentro del metabolismo de la planta (Hammond et al., 2004; Pandey et al., 2014), como se explicó en la “Introducción”.

Las plantas absorben el fósforo en forma de fosfato inorgánico (Pi). Éstas aumentan la solubilización del Pi presente en los suelos mediante diversas estrategias como el bombeo de protones, la secreción de fosfatasas o la secreción de ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato (Ryan et al., 2001). La secreción de estos ácidos constituye una de las respuestas más importantes y comunes frente a la deficiencia de fósforo, habiendo sido descrita en una gran cantidad de especies vegetales (López-Arredondo et al., 2014). Dicha respuesta está asociada a cambios en la actividad de distintas enzimas metabólicas, entre las que destacan las enzimas del ciclo de Krebs como la MDH o CS, y también otras como la PEPC (Hammond et al., 2004; Neumann y Römheld, 2012; López-Arredondo et al., 2014). Además de este papel en la secreción de ácidos orgánicos, la PEPC también puede tener gran importancia en condiciones de deficiencia de P al constituir una ruta alternativa a la PK en la glucólisis (Plaxton y Tran, 2011; Neumann y Römheld, 2012).

En este sentido, la expresión del gen *AtPPC3* se induce en raíces de *Arabidopsis* por la deficiencia de P (Gregory et al., 2009; Feria et al., 2016), por lo que su homólogo funcional en sorgo, *SbPPC3*, podría también participar en la respuesta a este estrés abiótico en raíces de sorgo. Por este motivo, se estudiarán durante este capítulo los efectos fisiológicos de la falta de P en las plantas de sorgo, y el papel que juega *SbPPC3* en dichas respuestas.

2.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y FUENTE DE FÓSFORO SUMINISTRADO A PLANTAS DE SORGO

En este capítulo se estudiaron los efectos de la deficiencia de P sobre plantas de sorgo. Para ello, se llevaron a cabo experimentos aportando en el medio hidropónico dos fuentes distintas de este macronutriente (fosfato soluble (Ps) o fosfato insoluble (PCa)), en distintas concentraciones (100, 300, 600 y 1340 μM NaH_2PO_4 para Ps; 50, 150, 300 y 670 μM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ para PCa). Los tratamientos se aplicaron durante 3 semanas, tras las cuales se cuantificaron varios parámetros de crecimiento vegetativo y el contenido de fósforo total en las raíces. Este se realizó en plantas WT y en las líneas silenciadas (*Ppc3-1* y *Ppc3-2*). Por otro lado, se realizó un experimento con la planta WT en tres condiciones distintas: control (C) (1340 μM de NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) y con fosfato insoluble (670 μM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). En este segundo experimento se analizó un mayor número de

parámetros, como medidas biométricas y fisiológicas como la fotosíntesis o la acumulación de antocianinas. Estos parámetros se analizaron en la segunda y tercera semana de tratamiento. En todas las condiciones, el resto de macro y micronutrientes esenciales se aportó en la forma y concentraciones del medio Hewitt (1966), tal y como se indica en “materiales y métodos”.

En primer lugar, tras tres semanas de tratamiento con las distintas concentraciones de Ps y PCa descritas anteriormente, se realizaron distintos análisis biométricos de las líneas WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*. Se observó un marcado efecto negativo del tratamiento PCa sobre el crecimiento de las plantas de sorgo respecto a concentraciones equimolares de fósforo de los tratamientos Ps. En el tratamiento PCa, el crecimiento se vio seriamente afectado en todas las concentraciones, salvo en la más elevada ($670 \mu\text{M Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), tratamiento con el que se observó un mejor crecimiento de la planta, aunque siempre menor que el tratamiento con una concentración equimolar de fosfato soluble ($1340 \mu\text{M NaH}_2\text{PO}_4$) (**Fig. 46**).

La altura de la planta se vio afectada tanto por el tipo de fosfato como por la concentración del mismo. En el caso del tratamiento Ps, a concentraciones bajas (100 y 300 μM) se observó una reducción de la altura de la planta en comparación con concentraciones mayores (600 y 1340 μM), aunque no se detectaron diferencias entre las distintas líneas analizadas (**Fig. 47**). Sin embargo, a estas concentraciones altas de fosfato sódico sí que se detectó una menor altura de las plantas silenciadas en comparación con la línea WT, sobre todo para la línea *Ppc3-2* (**Fig. 47**). La presencia de fosfato cálcico como fuente de P se tradujo en una reducción importante de la altura de las plantas en comparación con concentraciones equimolares de fosfato soluble. Sólo a concentraciones altas de fosfato cálcico (300 y 670 $\mu\text{M Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) se observó un ligero aumento de la altura de la planta, aunque siempre muy inferior a la altura correspondientes con fosfato soluble. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas líneas a ninguna concentración de fosfato insoluble (**Fig. 47**).

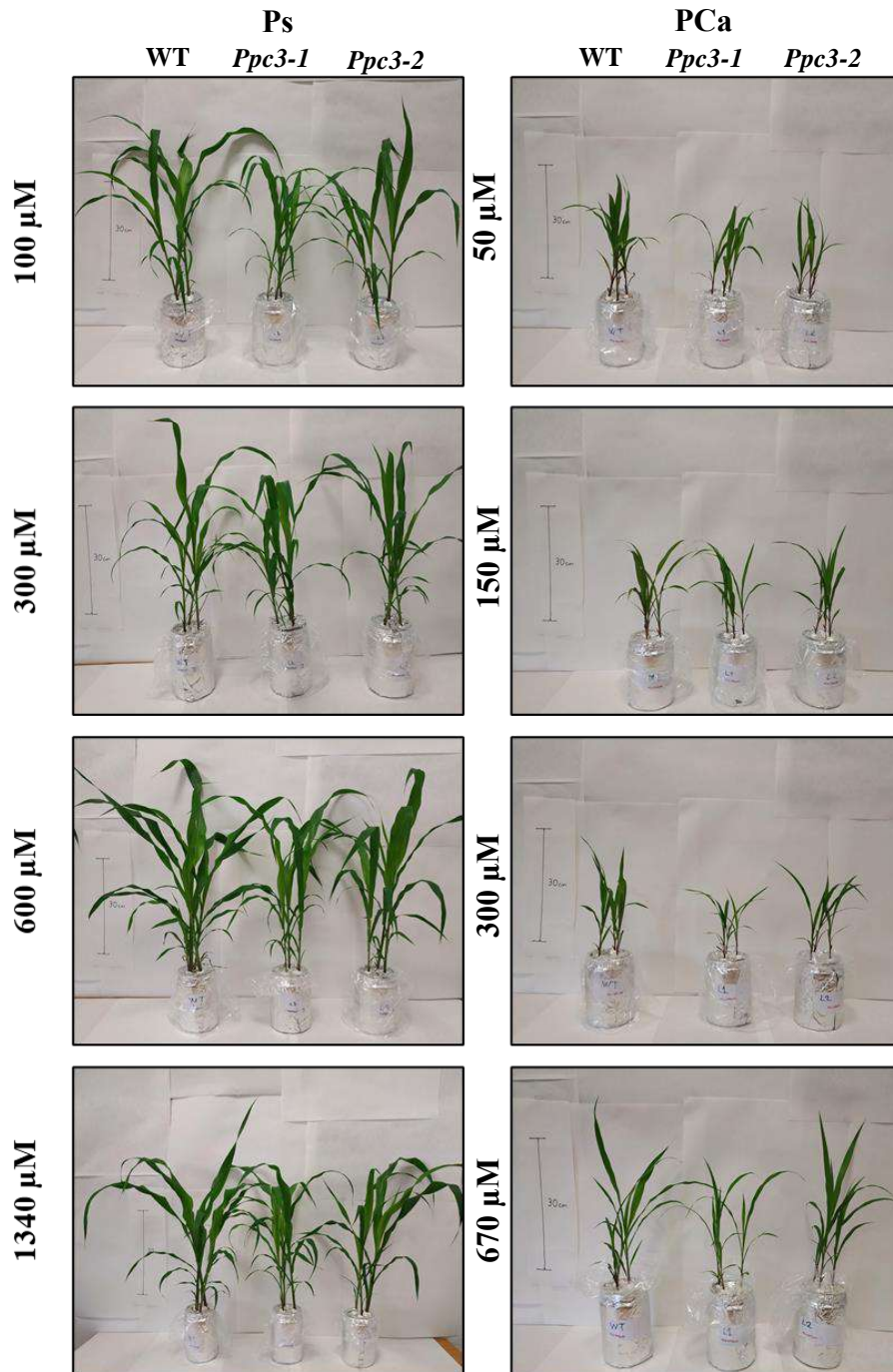


Figura 46. Efectos del tratamiento con distintos niveles de P sobre el crecimiento de plantas de sorgo. Las plantas líneas de sorgo WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2* se crecieron en medio Hewitt con diferentes concentraciones de fosfato soluble (100, 300, 600 y 1340 μM NaH_2PO_4 [Ps]) o de fosfato insoluble (50, 150, 300 y 670 μM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [PCa]) durante tres semanas. Las imágenes corresponden a las diferentes líneas tras 3 semanas de tratamiento.

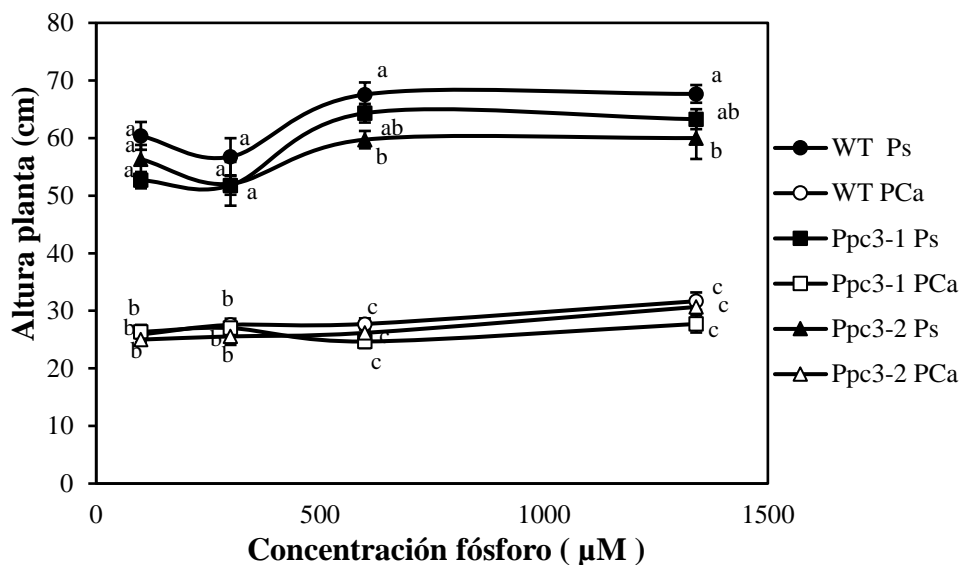


Figura 47. Efectos de la concentración y fuente de fósforo sobre la altura de plantas de sorgo. Las plantas de sorgo crecieron en medio Hewitt con diferentes concentraciones de fosfato soluble (100, 300, 600 y 1340 μM NaH_2PO_4 [Ps]) o de fosfato insoluble (50, 150, 300 y 670 μM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [PCa]) durante tres semanas. Tras el tratamiento se midió la altura de la planta desde la base del tallo hasta la hoja más alta. Se representa la longitud de la parte aérea como la media \pm EE ($n = 9$). Las letras denotan diferencias significativas dentro de cada concentración de fosfato empleada (Duncan, $P < 0,05$).

Resultados similares se observaron al analizar la producción de biomasa de la parte aérea de las plantas. Ésta presentó mayor peso fresco a mayor concentración de Ps, siendo observable, principalmente, en las dos concentraciones más altas de esta fuente de P (600 y 1340 μM NaH_2PO_4). Al igual que en las medidas de altura, se observó que en estas dos concentraciones la producción de biomasa de la parte aérea fue significativamente menor en las dos líneas silenciadas (**Fig. 48A**). Sin embargo, en el tratamiento PCa no se observó un incremento de la producción de biomasa al aumentar la concentración de éste, y tampoco se encontraron diferencias significativas entre la línea WT y las líneas silenciadas *Ppc3-1* y *Ppc3-2* (**Fig. 48B**). Resultados similares fueron obtenidos en el caso de la producción en biomasa de raíces para ambos tipos de fuentes de P (**Fig. 48C,D**).

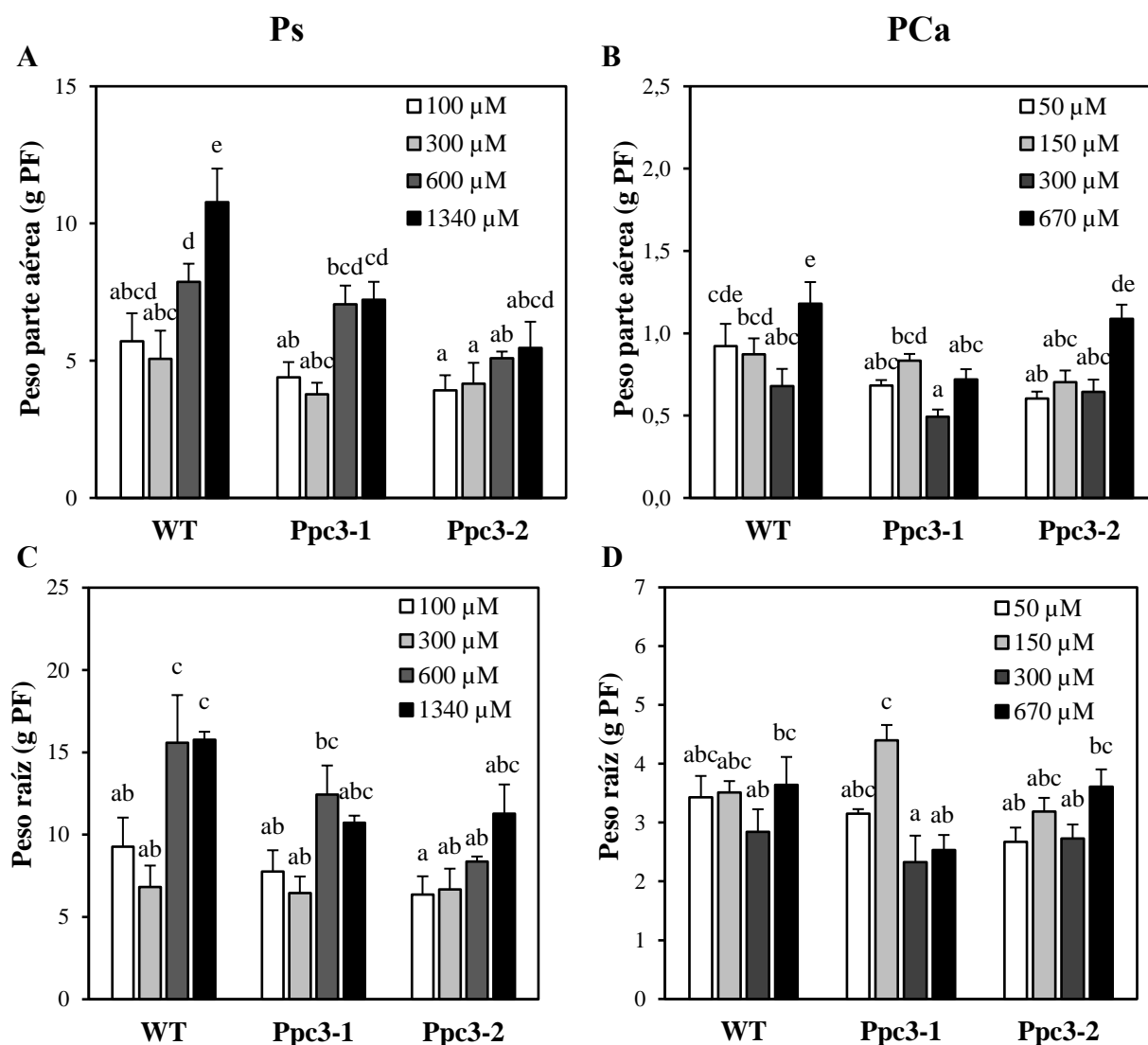


Figura 48. Efectos de la concentración y tipo de fósforo sobre la producción de peso fresco de las plantas de sorgo. Las plantas de sorgo (WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*) se cultivaron en medio Hewitt con diferentes concentraciones de fósforo como se indica en la Figura 46. Tras 3 semanas de tratamiento, las plantas se recolectaron y se pesaron los tejidos. **A.** Peso fresco de la parte aérea en el tratamiento Ps. **B.** Peso fresco de la parte aérea en el tratamiento PCa. **C.** Peso fresco de raíces en el tratamiento Ps. **D.** Peso fresco de raíces en el tratamiento PCa. Los datos son la media \pm EE ($n = 9$ para la parte aérea y $n = 3$ para las raíces. Para el caso de hojas, cada réplica biológica supone el peso de la parte aérea de 1 planta; para las raíces cada réplica biológica supone el peso de las raíces de 3 plantas). Las letras denotan diferencias significativas dentro de cada concentración de fósforo empleada (Duncan, $P < 0,05$).

Al analizar las medidas de biomasa en término de peso seco, los resultados obtenidos fueron, en general, similares a los de peso fresco (**Fig. 49**). En hojas, al incrementar la concentración de Ps aumentó la biomasa seca, siendo este aumento significativamente mayor en las plantas WT que en las líneas modificadas en las concentraciones más altas de Ps (**Fig. 49A**). En el tratamiento PCa no se observaron grandes diferencias ni entre las distintas líneas ni al elevar su concentración (**Fig. 49B**). En raíces, no hubo diferencias significativas de la biomasa seca con las concentraciones más bajas de Ps y PCa. Sin embargo, a las concentraciones más altas de PS, la biomasa seca aumentó

significativamente. El peso seco de raíces en estas concentraciones fue ligeramente inferior en las líneas modificadas que en la WT (**Fig. 49C,D**).

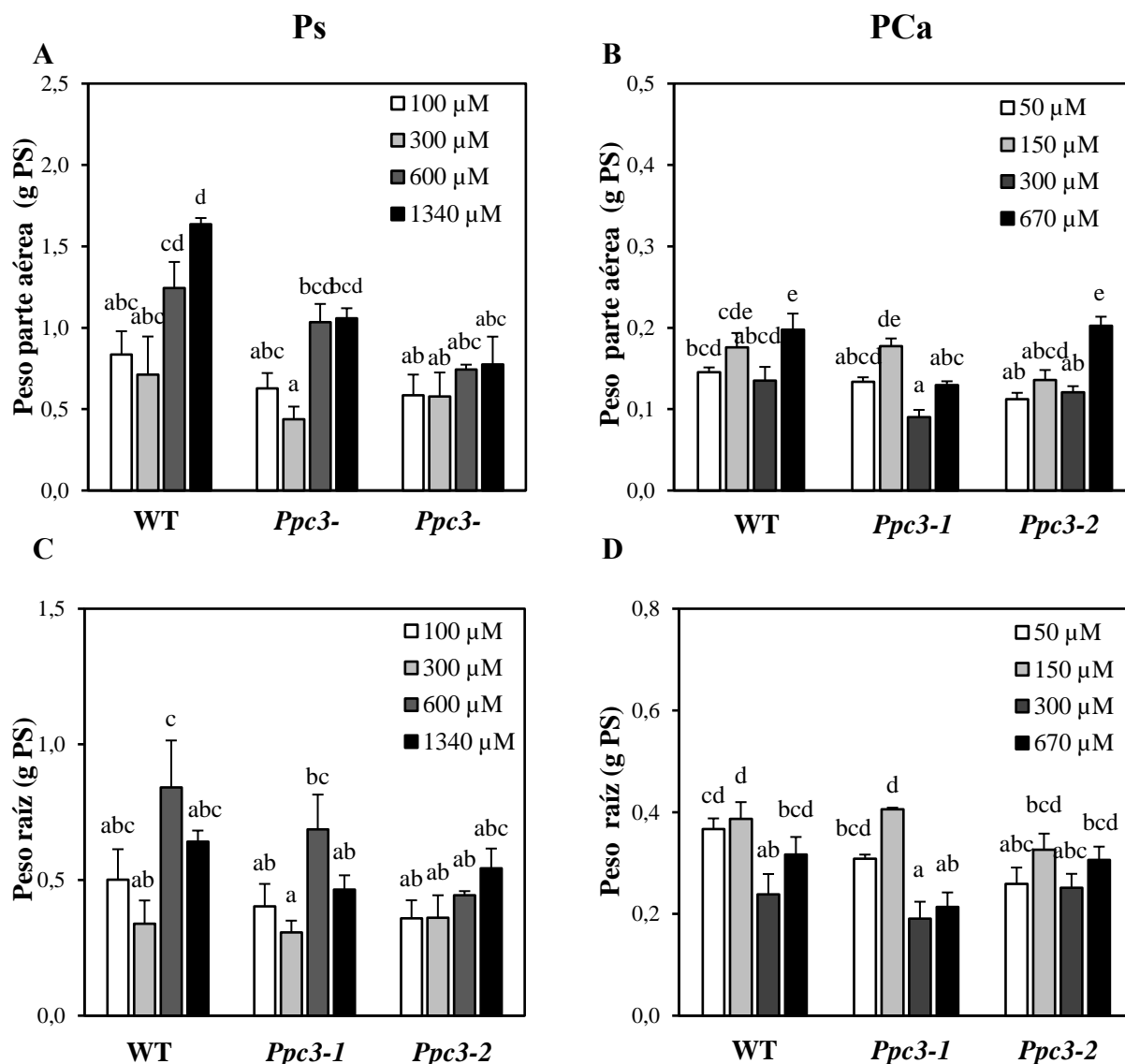


Figura 49. Efectos de la concentración y tipo de fosfato sobre la producción de biomasa seca en plantas de sorgo. Las plantas de sorgo (WT, *Ppc3-1*, *Ppc3-2*) se cultivaron en medio Hewitt con diferentes concentraciones de fosfato como se indica en la Figura 46. Tras 3 semanas de tratamiento se recolectaron y se pesaron los tejidos, obteniendo el peso seco de los mismos como se indica en materiales y métodos (sección 1.2). **A.** Peso seco de la parte aérea en el tratamiento con Ps. **B.** Peso seco de la parte aérea en el tratamiento con PCa. **C.** Peso seco de raíces en el tratamiento con Ps. **D.** Peso seco de raíces en el tratamiento con PCa. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$, cada réplica biológica supone el peso seco de la parte aérea o de raíces de 3 plantas). Las letras denotan diferencias significativas dentro de cada concentración de Pi empleada (Duncan, $P < 0,05$).

Debido al papel que juega la PEPC en las respuestas a la falta de P en raíces de otras plantas (Gregory et al., 2009; Feria et al., 2016), analizamos la actividad de esta enzima en las raíces recolectadas anteriormente. De nuevo, se confirmó la eficiencia del silenciamiento de *SbPPC3*, puesto que la actividad PEPC de raíces fue siempre muy superior en plantas WT que en las líneas modificadas (**Fig. 50**). Se observó una relación inversa entre la concentración de Ps y la actividad PEPC en todas las líneas, es decir, al

aumentar la concentración de Ps, disminuía la actividad PEPC (**Fig. 50A**). Sin embargo, en el tratamiento PCa se detectó un aumento de la actividad PEPC en la línea WT al aumentar la concentración de fosfato cálcico. A las concentraciones de 300 y 670 μM de fosfato cálcico se detectó el doble de actividad PEPC que a concentraciones equimolares de fosfato soluble (600 y 1340 μM NaH_2PO_4). Además, las líneas silenciadas presentaron menor nivel de actividad PEPC respecto a las plantas WT en todas las concentraciones (**Fig. 50B**).

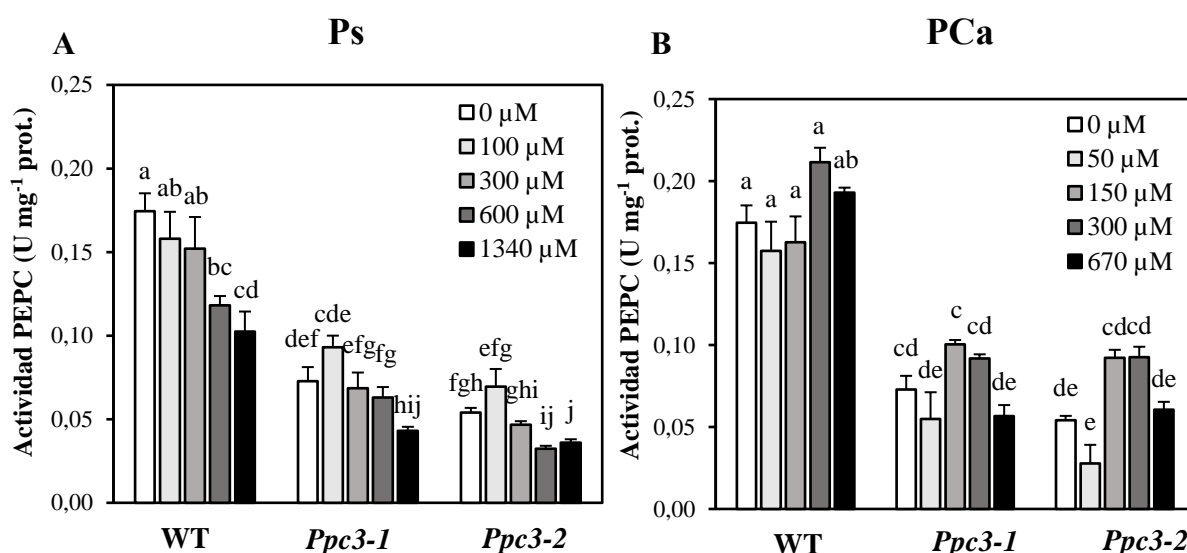


Figura 50. Efectos de la concentración y tipo de fosfato sobre la actividad PEPC en raíces de sorgo. Las plantas de sorgo (WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*) se cultivaron en medio Hewitt con diferentes concentraciones de fosfato soluble como se indica en la Figura 46. Las medidas fueron realizadas al finalizar el tratamiento. **A.** Medida de actividad PEPC en extractos de raíces de plantas del tratamiento Ps. **B.** Medida de actividad PEPC en extractos de raíces de plantas del tratamiento PCa. Se representa la actividad PEPC como la media \pm EE ($n = 3$, donde cada réplica biológica corresponde a las raíces de 3 plantas distintas). Las letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

Finalmente, para determinar si todos los efectos encontrados anteriormente según la línea de sorgo y la fuente y concentración de P suministrada se relacionaban con una distinta acumulación de este elemento en la planta, se cuantificó el contenido de fósforo total en raíces de sorgo en todas las condiciones analizadas. El aumento de la concentración de P aplicado, tanto en forma de fosfato soluble como de fosfato cálcico, provocó un incremento en la concentración de fósforo en todas las líneas (**Fig. 51**). No se detectaron diferencias en el contenido de fósforo entre las raíces WT y de las líneas silenciadas en ninguno de los tratamientos Ps (**Fig. 51A**). Sin embargo, en los tratamientos con mayor concentración de fosfato cálcico, las líneas de sorgo modificadas presentaron un menor contenido de fósforo en raíces, diferencia destacable tan sólo en la concentración más alta (**Fig. 51B**).

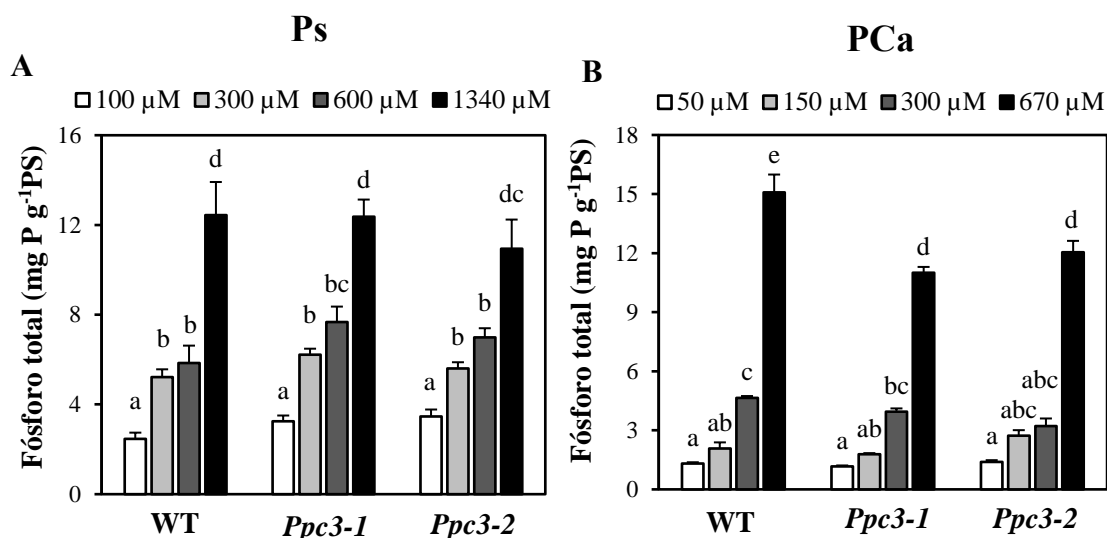


Figura 51. Efectos de la concentración y tipo de fósforo aplicado sobre el contenido de fósforo en raíces de sorgo. Las plantas de sorgo (WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*) se cultivaron en medio Hewitt con diferentes concentraciones de fósforo soluble como se indica en la Figura 46. Las medidas fueron realizadas al finalizar el tratamiento. El tejido seco fue calcinado en horno de mufla y la cantidad de fósforo total fue determinada como se indica en materiales y métodos. **A.** Medida de fósforo total en raíces de plantas tratadas con fósforo soluble. **B.** Medida de fósforo total en raíces de plantas tratadas con fósforo cálcico. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$, donde cada réplica biológica corresponde a las raíces de 3 plantas distintas). Las letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

Las mayores diferencias de comportamiento entre las plantas WT y las líneas silenciadas *Ppc3* tenían lugar en las concentraciones más altas estudiadas, es decir, 1340 μM de NaH_2PO_4 y 670 μM de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Cabe destacar que fue a esta concentración de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ la única condición donde se observó un menor contenido de fósforo en las raíces de las líneas modificadas en comparación con las plantas WT. Esto podría indicar una menor capacidad de solubilización de esta forma de P por parte de las líneas silenciadas. En consecuencia, serán estas dos concentraciones de P, junto a un tratamiento sin nada de P, las empleadas en los siguientes apartados de este capítulo.

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN PLANTAS WT DE SORGO

En los siguientes apartados se emplearon las dos fuentes de P a su máxima concentración tal y como se determinó anteriormente, es decir 1340 μM de NaH_2PO_4 considerado como condiciones control (C), y 670 μM de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PCa). Además, se utilizó un tercer tratamiento sin ninguna fuente de fósforo (-P). En este bloque se empleó únicamente la planta WT y se cuantificaron distintos parámetros en la segunda y tercera semana de tratamiento con el objetivo de determinar la duración óptima del mismo, para, posteriormente, utilizar esa duración en el estudio comparativo entre plantas WT y *Ppc3*.

2.2.1. Influencia del déficit de fósforo sobre el crecimiento

En primer lugar, se determinó semanalmente el crecimiento de las plantas de sorgo WT en cada tratamiento (Control, -P y PCa), midiendo la altura de la planta y la longitud máxima de las raíces. Los resultados obtenidos mostraron que el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de las plantas de sorgo empezaba a apreciarse a partir de la segunda semana, sin observarse diferencias significativas al finalizar la primera semana de tratamiento, ni en el crecimiento de la parte aérea ni en el de las raíces (Fig. 52A,B).

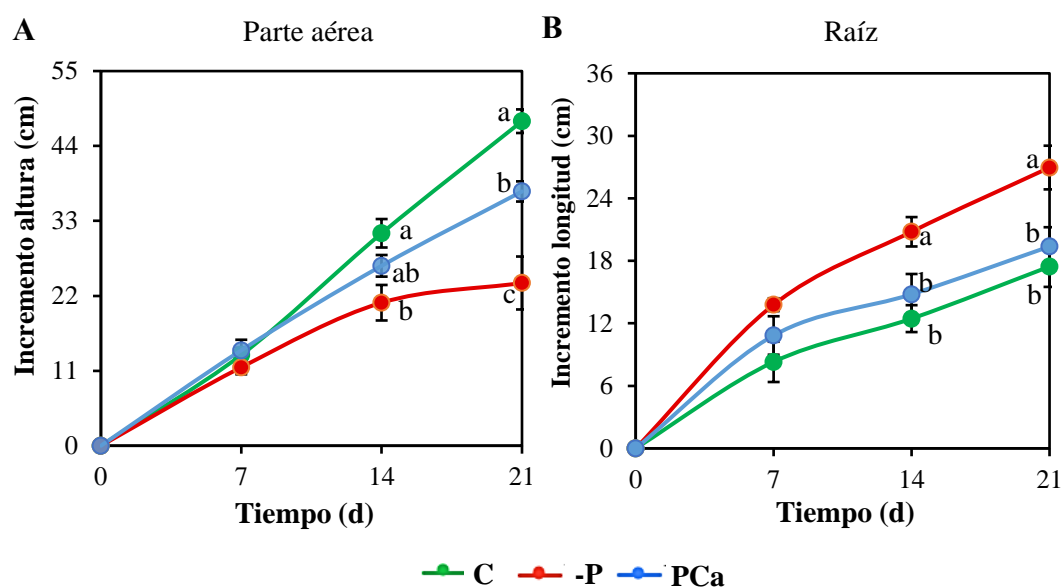


Figura 52. Efecto del déficit de fósforo sobre el crecimiento de plantas de sorgo WT. Las plantas de sorgo WT se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) durante tres semanas. Las medidas fueron tomadas semanalmente y calculadas respecto a la longitud inicial. **A.** Altura de la parte aérea. **B.** Longitud máxima de las raíces. Los datos son la media \pm EE ($n = 6$; para la altura de la planta cada réplica biológica supone la medida de 3 plantas; para la longitud de las raíces cada réplica biológica supone la longitud máxima de raíz de 3 plantas distintas). Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos dentro de cada semana (Duncan, $P < 0,05$).

En general, la falta total de P (-P) redujo notablemente el crecimiento en altura de las plantas a partir de la segunda semana, reduciendo en más de un 50% la altura respecto de las plantas con fosfato soluble (C) al final de la tercera semana de tratamiento. El tratamiento PCa produjo unos niveles de crecimiento en altura intermedios entre las dos condiciones anteriores (**Fig. 52A**). Por el contrario, la longitud de las raíces aumentó en falta de P, siendo los cambios nuevamente significativos a partir de la segunda semana de tratamiento. En el tratamiento PCa se observó un crecimiento intermedio, aunque en este caso no fue significativamente diferente a los obtenidos en las condiciones control (**Fig. 52B**). Estos cambios se tradujeron en un aumento en el ratio raíz/parte aérea en condiciones de deficiencia de P (**Fig. 53**).

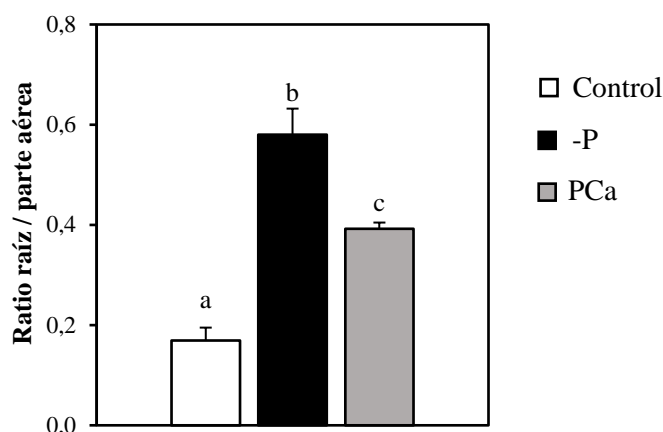


Figura 53. Efecto del déficit de fósforo sobre el ratio raíz/parte aérea en peso seco plantas de sorgo WT. Las plantas de sorgo WT se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) durante tres semanas. El ratio fue calculado a partir del peso seco de raíces y de la parte aérea. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos dentro de cada semana (Duncan, $P < 0,05$).

2.2.2. Determinación del grado de estrés provocado por la falta de fósforo

Con el objetivo de determinar el efecto de la deficiencia de P sobre la capacidad fotosintética de la planta (Xu et al., 2007; Lin et al., 2009), se midió la fotosíntesis neta (A) y la conductancia estomática (gs) en las plantas de sorgo sometidas a los tratamientos anteriores. Como indicador de estrés por falta de P se midió el contenido de antocianinas en hojas, uno de los síntomas más comunes en las plantas sometidas a este estrés (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011; Henry et al., 2012; Wang y Liu, 2018).

En la semana 2, la fotosíntesis neta disminuyó como consecuencia del déficit de P, aunque las diferencias no fueron significativas (**Fig. 54A**). Por otra parte, la ausencia de P disminuyó significativamente la conductancia estomática, mientras que el tratamiento PCa recuperó levemente estos valores (**Fig. 54B**). En la semana 3, los efectos de la deficiencia de P observados en ambos parámetros fueron más severos. La ausencia de P redujo drásticamente la fotosíntesis neta, mientras que el tratamiento PCa se tradujo en

un valor de A intermedio entre las condiciones control y la ausencia de P (**Fig. 54C**). Resultados similares fueron obtenidos para la conductancia estomática, la cual disminuyó severamente en ambos tratamientos (-P y PCa), aunque en el tratamiento PCa se obtuvo un valor g_s intermedio (**Fig. 54D**).

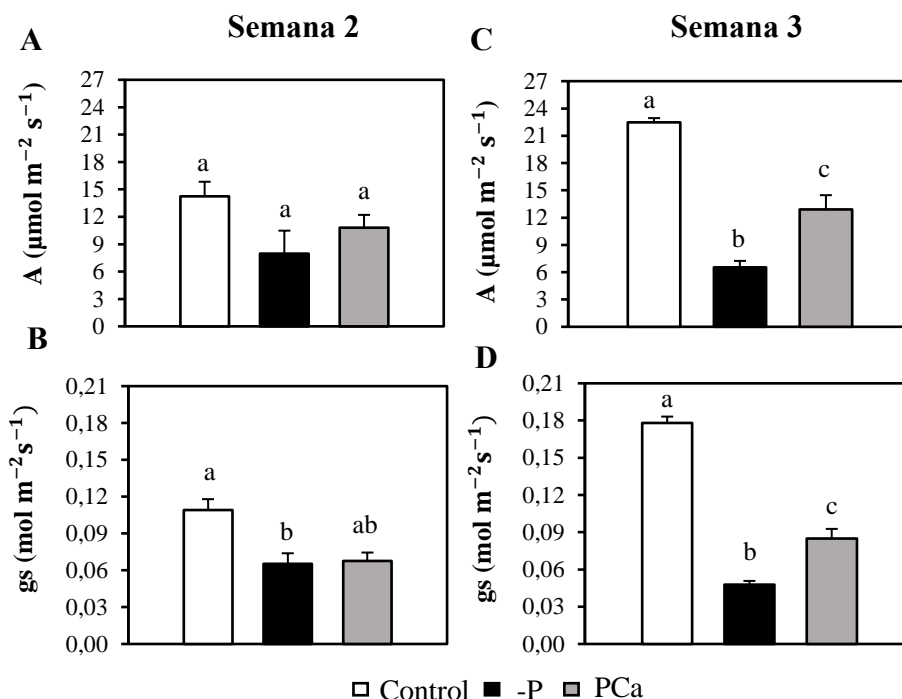


Figura 54. Efectos de la falta de fósforo sobre en la actividad fotosintética en sorgo WT. Las plantas de sorgo se cultivaron como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron a la segunda y tercera semana de tratamiento. Fotosíntesis neta tras 2 (**A**) y 3 (**C**) semanas de tratamiento. Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Games-Howell, $P < 0,05$). Conductancia estomática (g_s) a la 2ª (**B**) y 3ª (**D**) semana de tratamiento. Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$). Los datos son la media \pm EE ($n = 6$) y ($n = 8$) para las medidas a la segunda y tercera semana de tratamiento, respectivamente.

Por otro lado, se analizó la acumulación de antocianinas en las hojas de las plantas de sorgo sometidas a los distintos tratamientos de P. A las dos semanas se observó un ligero aumento en las plantas -P y con fosfato insoluble respecto a las condiciones control, aunque no significativo. Sin embargo, tras 3 semanas de tratamiento, tanto las plantas -P como PCa mostraron un aumento significativo de las antocianinas acumuladas en las hojas respecto a las plantas control, ligeramente superior en las plantas -P que en las PCa (**Fig. 55A,B**).

Por consiguiente, tanto los resultados de la actividad fotosintética como de la acumulación de antocianinas muestran que los efectos del estrés por falta de fósforo sólo eran significativos en la tercera semana de tratamiento, pero no en la segunda, confirmando que este tiempo de tratamiento es el adecuado para realizar el estudio de la falta de P. Además, hay que destacar que el fosfato cálcico supone un buen método para el estudio de la solubilización de P por la planta, ya que se detecta cierto grado de estrés

con esta fuente de fósforo en comparación con concentraciones equimolares a las de fosfato soluble usada en el medio control.

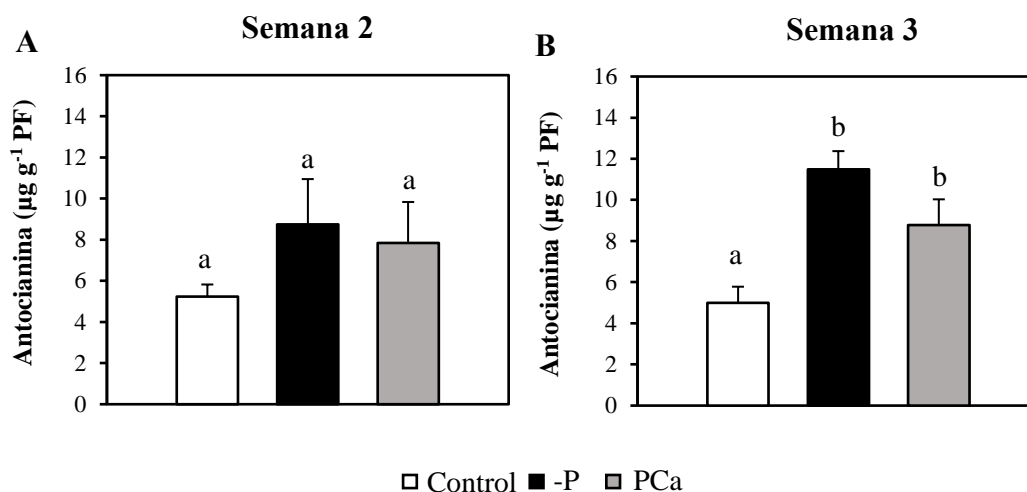


Figura 55. Efectos de la falta de fósforo sobre la acumulación de antocianinas en hojas de sorgo WT. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), como se indica en la Figura 52 durante tres semanas. Las medidas se realizaron a la segunda (A) y tercera semana (B) de tratamiento. La cuantificación de las antocianinas se llevó a cabo como se indica en materiales y métodos. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

2.2.3. Cambios en la actividad PEPC inducidos por el déficit de fósforo

La falta de P no produjo cambios significativos en la actividad PEPC de hojas, ni en la segunda ni en la tercera semana de tratamiento (Fig. 56).

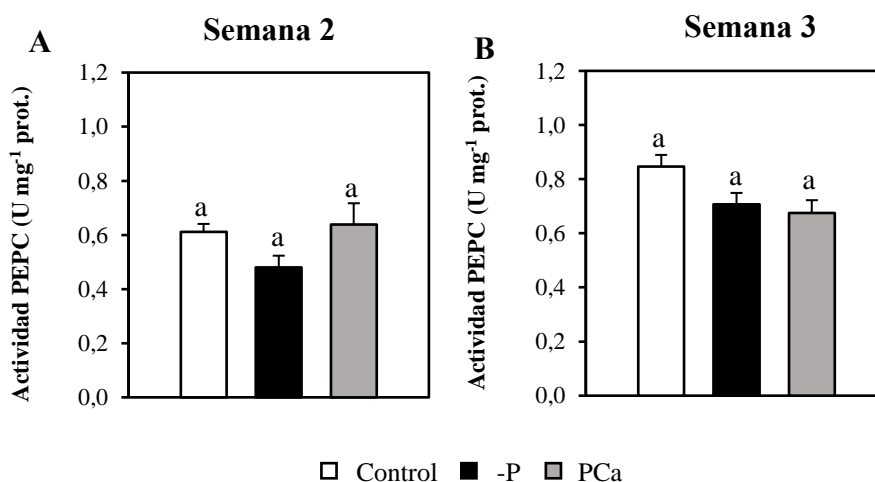


Figura 56. Efectos de la falta de fósforo sobre la actividad PEPC en hojas de sorgo WT. Las plantas de sorgo crecieron se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas de actividad específica PEPC se realizaron tras 2 (A) y 3 (B) semanas de tratamiento. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las distintas letras denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Al analizar el estado de fosforilación de la PEPC, se observó un aumento de la IC_{50} de hojas para el malato como respuesta a la ausencia de P (-P), tanto en la segunda como en la tercera semana de tratamiento. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la IC_{50} de las condiciones control y del tratamiento PCa en ninguna de las medidas. (**Fig. 57**).

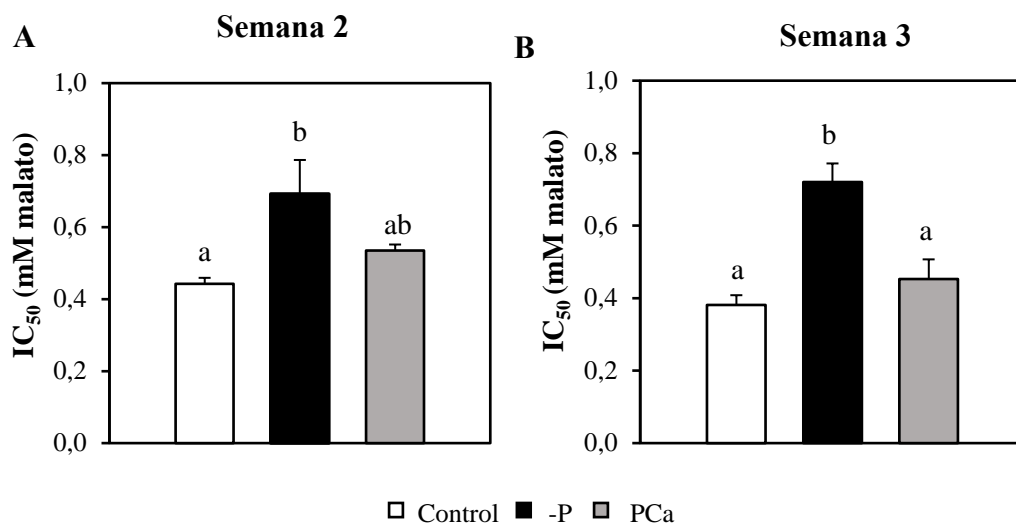


Figura 57. Efecto del déficit de fósforo sobre la IC_{50} para el malato en hojas de sorgo WT. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $Ca_3(PO_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron a la segunda (A) y tercera semana (B) de tratamiento. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Estos resultados mostraron que la falta de P provoca un aumento en el estado de fosforilación de la PEPC de hojas, mientras que en el tratamiento PCa la fosforilación de la PEPC se encuentra a niveles similares a los encontrados en condiciones control. Esto podría sugerir que la fosforilación de la PEPC en hojas interviene en la respuesta frente a la falta de P y que, en presencia de fósforo insoluble, la planta logra solubilizar una parte del mismo reduciendo la respuesta frente al déficit de P.

Posteriormente, se analizaron las respuestas de la PEPC y de su estado de fosforilación en raíces de plantas de sorgo WT. La deficiencia de P (-P) provocó un incremento en la actividad PEPC en este tejido (**Fig. 58A**). En la segunda semana, el tratamiento -P provocó un aumento significativo de la actividad PEPC, mientras que la presencia de fósforo cálcico mantuvo los niveles de actividad PEPC tan solo ligeramente por encima de las condiciones control. Esos resultados se correlacionaron con la cantidad de PEPC detectada por inmunodetección, en la que se observó un incremento mayor en el tratamiento -P que en el tratamiento PCa (**Fig. 58B**). En la tercera semana, los resultados fueron similares. La ausencia de P aumentó un 59% la actividad PEPC, mientras que el tratamiento PCa incrementó la actividad PEPC hasta un valor intermedio entre la encontrada en condiciones control y -P, siendo mayor que el encontrado en la segunda semana. También en este caso, los resultados se correlacionaron con un aumento en la

cantidad PEPC detectada por inmunodetección, donde pudo verse un aumento considerable de la PEPC en ambos tratamientos (**Fig. 58C,D**). Estos resultados muestran que la PEPC participa en las respuestas de la planta a este estrés.

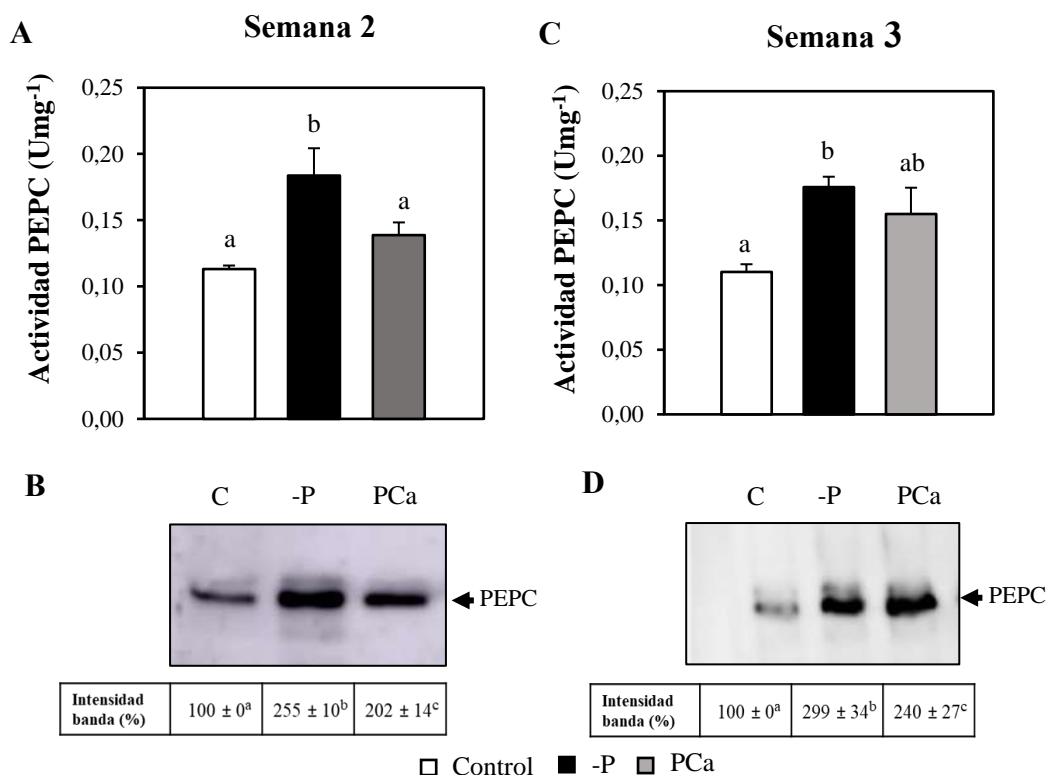


Figura 58. Efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad PEPC en raíces de sorgo WT. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH₂PO₄), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron a la segunda (A) y tercera semana (C) de tratamiento. Los datos son la media ± EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ((Duncan, P < 0,05). Inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC de extractos de raíces con 50 µg de proteínas de la segunda (B) y tercera semana (D) de tratamiento. La intensidad de señal fue medida utilizando ImageStudio™ Lite software (LI-COR Biosciences). Los valores (media ± EE, n = 3) fueron relativizados respecto al WT control.

En conjunto, los resultados parecen indicar que la falta de P aumenta la fosforilación de la PEPC en hojas y en raíces la cantidad de proteína. Además, las respuestas y los efectos frente al déficit de P son mayores a partir de las 2 semanas de tratamiento. También que el tratamiento con fósforo insoluble sólo reduce parcialmente estas respuestas, encontrándose valores intermedios entre la ausencia total de P y concentraciones equimolares de fósforo soluble para la fosforilación y la actividad de la PEPC en hojas y raíces, respectivamente.

2.2.4. Influencia del déficit de fósforo sobre el pH del medio de cultivo

Uno de los mecanismos utilizados por las plantas para la solubilización de P del suelo consiste en la acidificación de la rizosfera mediante la secreción de ácidos orgánicos y/o el bombeo de protones por parte de las raíces (Ryan et al., 2001). Para comprobar si las plantas de sorgo estaban provocando esta acidificación, se analizaron los posibles

cambios del pH del medio de cultivo durante el tratamiento. Como se indica en Materiales y métodos, el medio de cultivo se renovó semanalmente y el pH del mismo se midió de forma diaria.

En condiciones control, el pH se mantuvo relativamente constante a lo largo de cada semana de tratamiento, oscilando desde 6,7 a tiempo inicial hasta aproximadamente 6,8 en cada una de las 3 semanas de tratamiento. Por otra parte, el pH a tiempo inicial para los tratamientos -P y PCa fue de 7,6 y 7,4, respectivamente. En ambos tratamientos se produjo una reducción importante del pH. La caída del pH fue más lenta durante la primera semana, encontrando un mayor descenso en el tratamiento -P. En las semanas 2 y 3, la disminución del pH fue mucho más rápida, alcanzando un valor más o menos estable, entorno a un pH de 6,7-6,9, en las primeras 24 h de tratamiento, y manteniéndose en torno a este valor a lo largo del tiempo. Además, estos valores fueron similares para ambos tratamientos, lo que sugiere que la acidificación en respuesta a los tratamientos -P y PCa son similares (**Fig. 59**). A pesar de estas diferencias en cuanto a la acidificación del medio entre los distintos tratamientos, el valor final de pH tras cada semana fue similar, situándose en torno a un valor de 6,8.

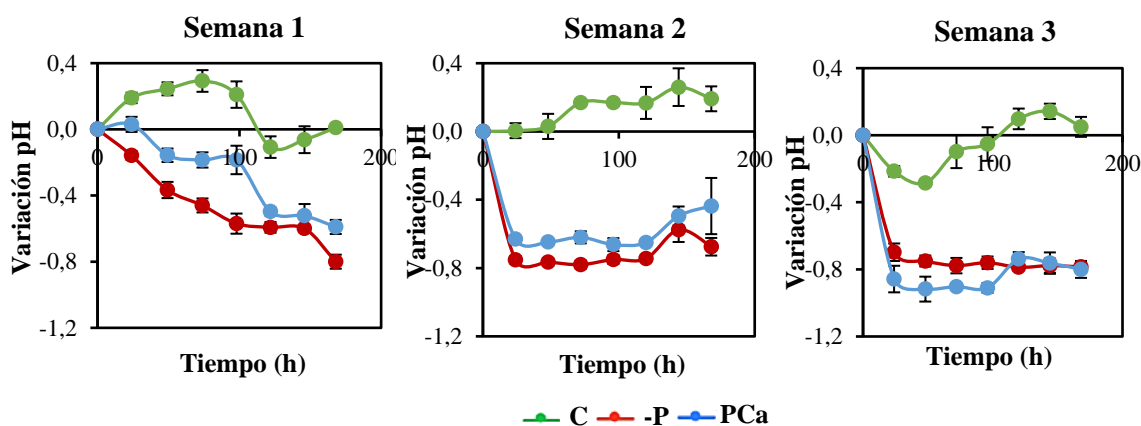


Figura 59. Variación del pH del medio de cultivo respecto al tiempo de tratamiento. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las mediciones de pH se realizaron cada 24 h. Se representa la variación del pH respecto a su valor a tiempo inicial para cada semana y tratamiento. Los datos son la media \pm EE (n = 6).

2.3. EFECTOS DEL ESTRÉS POR DÉFICIT DE FÓSFORO EN LAS LÍNEAS *Ppc3*

Una vez que se ha comprobado el importante aumento de la actividad PEPC en raíces y de la fosforilación de la enzima en hojas en respuesta a la falta de fósforo, se analizó el papel de la isoenzima PPC3 en estas respuestas usando las líneas *Ppc3*.

2.3.1. Efecto de la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento en las líneas *Ppc3*

La falta de P tiene importantes repercusiones morfológicas, disminuye el crecimiento tanto en altura como en biomasa, y altera la arquitectura radicular hacia un mayor desarrollo de este tejido en comparación con la parte aérea, para intentar explorar más suelo en busca de P. Como consecuencia de este último fenómeno, se produce un aumento en el ratio raíz/parte aérea de las plantas sometidas a este tipo de estrés, parámetro utilizado comúnmente para determinar si una planta está sufriendo falta de P (Hammond et al., 2004; Pandey et al., 2014; Gonçalves et al., 2020).

En primer lugar, se determinó la velocidad de crecimiento de la parte aérea de las líneas WT y *Ppc3* de sorgo durante las 3 semanas de tratamiento. Se encontró que los efectos de los distintos tratamientos sobre este parámetro fueron similares entre las plantas WT y las líneas silenciadas, la deficiencia de P provocó una disminución del crecimiento que fue más marcada en ausencia total de P (**Fig. 60**).

En segundo lugar, al finalizar el cultivo se midió la altura de la planta y el peso de la parte aérea y de las raíces. El tratamiento -P redujo drásticamente la altura de todas las líneas, mientras que en el tratamiento PCa la reducción fue menor, debido a que estas plantas tienen cierta disponibilidad de P. En cuanto a la producción de biomasa fresca y seca de la parte aérea, las líneas silenciadas presentaron una menor producción en condiciones control. Sin embargo, los efectos de los tratamientos -P y PCa fueron similares en todas las líneas. (**Tabla 8**).

Al igual que ocurría en la parte aérea, las raíces de las plantas silenciadas presentaron un menor peso fresco y seco que la planta WT en condiciones control. Además, ambos tratamientos (-P y PCa) provocaron una reducción significativa en la biomasa de raíces, de nuevo, mayor en ausencia total de P (-P) que al añadir fosfato insoluble (PCa) (**Tabla 8**).

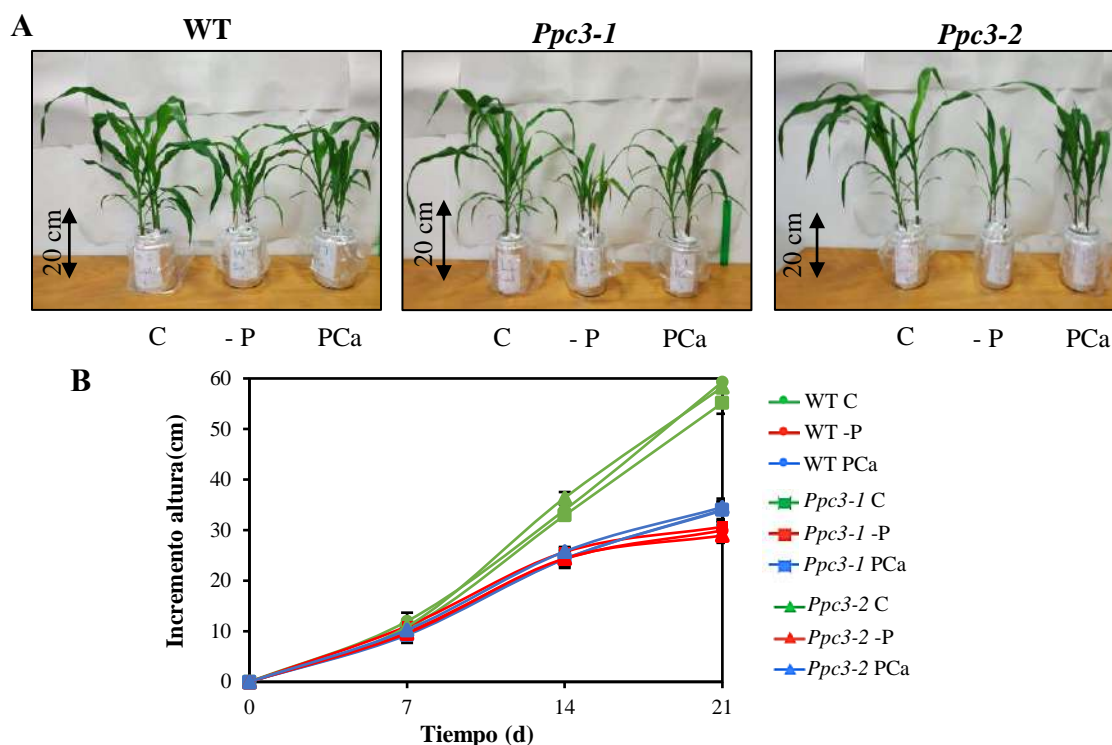


Figura 60. Efectos del déficit de fósforo sobre el crecimiento de plantas de sorgo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. **A.** Fotos de las plantas de cada condición al finalizar el tratamiento. **B.** Variación de la altura de la planta con el tiempo. Las medidas fueron tomadas en cada renovación del medio de cultivo y calculadas respecto a la longitud inicial. Los datos son la media \pm EE (n = 6).

Tabla 8. Efecto del déficit de fósforo sobre el crecimiento vegetativo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Los datos son la media \pm EE (n = 27 para la altura de la planta, siendo cada réplica biológica la medida de una planta; y n = 9 para el resto, donde cada réplica biológica corresponde a tres plantas distintas). Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$) dentro de cada columna.

		Parte aérea			Raíz	
		Altura (cm)	PF (g)	PS (g)	PF (g)	PS (g)
WT	C	76,3 \pm 2 ^a	24,6 \pm 1,7 ^a	11,16 \pm 0,7 ^a	32,5 \pm 4,7 ^a	1,92 \pm 0,36 ^a
	-P	45,6 \pm 2,1 ^b	5,13 \pm 0,3 ^c	2,47 \pm 0,17 ^c	16,1 \pm 0,8 ^b	1,41 \pm 0,03 ^{ab}
	PCa	53,2 \pm 1,7 ^b	6,7 \pm 0,4 ^c	3,16 \pm 0,17 ^{bc}	19,03 \pm 0,6 ^{ab}	1,23 \pm 0,03 ^{abc}
<i>Ppc3-1</i>	C	69,2 \pm 2,2 ^a	13,2 \pm 2,1 ^b	5,7 \pm 1,67 ^b	18,1 \pm 3,8 ^b	1,2 \pm 0,3 ^{abc}
	-P	48,2 \pm 2,2 ^b	4,9 \pm 0,45 ^c	2,29 \pm 0,28 ^c	13,43 \pm 1,2 ^b	0,69 \pm 0,07 ^c
	PCa	50,4 \pm 1,8 ^b	6,06 \pm 0,5 ^c	3,07 \pm 0,24 ^{bc}	16,83 \pm 1,6 ^b	1,2 \pm 0,18 ^{abc}
<i>Ppc3-2</i>	C	67,5 \pm 2,9 ^a	12,1 \pm 2,1 ^b	5,74 \pm 1,47 ^b	18,5 \pm 4,8 ^b	1 \pm 0,27 ^{bc}
	-P	46,9 \pm 2,3 ^b	4,4 \pm 0,2 ^c	2,36 \pm 0,16 ^c	11,8 \pm 0,8 ^b	0,96 \pm 0,09 ^{abc}
	PCa	53,1 \pm 1,2 ^b	5,4 \pm 0,25 ^c	2,98 \pm 0,14 ^{bc}	16,97 \pm 1,6 ^b	0,96 \pm 0,13 ^{abc}

Por último, se determinó el ratio raíz/parte aérea, utilizando el peso seco de cada tejido para calcular este índice. En la planta WT, ambos tratamientos (-P y PCa) provocaron un aumento significativo del ratio, indicando efectivamente una limitación en la biodisponibilidad de P (**Fig. 61**). Sin embargo, aunque en las líneas *Ppc3* también se observó un aumento del ratio raíz/parte aérea respecto a las condiciones control, éste fue menor al encontrado en la planta WT en el tratamiento -P, siendo significativamente diferente en la línea *Ppc3-1*. El ratio fue similar en el tratamiento PCa en todas las líneas (**Fig. 61**). Estos resultados indican una respuesta diferente en las plantas silenciadas en respuesta a la falta de P en comparación con la línea silvestre WT.

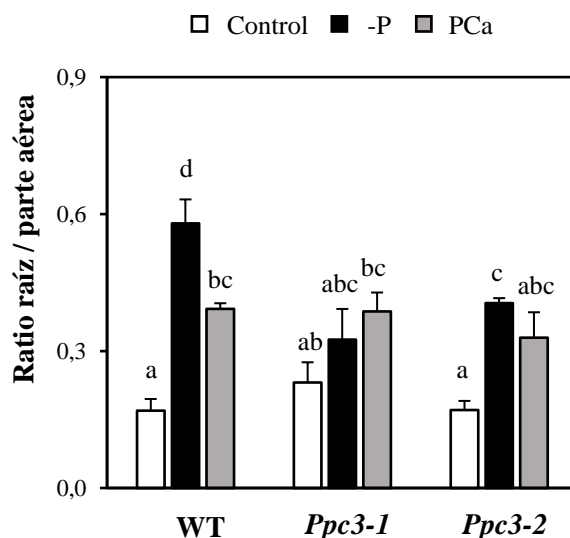


Figura 61. Efecto del silenciamiento sobre el ratio raíz/parte aérea en condiciones control y de déficit de fósforo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron a la tercera semana de tratamiento. El ratio fue calculado a partir del peso seco de raíces y de hojas. Los datos son la media \pm EE ($n = 3$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

2.3.2. Influencia del déficit de fósforo sobre parámetros fotosintéticos en plantas *Ppc3*

La deficiencia de P en plantas afecta al correcto funcionamiento de la fotosíntesis, entre otros disminuye la actividad del PSII y la regeneración de ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), lo que conlleva a un aumento de la fotoinhibición y, por tanto, una disminución de la actividad fotosintética (Xu et al., 2007; Lin et al., 2009). Por ello, para conocer el grado de estrés causado por la deficiencia de P, se cuantificaron distintos parámetros fotosintéticos en las plantas WT, *Ppc3-1* y *Ppc3-2*.

La deficiencia de fósforo (-P y PCa) disminuyó notablemente tanto la tasa de fotosíntesis neta como la conductancia estomática en plantas WT. Como ocurrió con otros parámetros anteriores, el tratamiento PCa generó unos valores intermedios en estos parámetros (**Fig. 62A,B**). Estos cambios fueron similares en las plantas modificadas. Cabe destacar que, al igual que en los resultados previos de nuestro grupo (de la Osa, et

al., 2022), se encontró que, aunque la tasa fotosintética era sólo ligeramente inferior en las líneas silenciadas en condiciones control, la conductancia estomática de éstas fue significativamente menor que en la planta WT en estas mismas condiciones (**Fig. 62B**).

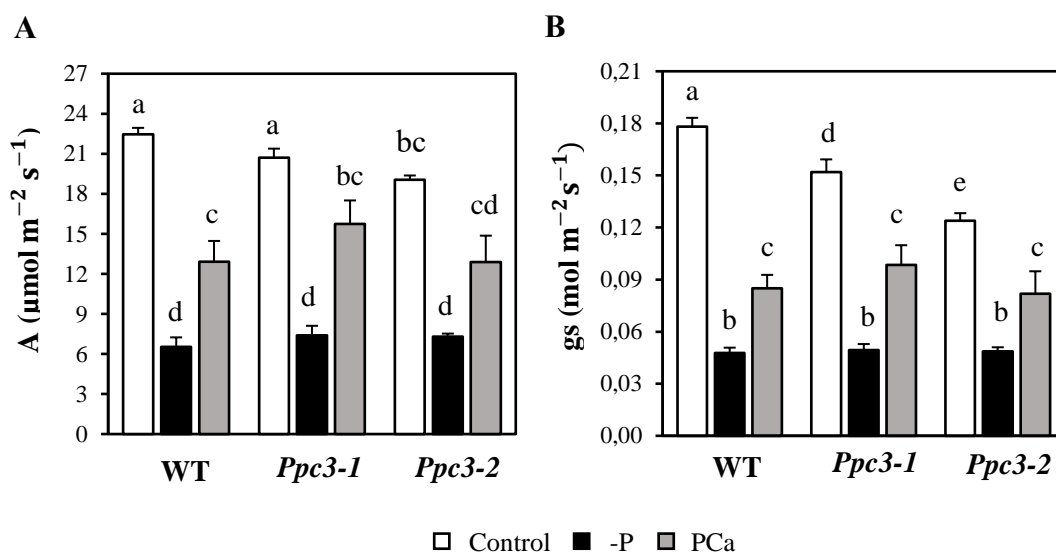


Figura 62. Efectos del silenciamiento en la actividad fotosintética en condiciones control y de falta de fósforo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. **A.** Tasa fotosintética neta (A). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Games-Howell, $P < 0,05$). **B.** Conductancia estomática (gs). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$). Los datos son la media \pm EE ($n = 8$).

Para determinar la influencia del déficit de P sobre el rendimiento y la eficiencia fotosintética, se evaluó la fluorescencia de las clorofilas mediante la fluorescencia mínima (F_0), fluorescencia emitida en ausencia de luz fotosintética, y el rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m), que mide la eficiencia máxima del PSII. Esta medida es usada como indicador del estado fotosintético de la planta, con valores óptimos de aproximadamente 0,83 para la mayoría de plantas, disminuyendo este valor en condiciones de estrés, indicando un fenómeno de fotoinhibición (Maxwell y Johnson, 2000). Como era de esperar, la limitación de fósforo produjo problemas en el aparato fotosintético que se reflejaron en un aumento de la F_0 y una bajada de F_v/F_m . El tratamiento -P aumentó F_0 en todas las líneas, mientras que en el tratamiento PCa los valores fueron intermedios entre las plantas control y -P, salvo en la línea *Ppc3-2* donde los valores con fósforo cálcico son similares a los de sin fósforo (**Fig. 63A**). Los resultados en F_v/F_m reflejaron una situación similar de estrés. La falta de P disminuyó el rendimiento en todas las líneas y en fósforo cálcico se obtuvieron valores intermedios en WT y *Ppc3-1*, pero no en *Ppc3-2* (**Fig. 63B**). Esto en conjunto nos indica que la falta de P afecta al comportamiento del aparato fotosintético, que se recupera parcialmente en presencia de fósforo cálcico en las líneas WT y *Ppc3-1*, pero no en *Ppc3-2*, por lo que nos

podría señalar que esta línea está más afectada que las líneas *Ppc3-1* y WT a nivel del aparato fotosintético por efecto de la falta de P.

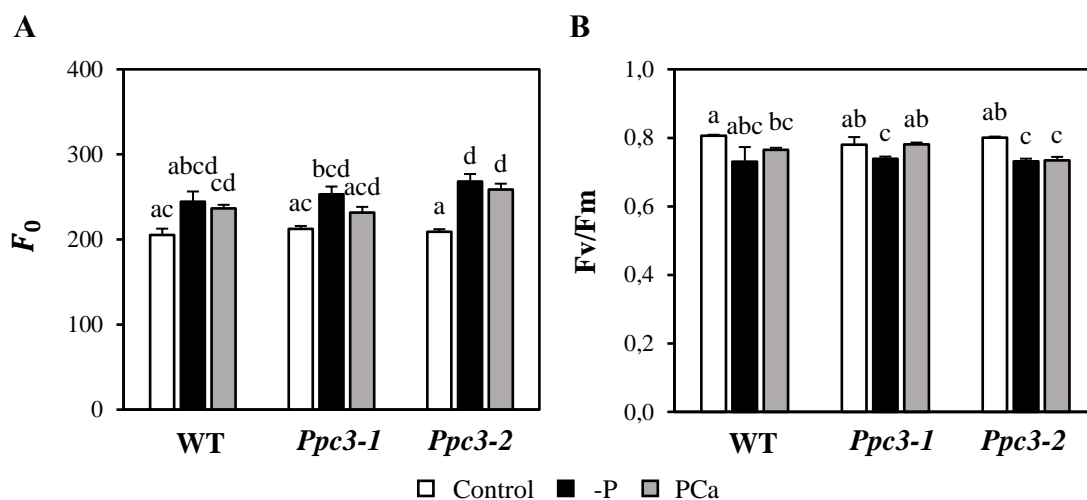


Figura 63. Fluorescencia de las clorofilas en condiciones control y de falta de fósforo. Medidas de la fluorescencia de las clorofilas en planta de sorgo WT y *Ppc3*. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron al finalizar el tratamiento. **A.** Fluorescencia de las clorofilas en ausencia de luz fotosintética (F_0). **B.** Rendimiento cuántico máximo de PSII (F_v/F_m). Los datos son la media \pm EE ($n = 9$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Games-Howell, $P < 0,05$).

Por último, se determinó el contenido en pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides), sin encontrar diferencias significativas ni entre tratamientos ni entre líneas (**Fig. 64A,B,C,D**). En consecuencia, los efectos de la deficiencia de P sobre los parámetros fotosintéticos no se deben a cambios en el contenido de los pigmentos, sino a la acción de este estrés abiótico sobre el funcionamiento del aparato fotosintético.

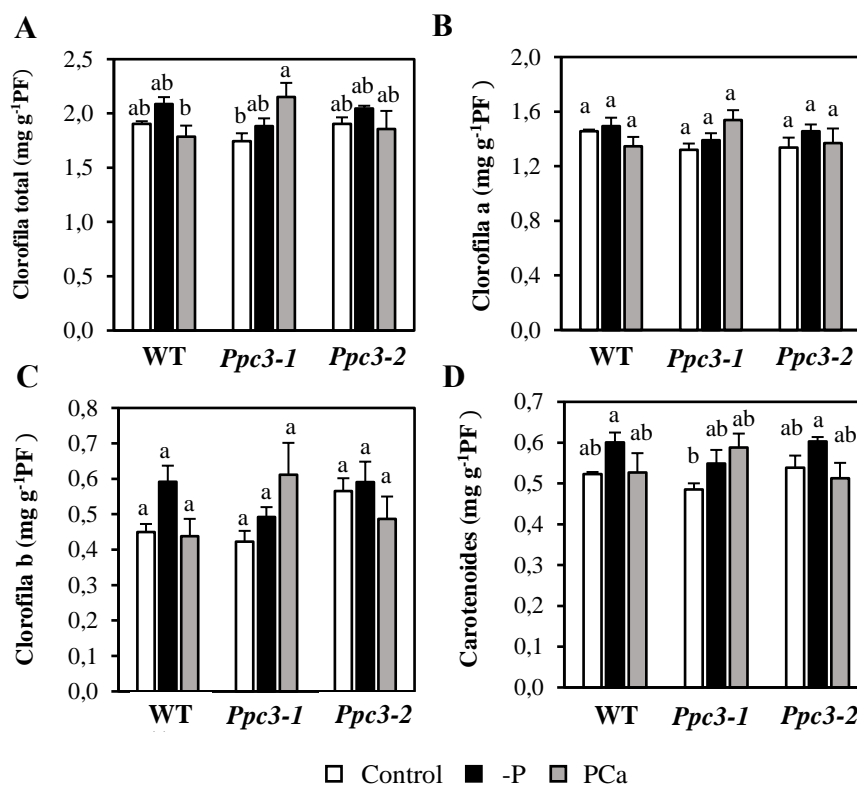


Figura 64. Efectos de la falta de fósforo sobre el contenido en pigmentos fotosintético. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH₂PO₄), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) como se indica en la Figura 52. Se determinaron los pigmentos fotosintéticos como se indica en materiales y métodos. Las medidas se realizaron a la tercera semana de tratamiento. Los datos son la media ± EE (n = 4). **A.** Clorofila total. **B.** Clorofila a. **C.** Clorofila b. **D.** Carotenoides. Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

2.3.3. Acumulación de antocianinas en hojas

Otra de las respuestas frente a la falta de P, y que se utiliza como indicador de este estrés, consiste en la acumulación de antocianinas en las hojas. Estas actúan como fotoprotectores al paliar la fotoinhibición provocada por los efectos negativos que tiene sobre la fotosíntesis la deficiencia de P, además de tener otras funciones antioxidantes (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011; Henry et al., 2012; Wang y Liu, 2018).

La deficiencia de fósforo, tanto en los tratamientos -P como PCa, aumentó notablemente los niveles de antocianinas presentes en hojas, tanto en la línea WT como en las silenciadas *Ppc3-1* y *Ppc3-2* (**Fig. 65**). Sin embargo, mientras que en la línea WT el tratamiento con fosfato cálcico provocó una ligera reducción del contenido de antocianinas, en las líneas modificadas éste se mantuvo al mismo nivel que en el tratamiento -P. En este caso, es destacable la línea *Ppc3-2* en la que el contenido de antocianinas en ambos tratamientos (-P y PCa) fue significativamente mayor al encontrado en la planta WT tratada con fosfato insoluble (**Fig. 65**). Estos resultados

parecen indicar un mayor nivel de estrés en las plantas modificadas frente al déficit de P, sobre todo en la línea *Ppc3-2*.

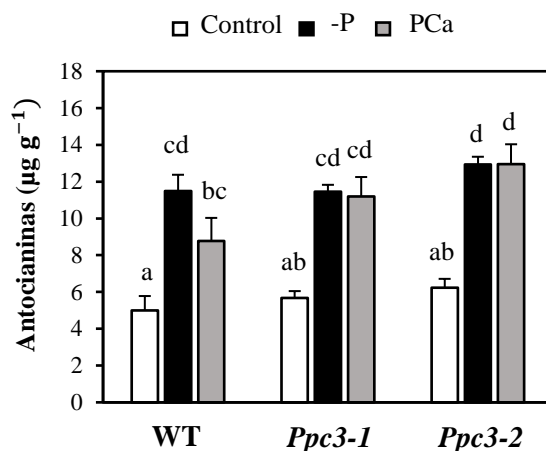


Figura 65. Acumulación de antocianinas inducida por falta de fósforo en hojas de sorgo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. La cuantificación de las antocianinas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Materiales y métodos. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

2.3.4. Respuesta de la PEPC y PEPCk frente a la deficiencia de fósforo en hojas

A continuación, se analizaron las repercusiones del silenciamiento de *SbPPC3* sobre las respuestas a falta de P a nivel de PEPC y PEPCk en hojas. Para ello, se cuantificaron las expresiones relativas de los principales genes que codifican PEPC en este tejido (*SbPPC1-3*), se determinó la actividad y cantidad de PEPC, la expresión de los genes que codifican PEPCk (*SbPPCk1-3*), así como la actividad PEPCk y el estado de fosforilación de la PEPC mediante la IC_{50} para malato en hojas, como se indica en materiales y métodos.

En primer lugar, se cuantificó la expresión de los genes *SbPPC1*, *SbPPC2* y *SbPPC3* (Fig. 66A,B,C). *SbPPC1*, que codifica la PEPC de tipo C_4 , aumentó levemente su expresión en hojas WT, mientras que disminuyó en las líneas modificadas en el tratamiento -P respecto a condiciones control. En el tratamiento PCa, la expresión de *SbPPC1* aumentó levemente en hojas WT y *Ppc3-1* y de una forma más considerable en *Ppc3-2*. *SbPPC2* aumentó drásticamente su expresión en el tratamiento -P, mientras que en el tratamiento PCa se obtuvo un valor de expresión intermedio, aunque estuvo más próximo al encontrado en condiciones control. Estos cambios de expresión fueron similares en todas las líneas. La expresión de *SbPPC3* también se indujo por la ausencia de P (-P), aunque, como era de esperar, éste fue radicalmente mayor en hojas WT que en las líneas silenciadas. En el tratamiento PCa, la expresión de *SbPPC3* en hojas de las plantas WT aumentó, aunque, como ocurrió para el gen *SbPPC2*, se alcanzó un valor intermedio más próximo al encontrado en condiciones control. En este caso, el aumento de expresión de *SbPPC3* también fue considerablemente mayor en hojas WT que en las

líneas silenciadas (**Fig. 66A**). Además, cabe destacar que la inducción de la expresión de *SbPPC3* respecto a su control (60 veces) fue mucho mayor que la inducción de *SbPPC2* respecto a su control (15 veces) en el tratamiento -P. Esto refuerza que *SbPPC3* va a ser más importante que *SbPPC2*.

Sin embargo, a pesar de los cambios de expresión encontrados en los genes *SbPPC2* y *SbPPC3*, no se detectaron cambios significativos en la actividad PEPC de hojas en ningún tratamiento ni en ninguna línea (**Fig. 66B**). Esto se debe a que la isoforma de PEPC predominante en hojas es la PEPC tipo C₄, cuya expresión (*SbPPC1*) no se veía inducida, y la mayoría de la actividad cuantificada en hojas se encuentra asociada a esta isoforma (Shenton et al., 2006, de la Osa et al., 2022). Los resultados de actividad se correlacionaron con la cantidad de PEPC inmunodetectada, detectándose la misma intensidad de banda en todos los tratamientos y líneas analizadas (**Fig. P66C**).

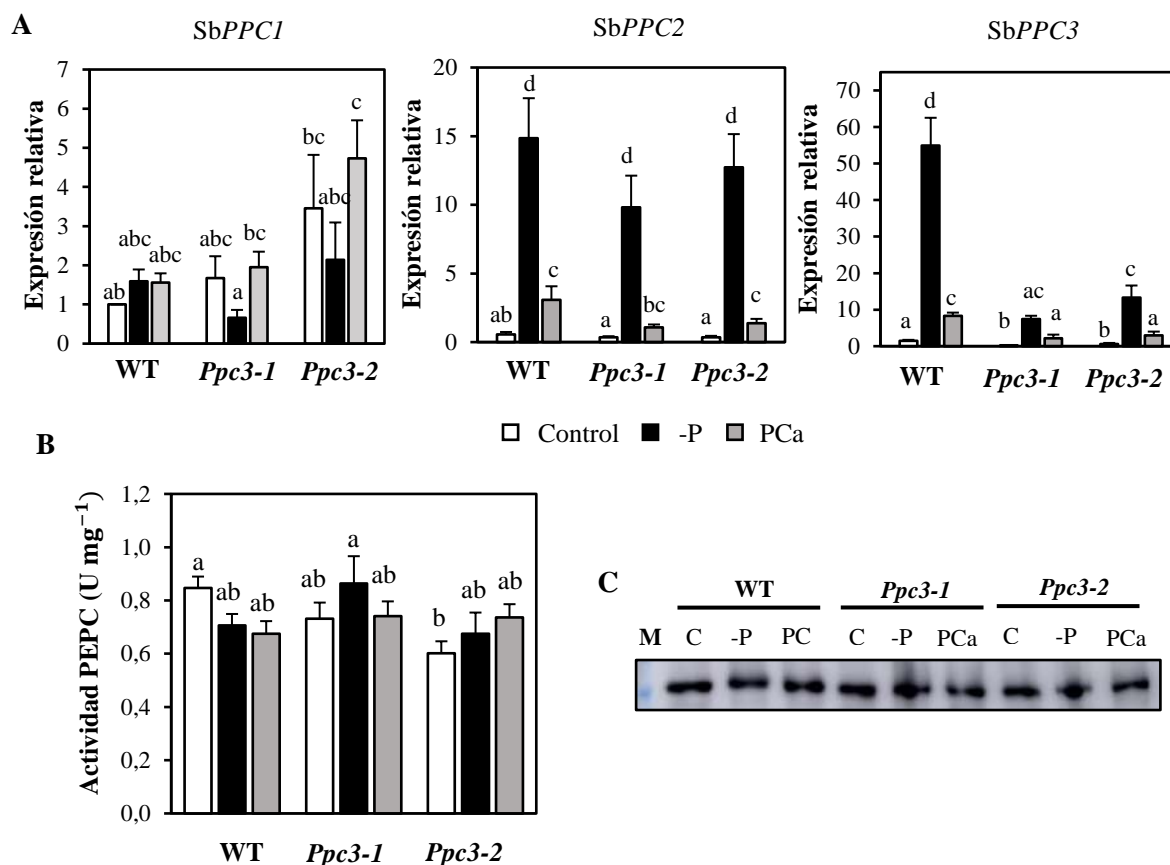


Figura 66. Respuesta de la PEPC al déficit de fósforo en hojas de sorgo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron a la tercera semana de tratamiento. **A.** Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes *SbPPC1-3* en hojas. Los datos se representan como la expresión relativa a la de hojas de la línea WT en condiciones control, a la que se le dio un valor 1 para cada gen. **B.** Medidas de actividad PEPC a partir de extractos de hojas. **C.** Inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC de extractos de hojas con 10 μg de proteínas. Los datos son la media \pm EE ($n = 4$). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Se determinó la expresión en hojas de las tres isoenzimas PEPCk: *SbPPCK1*, *SbPPCK2* y *SbPPCK3*. La expresión de los tres genes presentó un comportamiento similar en todas las líneas. El tratamiento -P indujo drásticamente la expresión de los 3 genes, mientras que el tratamiento PCa la incrementó significativamente respecto a la condición control, pero en una medida notablemente menor que en el tratamiento -P. Finalmente, destacar que el gen *SbPPCK1*, que codifica para la isoenzima fotosintética, alcanzó los niveles de expresión relativa más altos al compararlos con su expresión en condiciones control en todas las líneas (**Fig. 67A,B,C**).

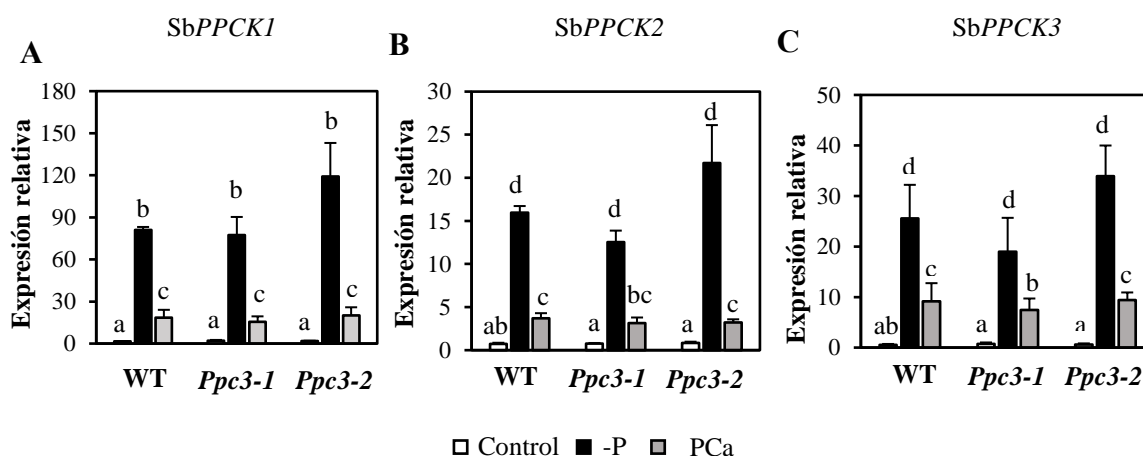


Figura 67. Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes *SbPPCK1-3* en hojas. El ARN total se extrajo en hojas de sorgo cultivado en condiciones control (C), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron como se indica en la Figura P20. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Posteriormente, se analizó si el aumento de expresión de los genes *SbPPCK* se correlacionaba con una mayor actividad de quinasa. Para ello, se cuantificó la actividad PEPCk en hojas mediante la tinción fluorescente de proteínas fosforiladas con ProQ Diamond, como se indica en materiales y métodos. Se observó un ligero aumento de la actividad en los tratamientos -P y PCa respecto al control, que únicamente fue significativo en la línea *Ppc3-1* en condiciones -P (**Fig. 68A,B**).

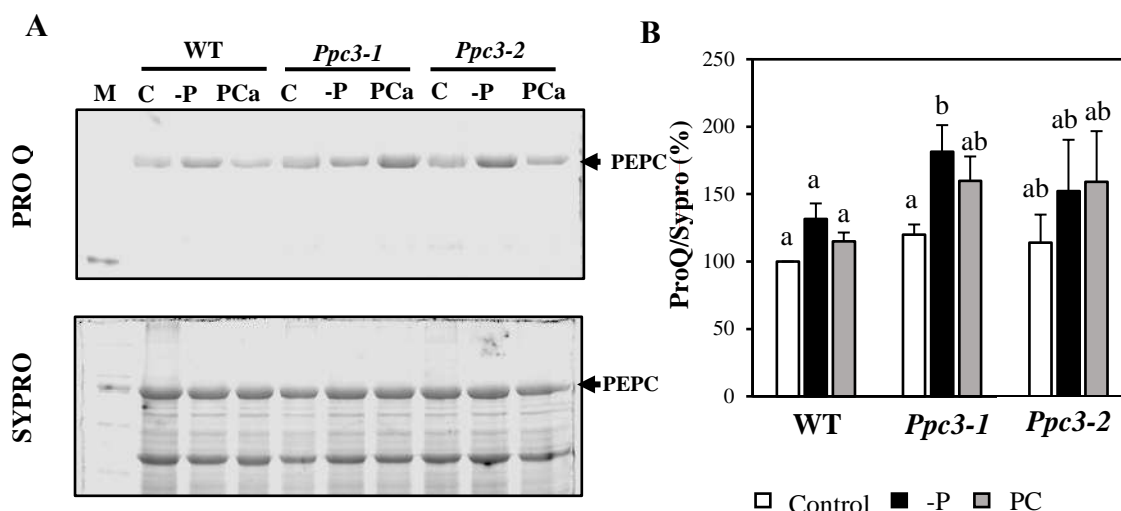


Figura 68. Efectos de la deficiencia de fósforo sobre la actividad PEPCK *in vitro* en hojas. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH₂PO₄), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) como se indica en la Figura 52. **A.** Imagen representativa de un resultado de actividad PEPCK *in vitro* realizado con PEPC exógena. En el carril M se cargó el marcador de peso molecular junto con una alícuota de 0,4 U PEPC exógena incubada sin ATP. Para el ensayo se utilizaron 50 µg de proteínas de los extractos crudos de cada muestra. **B.** Se representa el ratio ProQ/Sypro calculado como se indica en materiales y métodos, considerando el ratio del WT control como el 100%. Los datos son la media ± EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

Finalmente, para analizar el estado de fosforilación de la PEPC en hojas *in vivo*, se determinó la IC₅₀ de esta enzima para el malato. En concordancia con el aumento de expresión de los genes *SbPPCK* descrito anteriormente, el tratamiento -P incrementó notablemente la IC₅₀ de forma similar en todas las líneas, indicando que este estrés aumenta el estado de fosforilación *in vivo* de la PEPC. Por otra parte, en el tratamiento PCa, la IC₅₀ de hojas WT fue igual a la encontrada en condiciones control, indicando que esta fuente de P es suficiente para que desaparezca la respuesta de fosforilación de la PEPC en hojas WT inducida por deficiencia de P. Por el contrario, en las líneas modificadas, el tratamiento PCa mantiene la IC₅₀ al mismo nivel que en el tratamiento -P, indicando que se mantiene la respuesta de fosforilación de la PEPC de hojas (**Fig. 69**). La medida de la IC₅₀ vuelve a poner de manifiesto que las líneas silenciadas siguen respondiendo de manera similar a cuando no hay P cuando se le añade fósforo insoluble.

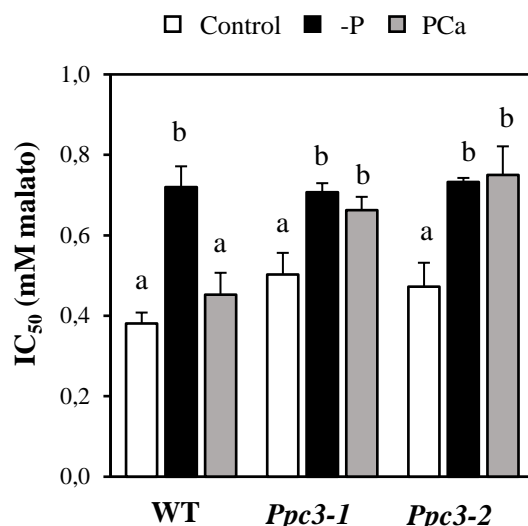


Figura 69. Efecto del déficit de fósforo sobre la IC₅₀ para el malato en hojas de sorgo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH₂PO₄), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) como se indica en la Figura 52. Se cuantificó la IC₅₀ para el malato de la PEPC al finalizar el tratamiento. Los datos son la media ± EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

2.3.5. Respuesta de la PEPC y PEPCk frente a la deficiencia de fósforo en raíces

A continuación, se estudiaron los mismos parámetros relacionados con la PEPC y la PEPCk que en el apartado anterior, en este caso en raíces. En primer lugar, se cuantificó la expresión de las isoenzimas *SbPPC2* y *SbPPC3*, ya que *SbPPC1* no se expresa en este tejido al ser una isoenzima fotosintética (Shenton et al., 2006). Como ocurrió en hojas, el gen *SbPPC2* aumentó su expresión significativamente en el tratamiento -P de forma similar en todas las líneas, mientras que, en las plantas tratadas con fósforo de calcio, aunque hubo una inducción significativa de la expresión respecto al control, ésta fue menor que en el tratamiento -P (**Fig. 70A**). El gen *SbPPC3* presentó un comportamiento similar en las raíces de la planta WT, mientras que, en las líneas modificadas, como era de esperar, los niveles de expresión fueron drásticamente inferiores a los encontrados en las raíces WT en cualquiera de los tratamientos, demostrando nuevamente la eficacia del silenciamiento (**Fig. 70B**). Esto también indica que la planta no compensa la falta de *SbPPC3* con una mayor expresión de *SbPPC2*, ni en hojas ni en raíces.

Posteriormente, se analizó la actividad PEPC en raíces (**Fig. 70C,D**). Como se indicó en el apartado 2.2.3 (Figura 57), los tratamientos provocaron un aumento de la actividad PEPC en raíces en la planta WT, aunque dicho incremento solo fue estadísticamente significativo en el tratamiento -P. Por su parte, la actividad PEPC en raíces de las líneas modificadas fue significativamente inferior a la actividad en raíces WT en todos los tratamientos, sin detectarse cambios notables en la actividad PEPC de raíces en estas líneas en ninguna de las condiciones (**Fig. 70C**). Por último, los niveles de actividad PEPC medidos en raíces se correspondieron con la cantidad de proteína inmunodetectada con anticuerpos anti-PEPC (**Fig. 70D**). En conjunto, estos resultados concuerdan con los

niveles de expresión relativa de *SbPPC3* descritos previamente, y además indican que, si bien el gen *SbPPC2* aumenta su expresión en falta de P en todas las líneas (**Fig. 70A,B**), este aumento no se traduce en un aumento de actividad ni de cantidad de PEPC en las líneas silenciadas. Por lo tanto, esto indica que, cuantitativamente, la isoenzima que más contribuye a los cambios de actividad y cantidad de PEPC en raíces en respuesta a la falta de P es *SbPPC3*.

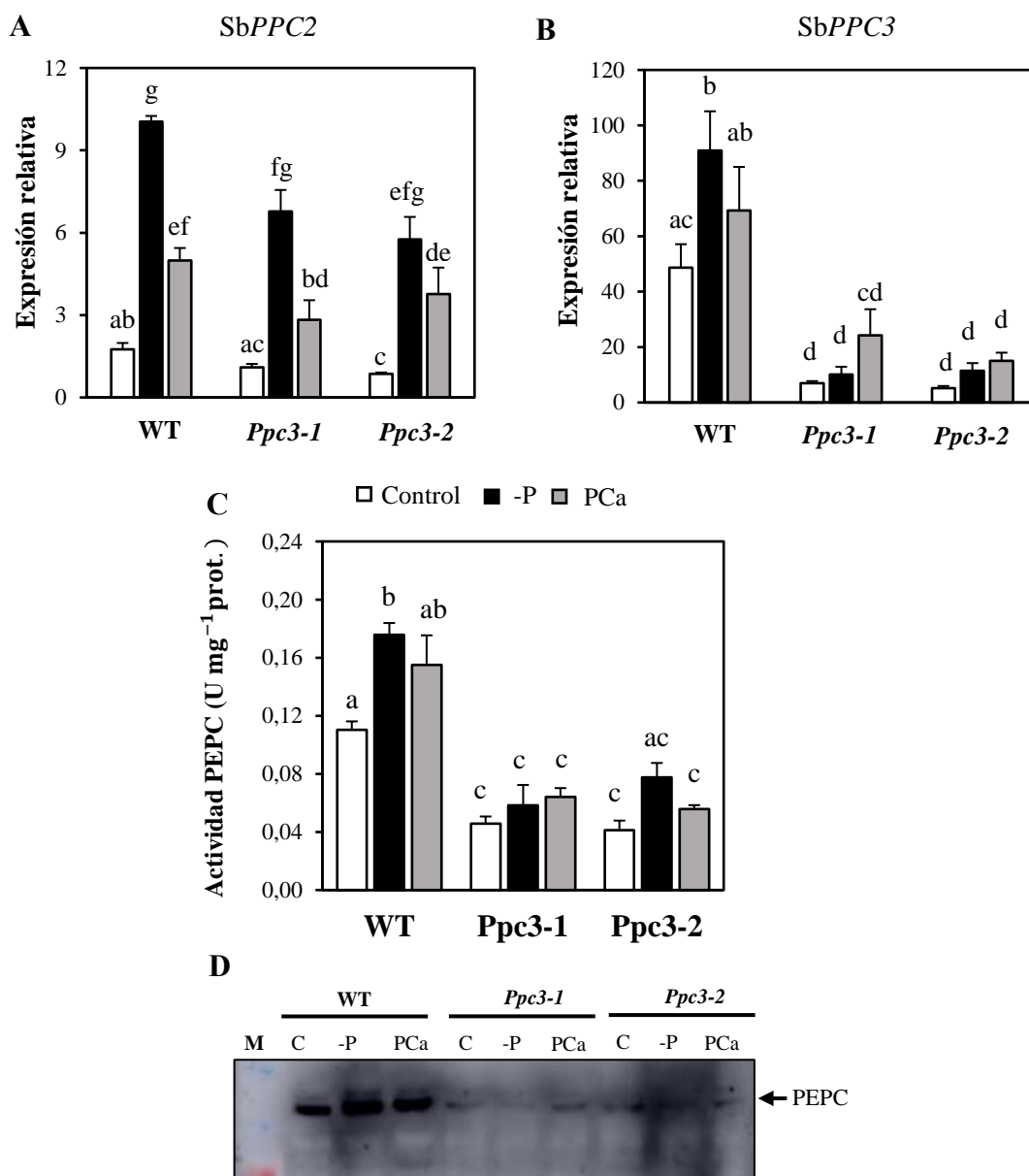


Figura 70. Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes *SbPPC2-3* en raíces de sorgo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH₂PO₄), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron como se indica en la Figura 67. Los datos se representan como la expresión relativa de cada gen respecto a la de hojas de la línea WT en condiciones control, a la que se le dio un valor arbitrario de 1. **A.** Expresión relativa de *SbPPC2*. **B.** Expresión relativa de *SbPPC3*. **C.** Actividad PEPC en extractos de raíces. **D.** Inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC de extractos de raíces con 50 µg de proteínas. M. Marcador de peso molecular. Los datos son la media ± EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

Posteriormente, se determinó la expresión en raíces de los dos genes *SbPPCK* que se expresan en este tejido: *SbPPCK2* y *SbPPCK3*. El comportamiento de ambos genes a los tratamientos fue similar. La ausencia de P indujo de manera significativa la expresión de ambos genes, mientras que en el tratamiento PCa, el incremento en la expresión relativa fue menor. Los resultados obtenidos fueron similares en todas las líneas (**Fig. 71A,B**).

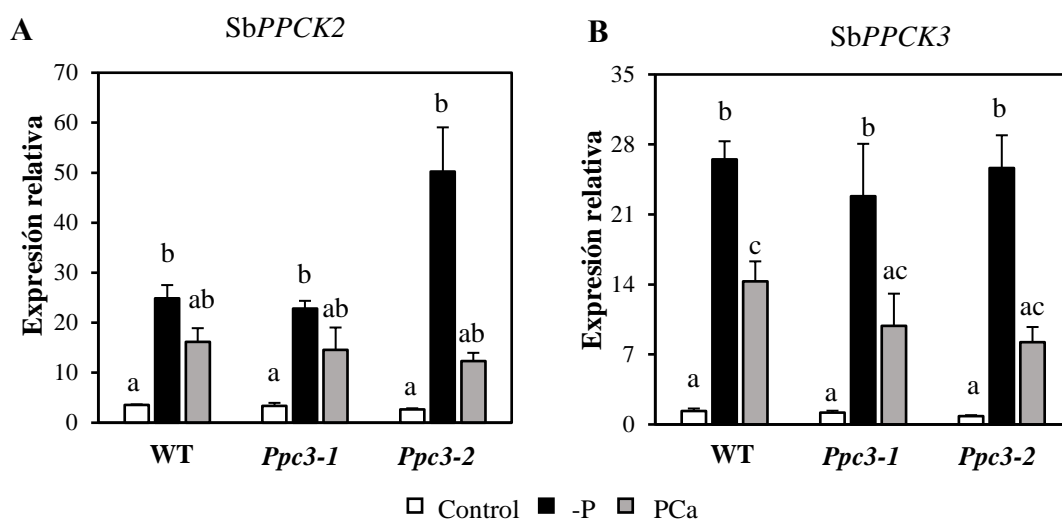


Figura 71. Análisis de la expresión mediante qPCR de los genes *SbPPCK2-3* en raíces. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fofato (-P) o con fofato insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron como se indica en la Figura 67. Los datos se representan como la expresión relativa de cada gen respecto a la de hojas de la línea WT en condiciones control, a la que se le dio un valor arbitrario de 1. **A.** Expresión relativa de *SbPPCK2*. **B.** Expresión relativa de *SbPPCK3*. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

En último lugar, se cuantificó la actividad PEPCk *in vitro* en raíces (**Fig. 72**). A pesar del efecto de los tratamientos sobre la expresión de los genes *SbPPCK2* y *3*, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos y líneas, salvo en la línea *Ppc3-2* en la que tanto el tratamiento -P como el tratamiento PCa, incrementaron la actividad PEPCk *in vitro* de manera significativa respecto a su control (**Fig. 72A,B**).

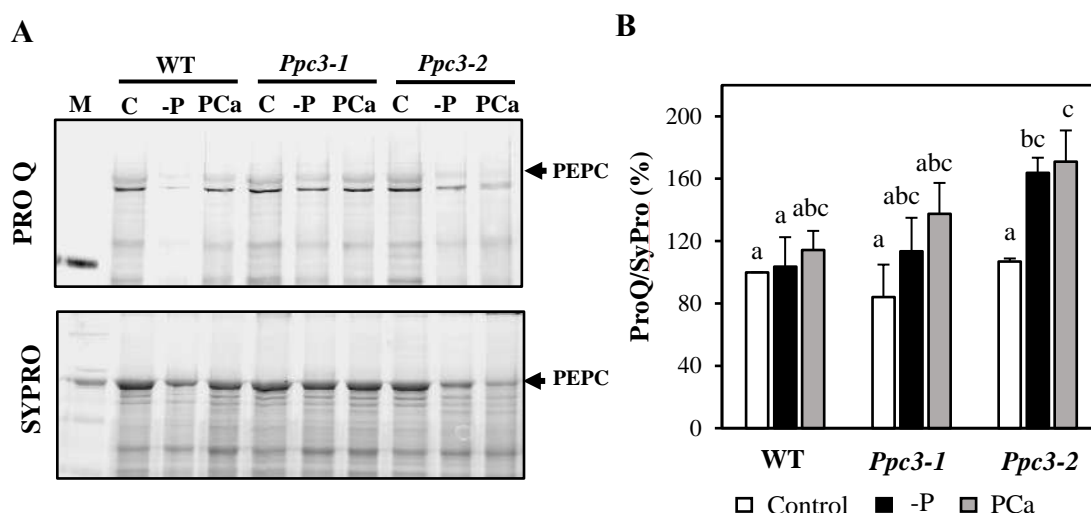


Figura 72. Ensayo de actividad PEPCk *in vitro* en raíces. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. **A.** Imagen representativa de un resultado de actividad PEPCk *in vitro* realizado con PEPC exógena. En el carril M se cargó el marcador junto con una alícuota de 0,4 U de PEPC exógena incubada sin ATP. En el ensayo se emplearon 50 μg de proteínas de extractos crudos de cada muestra. **B.** Se representa el ratio ProQ/SyPro, que se calculó como se indica en materiales y métodos, considerando el valor de este ratio para raíces WT control como 100%. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

2.3.6. Variación en el pH del medio de cultivo

Como se describió en el apartado 2.2.4, otro de los mecanismos utilizados por las plantas para aumentar la solubilización de P del suelo consiste en la acidificación de la rizosfera mediante la secreción de ácidos orgánicos y/o el bombeo de protones (Ryan et al., 2001). Dado que la PEPC intervendría en la síntesis de estos ácidos orgánicos (Plaxton y Tran, 2011) y teniendo en cuenta la importancia de la isoforma *SbPPC3* en raíces (de la Osa et al., 2022), se llevó a cabo una medición temporal del pH del medio de cultivo a lo largo del tratamiento, para determinar los efectos del silenciamiento sobre la capacidad de la planta para acidificar dicho medio en respuesta a este estrés abiótico.

La acidificación generada por la respuesta ante la falta de P fue más lenta en la primera semana y bastante rápida en las otras dos semanas de tratamiento, llegando a estabilizarse en las primeras 24 h. Sin embargo, los resultados fueron similares entre las distintas líneas y en ambos tratamientos (-P y PCa) (**Fig. 73**). Esto indica que la presencia de fósforo cálcico no reduce las respuestas típicas a la deficiencia de P por parte de las plantas de sorgo.

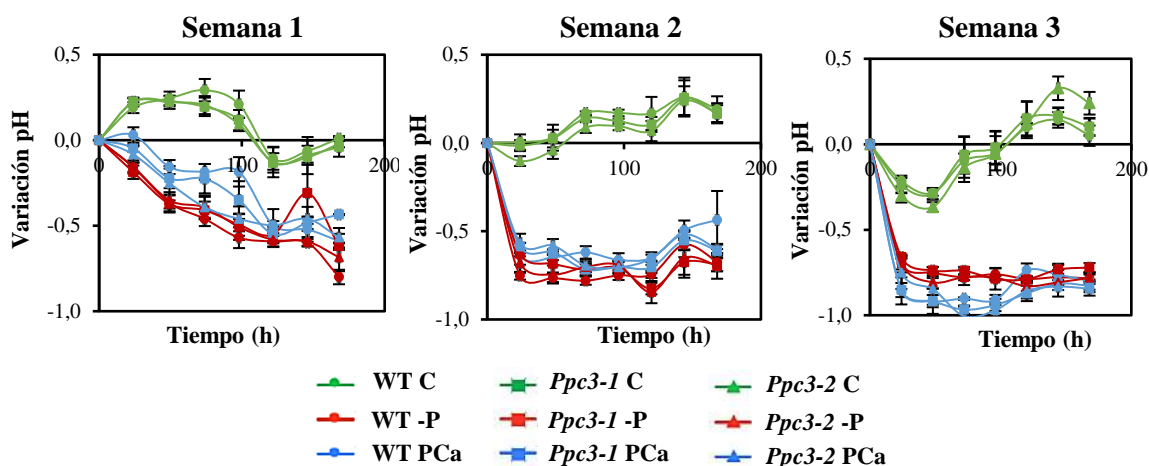


Figura 73. Variación del pH del medio de cultivo respecto al tiempo de tratamiento. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Se representa la variación del pH respecto a su valor a tiempo inicial para cada semana y tratamiento. Los datos son la media \pm EE (n = 6).

2.3.7. Expresión del transportador PHT en raíces y contenido de fósforo en plantas WT y *Ppc3*

Otras respuestas de la planta frente a la deficiencia de P están asociadas a un aumento de la capacidad de absorción del P disponible en la rizosfera, así como de su movilización dentro de la planta. En este sentido, juegan un papel importante la familia de transportadores de alta afinidad de fósforo PHT (Phosphate Transporter) (López-Arredondo et al., 2014; Wang et al., 2019b). Por este motivo, se analizó la expresión del gen *SbPHT1*, localizado en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz e importante en la captación de P desde el suelo (Wang et al., 2019b).

El tratamiento -P indujo considerablemente la expresión en todas las líneas, mientras que en el tratamiento PCa la expresión de *SbPHT1* disminuyó en raíces WT, incluso respecto a las condiciones control. Por el contrario, este tratamiento incrementó la expresión en las plantas modificadas respecto a las condiciones control, especialmente en la línea *Ppc3-1* aunque estos cambios no fueron significativos (**Fig. 74**).

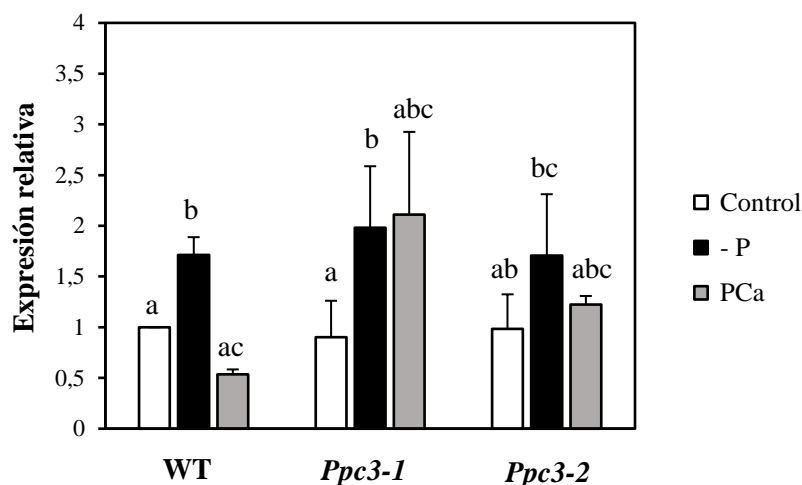


Figura 74. Análisis de la expresión mediante qPCR del gen *SbPHT1* en raíces. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 59. Las medidas se realizaron como se indica en la Figura 66. Los datos se representan como la expresión relativa a la de la línea WT en condiciones control, a la que se le dio el valor arbitrario de 1. Los datos son la media \pm EE (n = 4). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

Finalmente, para evaluar si los tratamientos de fósforo realizados y el silenciamiento de *SbPPC3* tienen efecto sobre la acumulación de P en la planta, se cuantificó el contenido de P total en las líneas y tratamientos anteriores. En hojas, tanto el tratamiento -P como el tratamiento PCa provocaron una reducción drástica del contenido de fósforo respecto al control, aunque hubo una cierta recuperación significativa en este segundo tratamiento. Este resultado confirma que, efectivamente, el aporte del P en forma de fósforo insoluble induce una deficiencia de este elemento en las plantas de sorgo, incluso a concentraciones elevadas. Sin embargo, no se observaron diferencias entre las plantas WT y las líneas modificadas (**Fig. 75A**). En raíces, el tratamiento -P redujo dramáticamente los niveles de fósforo en raíces del mismo modo en todas las líneas. Por otra parte, el tratamiento PCa permitió recuperar los niveles de fósforo respecto a las condiciones control, aunque las raíces WT acumularon mayores niveles de P que las líneas *Ppc3* (**Fig. 75B**). Estos resultados sugieren una relación importante entre el silenciamiento de *SbPPC3* y el contenido de fósforo en raíces cuando las plantas crecían con fósforo cálcico como fuente de P.

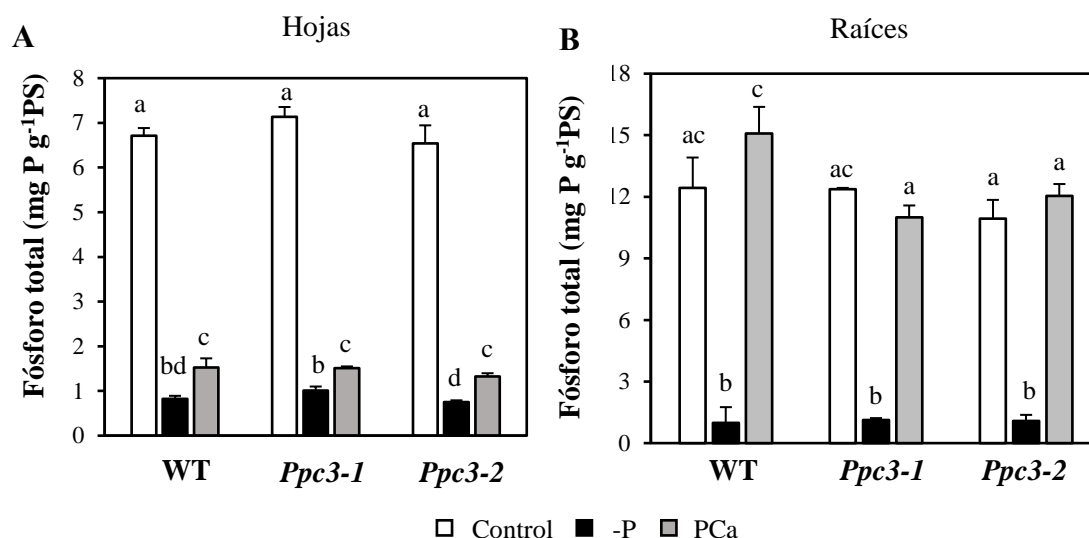


Figura 75. Análisis de fósforo total en hojas y raíces de sorgo en condiciones control y de déficit de fósforo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH_2PO_4), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como se indica en la Figura 52. Las medidas se realizaron como se indica en Materiales y métodos. **A.** Hojas. **B.** Raíces. Los datos son la media \pm EE (n = 3 para hojas, n = 6 para raíces). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

2.3.8. Efectos del silenciamiento sobre el contenido en ATP de las plantas sometidas a falta de fósforo

La deficiencia de P altera el contenido de ATP de las plantas al ser este elemento necesario para su regeneración (Malhotra et al., 2018). Por lo tanto, se cuantificó el nivel de ATP de hojas y raíces en las diferentes líneas y tratamientos. Como era de esperar, el déficit total de P provocó una reducción drástica de los niveles de ATP en hojas. Por su parte, el tratamiento PCa permitió una leve recuperación de estos niveles (**Fig. 76A**). En raíces, ambos tratamientos de P también redujeron significativamente el contenido en ATP. Sin embargo, en este caso el aporte de fósforo cálcico no mejoró los niveles de ATP, que permanecieron iguales a las condiciones -P. Cabe señalar que, en condiciones control, las dos líneas silenciadas presentaron un contenido de ATP significativamente menor que el encontrado en la planta WT en estas mismas condiciones (**Fig. 76B**). Estos resultados muestran la importancia de *SbPPC3* en el correcto funcionamiento metabólico de las raíces de sorgo, incluso en ausencia de estrés (de la Osa et al., 2022).

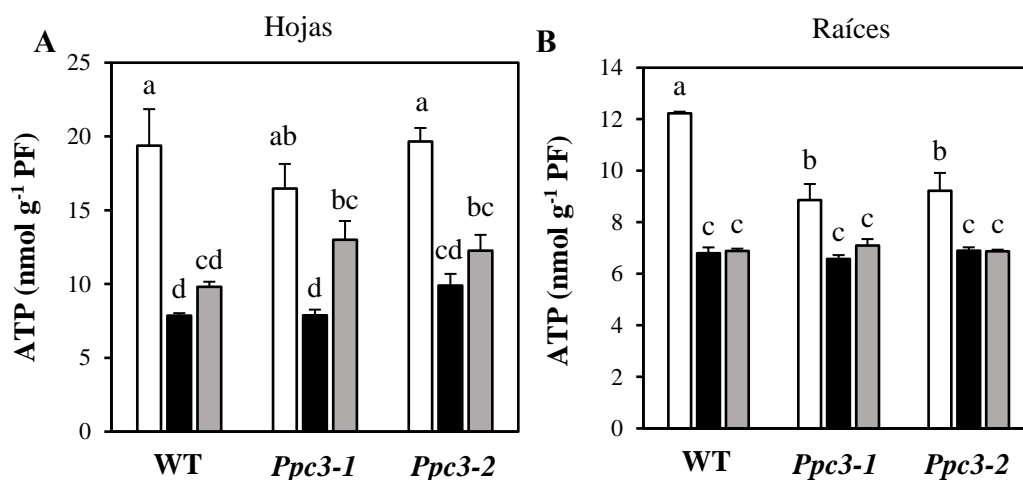


Figura 76. Niveles de ATP en hojas y raíces de plantas WT y *Ppc3* bajo déficit de fósforo. Las plantas de sorgo se cultivaron en condiciones control (C) (medio Hewitt con 1,34 mM NaH₂PO₄), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) como se indica en la Figura 52. **A.** Hojas. **B.** Raíces. Los datos son la media ± EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

2.3.9. Variación en actividades enzimáticas de hojas y raíces como respuesta a la deficiencia de fósforo en plantas WT y *Ppc3*

Debido al papel que tiene el fósforo para el metabolismo de la planta y la importancia de la PEPC en el metabolismo primario y en las relaciones C/N de la planta (O’Leary et al., 2011b), se analizaron las actividades de varias enzimas metabólicas, tanto en hojas como en raíces, de todas las líneas y tratamientos de P realizados.

En hojas, no se detectaron cambios importantes en ninguno de los tratamientos para las enzimas malato deshidrogenasa (MDH), NADP-enzima málica (NADP-ME) y NAD-enzima málica (NAD-ME) en ninguna de las líneas (**Fig. 77A,B,C**). Por otra parte, ambos tratamientos de P (-P y PCa) inhibieron totalmente la actividad de las enzimas aspartato aminotransferasa (AAT) y glutamato sintasa (GOGAT) (**Fig. 77D,E**). La deficiencia de P provocó una disminución significativa de la actividad citrato sintasa (CS), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), y piruvato quinasa (PK), siendo esta pérdida de actividad ligeramente menor en el tratamiento PCa. No se encontraron diferencias significativas entre las distintas líneas, aunque la actividad CS fue ligeramente inferior en las líneas silenciadas (**Fig. 77F,G,H**). Por el contrario, el déficit de P indujo significativamente la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamina sintetasa (GS) y ligeramente la actividad de la nitrato reductasa (NR). En este último caso, se observó un mayor nivel de actividad en las líneas modificadas en todas las condiciones, aunque no resultó significativo (**Fig. 77I,J,K**).

En raíces, no se encontraron diferencias importantes en las enzimas MDH, NADP-ME, AAT y NR (**Fig. 78A,B,C,D**). El déficit de P redujo la actividad de enzimas como CS, ICDH, GOGAT y aconitasa (ACO) (**Fig. 78E,F,G,H**), mientras que incrementó las actividades de las enzimas NAD-ME, GDH y GS (**Fig. 78I,J,K**). Sin embargo, en ninguna de estas enzimas se detectaron diferencias entre las plantas WT y las líneas silenciadas.

Por último, cabe destacar la enzima PK, cuya actividad fue significativamente menor en las líneas silenciadas en todos los tratamientos respecto a la actividad medida en raíces WT. El tratamiento -P redujo ligeramente la actividad en las líneas silenciadas, pero no en la WT. El tratamiento PCa incrementó levemente esta actividad enzimática en todas las líneas respecto a su control, aunque los valores fueron significativamente menores en las líneas silenciadas respecto a la WT (**Fig. 78L**).

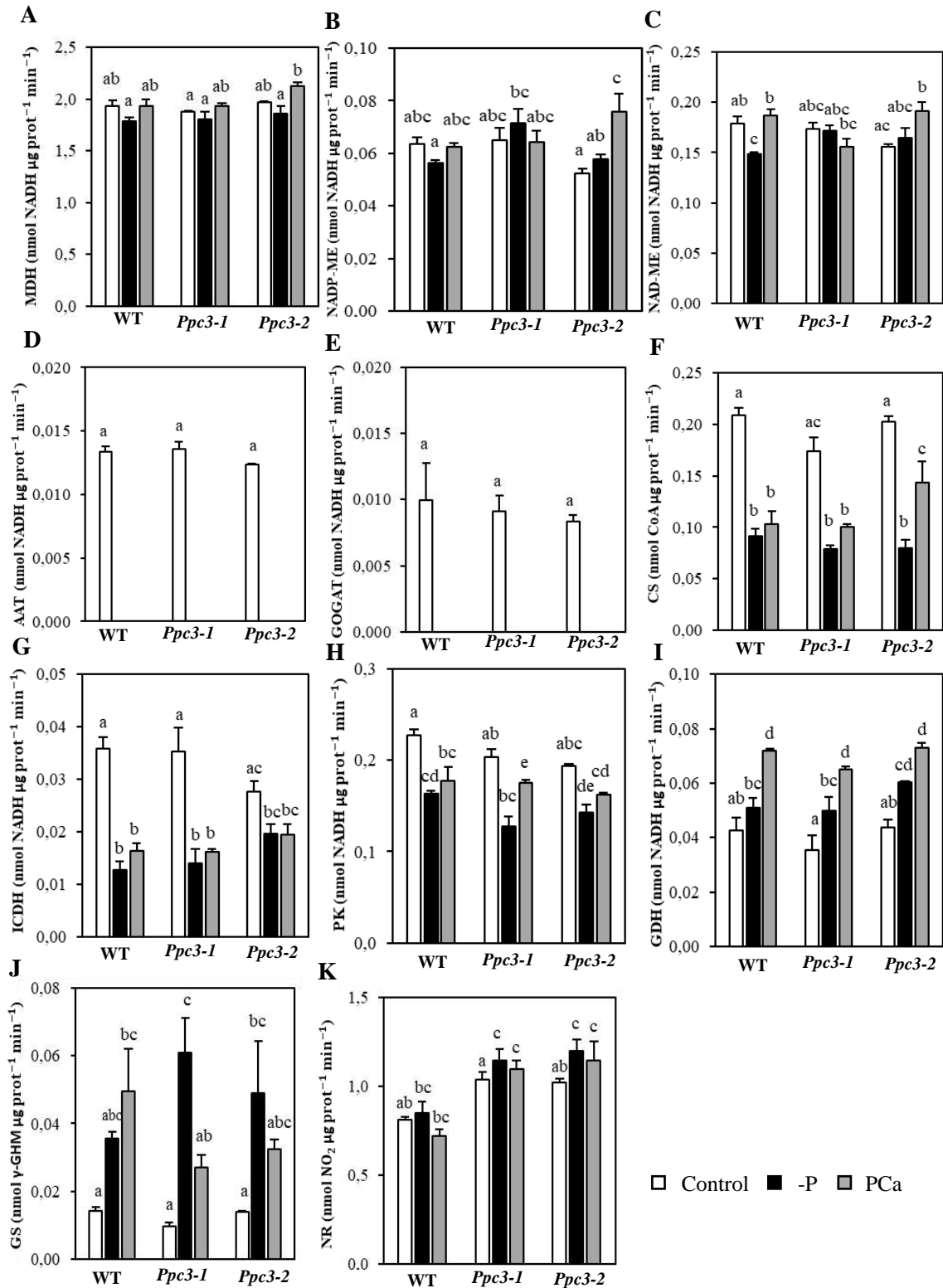


Figura 77. Determinación de actividades enzimáticas en hojas de sorgo. Las plantas de sorgo crecieron en condición control (C), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) durante tres semanas. Al finalizar el tratamiento se realizaron las medidas de las distintas actividades enzimáticas. **A.** Malato deshidrogenasa (MDH). **B.** NADP-enzima málica (NADP-ME). **C.** NAD-enzima málica (NAD-ME). **D.** Aspartato aminotransferasa (AAT). **E.** Glutamato sintasa (GOGAT). **F.** Citrato sintasa (CS). **G.** Isocitrato deshidrogenasa (ICDH). **H.** Piruvato quinasa (PK). **I.** Glutamato deshidrogenasa (GDH). **J.** Glutamina sintetasa (GS). **K.** Nitrato reductasa (NR). Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, $P < 0,05$).

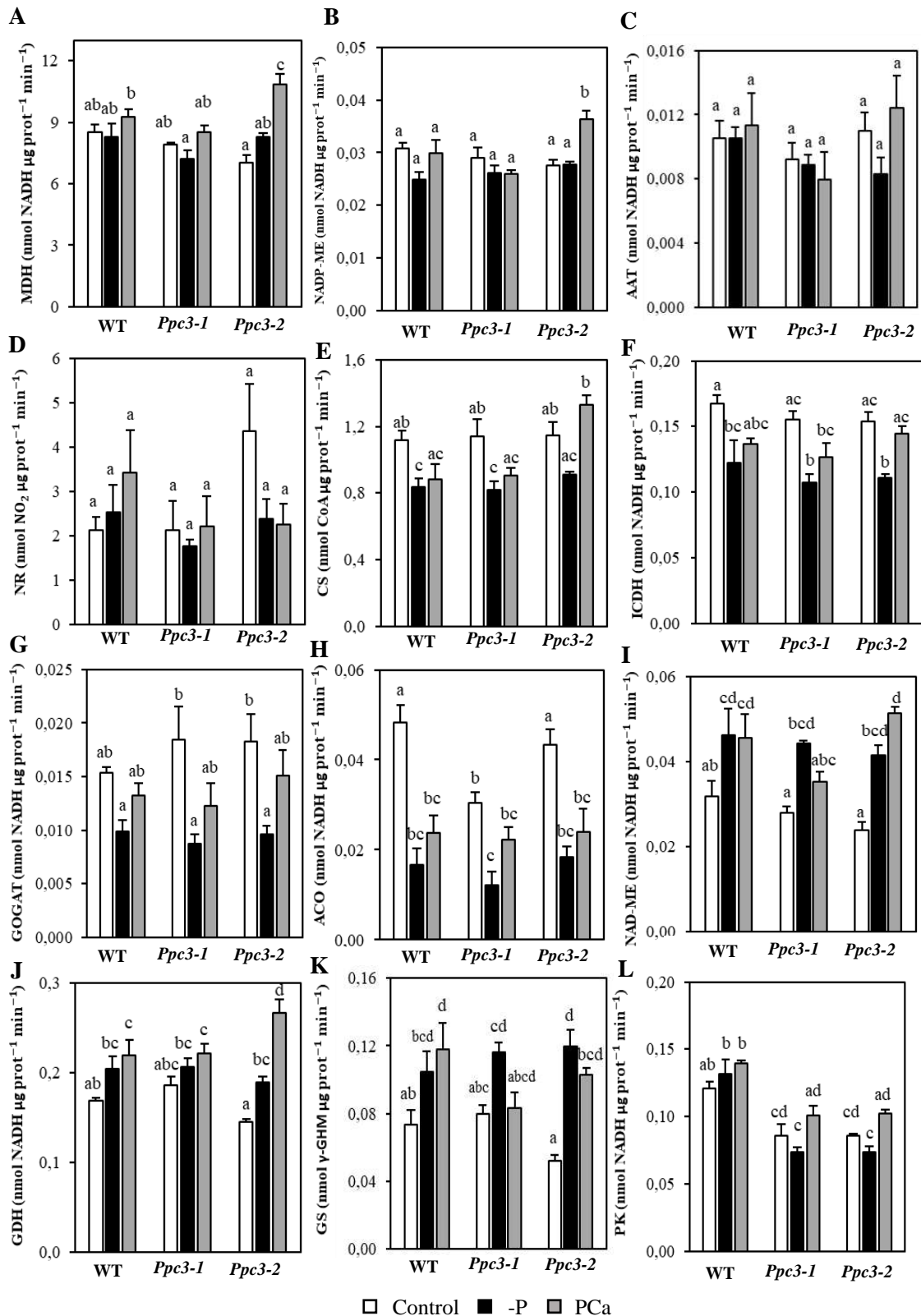


Figura 78. Determinación de actividades enzimáticas en raíces de sorgo. Las plantas de sorgo crecieron en condición control (C), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM Ca₃(PO₄)₂) durante tres semanas. Al finalizar el tratamiento se realizaron las medidas de las distintas actividades enzimáticas. **A.** Malato deshidrogenasa (MDH). **B.** NADP-enzima málica (NADP-ME). **C.** Aspartato aminotransferasa (AAT). **D.** Nitrato reductasa (NR). **E.** Citrato sintasa (CS). **F.** Isocitrato deshidrogenasa (ICDH). **G.** Glutamato sintasa (GOGAT). **H.** Aconitasa (ACO). **I.** NAD-enzima málica (NAD-ME). **J.** Glutamato deshidrogenasa (GDH). **K.** Glutamina sintetasa (GS). **L.** Piruvato quinasa (PK). Los datos son la media ± EE (n = 3). Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Duncan, P<0,05).

3. OBTENCIÓN DE PLANTAS DE SORGO CON LOS GENES *SbPPCK1-3* SILENCIADOS MEDIANTE ARN INTERFERENTE

A lo largo de este capítulo se describe la obtención de plantas de sorgo con los genes de las tres isoformas de PEPCk (*SbPPCK1*, *SbPPCK2* y *SbPPCK3*) silenciados mediante la técnica del ARN interferente (ARNi). La metodología empleada para la obtención de este mutante fue similar a la empleada para obtener las líneas silenciadas de *SbPPCK3* (*Ppc3-1* y *Ppc3-2*): En primer lugar, la construcción del vector y la transformación de embriones inmaduros de sorgo; posteriormente la selección de los transformantes y la obtención de la progenie T2 y T3. Además, mediante secuenciación completa del genoma de las diferentes líneas, se obtuvieron los sitios de inserción de la construcción.

3.1. Construcción del vector y transformación de embriones

El plásmido pFGC161 es un plásmido binario que permite silenciar genes en cereales mediante la técnica del ARNi (Do et al., 2016). Éste fue usado para obtener el sorgo *Ppc3* mostrado en los capítulos anteriores y también para obtener estas nuevas líneas de sorgo con los genes que codifican las tres isoformas de PPCK (*SbPPCK1-3*) silenciados. En primer lugar, hay que destacar varias características del ADN-T presente en este plásmido: contiene el gen *bar* bajo control del promotor constitutivo Ubi1. Este gen confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA®), el cual es inhibidor de la glutamina sintetasa (GS). Al inhibir esta enzima, las plantas que no posean el gen de resistencia *bar* acumularán amonio en sus tejidos y mostrarán síntomas de toxicidad al aplicarles el herbicida, mientras que las plantas que lo posean no mostrarán dichos síntomas. Mediante esta herramienta se pueden seleccionar de manera rápida y sencilla las plantas transformadas. Además, el plásmido pFGC161 contiene un intrón del gen *waxy* de arroz con los sitios de clonación múltiple (MSC) en los extremos 3' y 5'. Esos sitios MSC poseen numerosos sitios de restricción para insertar una región, más o menos extensa (300-1000 pb), del gen que se quiere silenciar, en sentido y anti-sentido. El transcrito del gen *waxy* actuará a modo de “bisagra” para que se pueda producir físicamente la torsión de la estructura del ARN generado, y por la complementariedad de bases, se genere un ARN de doble cadena. Esta zona del plásmido se encuentra bajo el control del promotor del gen *35S* del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), lo que provoca la sobreexpresión del mismo en la planta y la generación de gran cantidad de ARN de doble cadena. Las células de la planta, con su propia maquinaria de defensa, actuarán destruyendo todo el ARNm que se parezca lo suficiente al ARN de doble cadena generando, y provocando así el silenciamiento efectivo del gen (Fjose et al., 2001).

Debido a la enorme homología de secuencia que existe entre los 3 genes *SbPPCK* superior al 70%. Para silenciar los tres a la vez se empleó la secuencia codificante (CDS) completa del gen *SbPPCK1* (855 pb), que fue insertada en orientación sentido y anti-sentido en los sitios MSC a ambos lados del gen *waxy* (**Fig. 79**). Para clonar el fragmento deseado en el vector, en primer lugar, se amplificó el ADNc (sin intrones) del gen *SbPPCK1* usando una polimerasa de alta fidelidad y cebadores que tenían una región

específica del gen y dos sitios de corte de enzimas de restricción. Concretamente, se utilizaron los sitios para las enzimas SpeI y AscI en el cebador directo y SacI y AvrII en el reverso (**Tabla 3**). En primer lugar, se insertó la secuencia en sentido 5'→3'. Para ello, se cortó el fragmento con las enzimas AscI y AvrII y se ligó con el plásmido pFGC161. Con el producto resultante se transformó *E. coli* DH5α mediante choque térmico y se seleccionaron las bacterias transformadas con kanamicina, resistencia aportada en el vector. Posteriormente, se purificaron los plásmidos y se confirmó la inserción de *SbPPCK1* mediante PCR utilizando cebadores específicos para este gen. Para insertar la secuencia en sentido inverso en el plásmido anteriormente transformado, se utilizaron las enzimas de restricción SacI y SpeI, repitiendo el mismo procedimiento de corte y ligación. Los diferentes candidatos de poseer el plásmido con las copias en sentido y anti-sentido del gen *SbPPCK1* (pFGC161-PPCK) se confirmaron mediante ensayos de restricción y secuenciación. En la figura **K1** se muestra la estructura del vector pFGC161-PPCK generado y la secuencia de 855 pb utilizado clonada en sentido y anti-sentido.

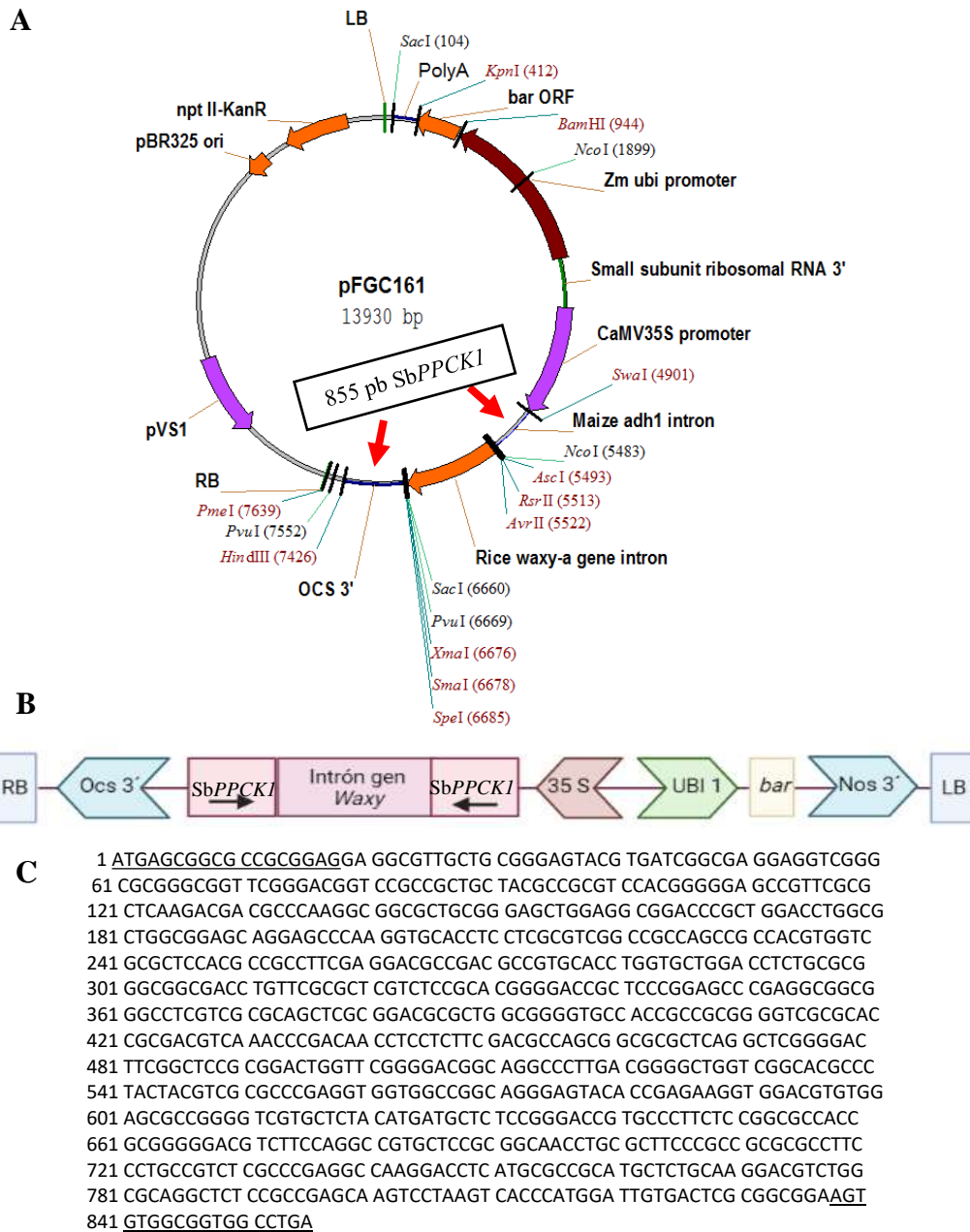


Figura 79. Construcción del plásmido de silenciamiento. **A.** Vector binario pFGC161-PPCK que contiene el casete donde se insertó, en sentido y anti-sentido, el fragmento de ADN de 855 pb correspondiente a la secuencia codificante (CDS) del gen *SbPPCK1* de sorgo, mediante las enzimas de restricción *AscI* y *AvrII*; *SacI* y *SpeI*, respectivamente. Las flechas rojas indican los sitios donde se realizaron ambas inserciones del gen de interés. **B.** Esquema del ADN-T insertado en el genoma de sorgo para el silenciamiento de las 3 isoformas de PEPCK. Adaptado de Gasparis et al., 2011. **C** Secuencia codificante (CDS) del gen *SbPPCK1*. Para la inserción del amplicón en el plásmido pFGC161 se emplearon las 855 pb del CDS de este gen. Los nucleótidos subrayados corresponden a la secuencia específica empleada para diseñar los cebadores utilizados, mostrados en la tabla 3.

3.2. Transformación de embriones de sorgo

La obtención de las plantas silenciadas fue realizado mediante la transformación de embriones inmaduros de plantas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench, cultivar público P898012, USD, según el método descrito por Do et al. (2018) en el Servicio de Transformación de Plantas de la Universidad de Missouri (EE.UU) a cargo del Dr. Zhanyuan Zhang. Para ello, se extrajeron embriones de semillas inmaduras recolectadas de panículas de 11-14 días tras la polinización y se inocularon con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 conteniendo el plásmido pFGC161-PPCK. A continuación, se indujo la formación de callos a partir de los embriones en placas en oscuridad con medio de inducción de callos en presencia de BASTA® durante 10 días.

Los callos de los transformantes que crecieron en el medio selectivo se colocaron en cajas de cultivos con medio de inducción de hojas (Do et al., 2018), cultivándose en cámaras de cultivo con un fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad durante 6 – 10 semanas, hasta que finalmente se desarrollaron entre 3 y 4 hojas sanas. Posteriormente, se traspasaron a cajas con medio de enraizamiento durante 3 semanas en las mismas condiciones. Las plantas regeneradas fueron cultivadas en invernadero para obtener semillas (Do et al., 2016). Así se lograron obtener un total de 12 líneas (*Ppck1-12*) de plantas procedentes de eventos de inserción independientes (T0). Estas plantas transformadas produjeron semillas (T1) que fueron enviadas a nuestro laboratorio y empleadas para la realización de este capítulo de la tesis.

3.3. Confirmación y selección de las líneas silenciadas T1 y obtención de semillas T2

En primer lugar, se realizó una siembra de 20 semillas de cada línea en tierra para confirmar la inserción del ADN-T mediante la aplicación de BASTA®. El herbicida se aplicó a plantas de 12 días (**Fig. 80**). Las plantas silenciadas que no mostraron efectos del herbicida fueron trasplantadas en maceteros y cultivadas en invernadero para la obtención de semillas T2.

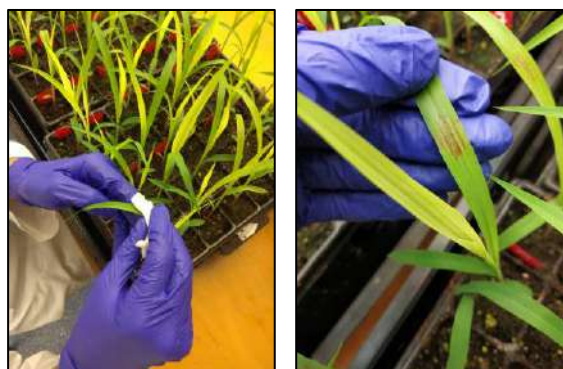


Figura 80. Selección por BASTA®. Efecto del herbicida en hojas de la planta silvestre. Las plantas fueron tratadas con BASTA® días alternos durante una semana. Plantas cultivadas en tierra durante 12 días.

Para confirmar la inserción del ADN-T en las plantas seleccionadas por aplicación de BASTA[®], se analizó mediante PCR la presencia de los genes *waxy* o *bar*, presentes en el ADN-T (**Fig. 81**). Las plantas en las que no se encontró la presencia de estos genes se eliminaron, mientras que el resto de plantas continuaron creciendo para obtener la generación T2.

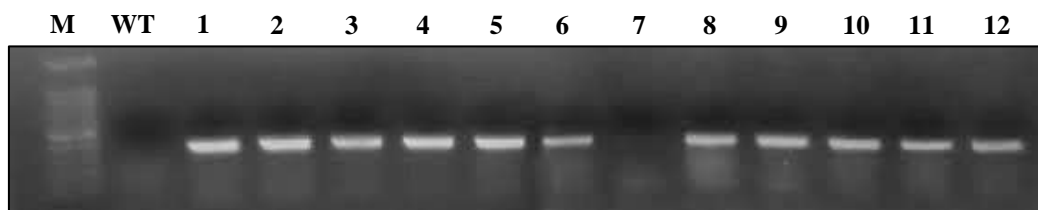


Figura 81. Ejemplo de confirmación por PCR de la inserción del ADN-T. Presencia del gen *waxy* en ADN genómico de hojas de plantas WT y de las plantas sembradas y preseleccionadas con BASTA[®] de la línea *Ppck-4* de la generación T1. Se observa que todas las sublíneas, excepto la 7, presentan en su genoma el gen *waxy* y, por tanto, tienen la inserción del ADN-T. M: marcador de peso molecular; WT: línea silvestre; 1-12: distintas plantas pertenecientes a la línea *Ppck-4*.

En estas plantas seleccionadas por BASTA[®] y por PCR, se determinó el nivel de expresión de las 3 isoformas de *SbPPCK* para poder seleccionar aquellas líneas con mayor grado de silenciamiento para los estudios posteriores. Para ello, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) cuantificando la expresión de *SbPPCK1*, *SbPPCK2* y *SbPPCK3* usando cebadores específicos de cada gen (**Tabla 3**) y ADNc procedente de hojas. De todas las líneas, se preseleccionaron *Ppck-2*, *Ppck-4* y *Ppck-9*, las cuales presentaron, respectivamente, una reducción promedio de la expresión de los 3 genes *SbPPCK* de un 58, 35 y 67% respecto a la expresión en la línea WT (**Fig. 82**). En particular, la línea *Ppck-2* presentó un silenciamiento en hojas del 47, 44 y 84 % para *SbPPCK1*, *SbPPCK2* y *SbPPCK3*, respectivamente; la línea *Ppck-4*, del 12, 20 y 73 %; y por último la línea *Ppck-9* tuvo un silenciamiento del 83, 44 y 74 % para los genes *SbPPCK*.

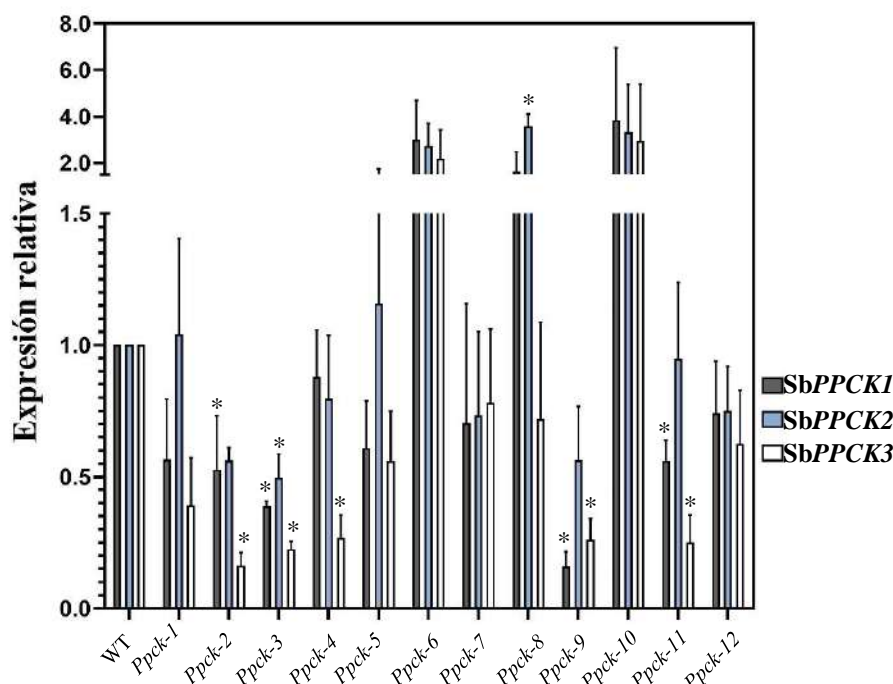


Figura 82. Expresión relativa de los genes SbPPCK en hojas de sorgo. Se tomaron muestras de hojas de sorgo de un mes, crecido en tierra y en condiciones control. El nivel relativo de ARNm de cada gen individual se normalizó con respecto al gen *SbActina*. Los datos se representan con respecto al WT (tanto por uno). Los datos son la media \pm EE (n = 3). *, $P < 0,05$ versus WT (*t test*) para cada gen.

Especialmente dos de las líneas modificadas (*Ppck-2* y *9*) sufrieron una reducción significativa en la altura alcanzada por la planta cultivada en invernadero del 10% y 35%, respectivamente, respecto a la altura de la línea WT (**Fig. 83A**). Además, especialmente también en la línea *Ppck-9*, se observó un cambio en la morfología de la planta, la cual no solo tenía una altura drásticamente menor, sino que también presentó una menor distancia entrenudos de modo que todas sus hojas aparecían agrupadas en la parte final del tallo, fenómeno que no se observó en las otras líneas (**Fig. 83B**).

Las plantas sembradas y confirmadas de cada una de las 12 líneas se cultivaron en invernadero de junio a octubre, mes en el que se realizaron medidas biométricas y se recolectaron las semillas de la generación T2, cuantificándose la producción de las mismas en todas las líneas y comparando los resultados con la planta WT (**Tabla 9**). En este análisis inicial se observó que en algunas líneas modificadas se alteraban algunos de los parámetros medidos. Sin embargo, la única línea que presentó unos efectos destacados sobre diversos parámetros fue *Ppck-9*. Además de la menor altura y distinta morfología mencionadas anteriormente, las plantas de esta línea tuvieron una disminución drástica en la producción de semillas, aunque éstas fueron de un tamaño mayor que las de las plantas WT.

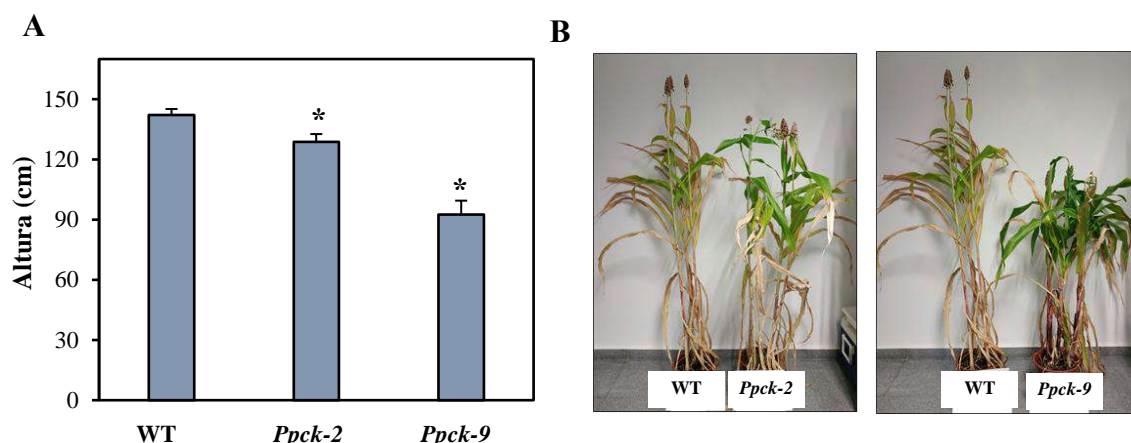


Figura 83. Efectos del silenciamiento de SbPPCK1-3 en el crecimiento de plantas de sorgo T1. A. Se representa la altura de las plantas como media \pm EE (n = 5-9). *, $P < 0,05$ versus WT (t test). **B.** Imágenes de las líneas *Ppck-2*, 3 y 9 comparadas con la planta WT a los aproximadamente dos meses de crecimiento

Tabla 9. Efectos del silenciamiento de SbPPCK1-3 en el crecimiento y la producción de plantas de sorgo. Plantas de sorgo T1 fueron cultivadas en invernadero durante los meses de junio a octubre. Al finalizar su crecimiento se cuantificó la altura de la planta, la longitud y el peso de las espigas y la producción de semillas: tanto el peso total, como su número y el peso medio de cada semilla. Los datos son la media \pm EE (n = 5-9), * $P < 0,05$ versus WT (t-test) dentro de cada columna.

LÍNEA	Altura planta (cm)	Longitud espiga (cm)	Peso espiga (g)	Peso semillas (g)	Número semillas	Peso por semilla (g)
WT	142 \pm 2,9	13,5 \pm 0,5	12,0 \pm 2,4	9,90 \pm 2,1	365 \pm 60,6	0,026 \pm 0,0012
<i>Ppck-1</i>	139 \pm 3*	14,4 \pm 0,9	9,8 \pm 1,2	9,88 \pm 1,2	300 \pm 44,9	0,035 \pm 0,003*
<i>Ppck-2</i>	129 \pm 3,9*	12,1 \pm 0,7	9,2 \pm 1,6	8,30 \pm 1,3	271 \pm 49,7	0,033 \pm 0,0019*
<i>Ppck-3</i>	120 \pm 4,1	13,8 \pm 0,7	17,0 \pm 2	12,77 \pm 2,1	479 \pm 62,1*	0,027 \pm 0,0029
<i>Ppck-4</i>	151 \pm 3,6	11,7 \pm 0,3*	9,0 \pm 0,8	8,15 \pm 0,7	268 \pm 22,7	0,031 \pm 0,0014*
<i>Ppck-5</i>	147 \pm 6,9	13,2 \pm 1,2	11,2 \pm 1,9	12,99 \pm 4,7	453 \pm 121,5	0,029 \pm 0,0032
<i>Ppck-6</i>	145 \pm 4,3	11,4 \pm 0,4*	9,4 \pm 0,7	7,50 \pm 0,7	246 \pm 22,4	0,031 \pm 0,0012*
<i>Ppck-7</i>	138 \pm 7,5	15,1 \pm 0,6	18,2 \pm 2,6	15,4 \pm 1,9*	587 \pm 77,6*	0,026 \pm 0,0011
<i>Ppck-8</i>	138 \pm 4,4	12,5 \pm 1,3	11,4 \pm 1,9	9,36 \pm 1,6	392 \pm 85,2	0,025 \pm 0,0017
<i>Ppck-9</i>	93 \pm 6,9*	10,9 \pm 0,7	3,5 \pm 0,8*	1,59 \pm 0,7*	43 \pm 16,7*	0,034 \pm 0,0016*
<i>Ppck-10</i>	135 \pm 8,8	12,1 \pm 1	8,0 \pm 2,1	6,18 \pm 1,6	310 \pm 79,9	0,020 \pm 0,001*
<i>Ppck-11</i>	127 \pm 5,4*	12,5 \pm 0,8*	10,0 \pm 1,2	8,23 \pm 0,9	300 \pm 42,4	0,028 \pm 0,0012
<i>Ppck-12</i>	140 \pm 4,6	14,6 \pm 0,7	13,5 \pm 1,3	11,04 \pm 1,1	420 \pm 41,5	0,026 \pm 0,003

El cultivo de plantas visto anteriormente permitió la obtención de semillas correspondientes a la generación T2. Para determinar cuáles de las sublíneas de la generación T2 obtenidas eran homocigotas, se sembraron 15 semillas de cuatro sublíneas escogidas al azar de las líneas silenciadas seleccionadas para continuar su caracterización inicial (*Ppck-2*, 4 y 9) y de la planta WT. Cuando estas plantas alcanzaron un tamaño apropiado, se aplicó BASTA[®] y se analizó mediante PCR la presencia de los genes *waxy*, *bar* y *35S* en las plantas sembradas. Las sublíneas donde todas las plantas analizadas mostraron resistencia al herbicida y poseían los genes analizados por PCR, se consideraron homocigotas y fueron sembradas en invernadero para obtener semillas T3. Las semillas T2 consideradas como homocigotas fueron empleadas para el estudio del silenciamiento de los genes *PPCK* sobre la fosforilación de la PEPC en condiciones de estrés abiótico.

3.4. Identificación de los sitios de inserción del ADN-T en el genoma de sorgo

Con el objetivo de determinar el lugar del genoma en el que se produjo la inserción del ADN-T y poder conocer si ésta había provocado la interrupción de algún otro gen, se procedió a la secuenciación del genoma completo de las líneas *Ppck-2*, *Ppck-4* y *Ppck-9* utilizando ADN genómico extraído de hojas de la generación T3. Esta fue llevada a cabo en los servicios de secuenciación de la empresa Novogene (Cambridge, UK).

Los datos proporcionados por Novogene permitieron identificar los sitios de inserción que se muestran en la **tabla 10**. La línea *Ppck-2* presentó una inserción en el cromosoma 1 (NC_012870.2). Esta inserción se encontró a 2683 pb del extremo 5' del gen miembro 44 de la familia 25 de transportadores de solutos (LOC8059798 XP_002468411) y a 6882 pb del extremo 3' del gen que codifica para una proteína no caracterizada (LOC110431802 XP_021307090). La línea *Ppck-4* presentó dos inserciones, una en el cromosoma 1 y otra en el cromosoma 2. En el cromosoma 1 la inserción se localizó a 2231 pb del extremo 5' del gen de la peroxidasa 5 (LOC8062867 XP_002467585) y a 5120 pb del extremo 3' de otra peroxidasa 5 (LOC8058813 XP_002467586). Por otra parte, la inserción hallada en el cromosoma 2 fue localizada a 1920 pb del extremo 5' del gen asparragina-ARNt ligasa (LOC8080686 XP_002460704) y a 228 pb del extremo 3' del gen de la proteína relacionada con WAT1 At5g47470 (LOC8077443 XP_021310390). Por último, en la línea *Ppck-9* se localizó una única inserción en el cromosoma 5, en este caso la inserción se produjo dentro del intrón (35.298-37.426) del gen cafeoilshikimate esterasa. Este gen forma parte de la ruta de biosíntesis de lignina (Vanholme et al., 2013). La pérdida de función de este gen podría explicar el fenotipo tan marcado mostrado en los distintos parámetros medidos a lo largo de este capítulo.

Tabla 10. Análisis de los sitios de inserción del ADN-T en las líneas *Ppck*. Los datos, que han sido proporcionados por la empresa Novogene, localizan los diferentes sitios de inserción del ADN-T en las líneas analizadas. **Chr1:** genoma en el que se ha insertado el plásmido; **Pos1:** posición del inserto dentro del genoma; **Chr2:** Secuencia insertada (plásmido pFGC161).

Línea	Chr1	Pos1	Orientación1	Chr2
<i>Ppck-2</i>	NC_012870.2	75666309	14+0-	pFGC161
<i>Ppck-2</i>	NC_012870.2	75666517	0+14-	pFGC161
<i>Ppck-4</i>	NC_012870.2	60151914	0+6-	pFGC161
<i>Ppck-4</i>	NC_012871.2	67984045	14+1-	pFGC161
<i>Ppck-4</i>	NC_012871.2	67984305	1+17-	pFGC161
<i>Ppck-4</i>	NC_012870.2	60151500	2+0-	pFGC161
<i>Ppck-4</i>	NC_012870.2	60151722	3+0-	pFGC161
<i>Ppck-9</i>	NC_012874.2	35916	0+4-	pFGC161

En conclusión, de las 3 líneas *Ppck* seleccionadas por poseer mayor silenciamiento de los genes *SbPPCK* solo dos presentaron la inserción del ADN-T en posiciones que no afectasen a otros genes, las líneas *Ppck-2* y *4*, la primera con una sola inserción y la segunda con dos, mientras que la inserción del ADN-T de la línea *Ppck-9* se produjo en medio de un intrón de un gen de la ruta de biosíntesis de lignina.

3.5. Respuestas a estrés abiótico en líneas de sorgo con los genes *SbPPCK1-3* silenciados

Para determinar las consecuencias del silenciamiento de los genes *SbPPCK1-3*, las distintas líneas silenciadas seleccionadas fueron sometidas a dos condiciones de estrés abiótico: estrés salino y falta de fósforo, puesto que se sabe que ambas incrementan la actividad PEPCk (Echevarría et al., 2001; Monreal et al., 2007a; Feria et al., 2008; Plaxton y Tran, 2011; Kumar et al., 2021; Li et al., 2011, 2022; Ma et al., 2021). Además, la luz es el principal mecanismo inductor de la actividad PEPCk en hojas (Chollet et al., 1996), por lo que también se aplicó un tratamiento de luz-oscuridad.

3.5.1. Efectos del silenciamiento de *SbPPCK* en condiciones de deficiencia de fósforo

En primer lugar, se cultivaron plantas T2 homocigotas de las líneas *Ppck-2* y la planta WT, en las tres condiciones relativas al fósforo descritas en el capítulo 2: medio Hewitt control (C) donde el P se suministra de forma soluble, medio Hewitt sin fuente de P y este mismo medio, pero con fosfato insoluble (PCa) como fuente de P. Estos tratamientos tuvieron una duración de 3 semanas. Tras este tiempo, se tomaron distintas medidas biométricas y se determinó el estado de fosforilación de la PEPC mediante la cuantificación de la IC₅₀ por malato en hojas, así como la actividad PEPC en raíces para cada línea y tratamiento.

La deficiencia de fósforo afectó significativamente al crecimiento de las plantas WT y de las plantas modificadas (**Tabla 11**). Esto se vio reflejado en una reducción del 50% de la altura de las plantas en condiciones de ausencia de P (-P). Por otro lado, el tratamiento con PCa permitió una recuperación significativa de la altura de las plantas, alcanzando niveles similares a las condiciones control. Resultados similares fueron obtenidos a nivel del peso de la parte aérea y de las raíces. El ratio raíz/parte aérea aumentó en condiciones de deficiencia de P, mientras que con fosfato cálcico se alcanzó un valor intermedio entre las condiciones control y sin P (**Tabla 11**). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre WT y *Ppck-2*, si se observó un menor crecimiento de esta última en todos los tratamientos.

Tabla 11. Efectos del silenciamiento de *SbPPCK1-3* y de la falta de fósforo sobre el crecimiento. Las plantas de sorgo crecieron en condición control (C) (medio Hewitt), sin fosfato (-P) o con fosfato insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) durante tres semanas. Al finalizar el tratamiento se cuantificaron los parámetros de crecimiento: altura, peso de la parte aérea y de las raíces y se calculó el ratio raíz/parte aérea a partir del peso fresco de ambos. Los datos son la media \pm EE (n=4, cada réplica biológica de la parte aérea está formada por la medida de 10 plantas distintas y de raíces, por 3 plantas distintas). Las diferentes letras denotan diferencias significativas en cada columna (Duncan, $P < 0,05$).

		Altura (cm)	Peso parte aérea (g)	Peso raíz (g)	Ratio (raíz/parte aérea)
WT	Control	61,5 \pm 0,6 ^a	22,9 \pm 1,5 ^a	11,5 \pm 1,0 ^a	0,49 \pm 0,03 ^a
	-P	29,7 \pm 2,6 ^b	3 \pm 0,2 ^b	4,0 \pm 0,1 ^b	1,20 \pm 0,06 ^b
	PCa	51,6 \pm 1,7 ^{ac}	12,1 \pm 2,7 ^c	9,4 \pm 1,9 ^a	0,80 \pm 0,03 ^d
<i>Ppck-2</i>	Control	56,6 \pm 1,1 ^{ac}	22,6 \pm 3,4 ^a	11,2 \pm 1,2 ^a	0,49 \pm 0,03 ^a
	-P	26,5 \pm 0,2 ^b	2,8 \pm 0,1 ^b	3,8 \pm 0,1 ^b	1,38 \pm 0,05 ^{bc}
	PCa	48,8 \pm 1,3 ^c	10,8 \pm 2,4 ^c	8,1 \pm 1,2 ^a	0,80 \pm 0,07 ^d

En cuanto a la actividad PEPC en hojas, no se observaron cambios significativos con los diferentes tratamientos, aunque, en general, la actividad PEPC en hojas fue menor en la línea modificada (**Fig. 84A**). En raíces, la ausencia de P indujo un incremento en la actividad PEPC respecto al tratamiento control y la adición de fosfato insoluble provocó un nivel intermedio de actividad PEPC. En la línea *Ppck-2*, el incremento de actividad PEPC como respuesta al tratamiento -P fue significativamente mayor al encontrado en raíces WT (**Fig. 84B**). Esto podría indicar que la falta de fosforilación de la PEPC podría ser compensado con un aumento de actividad de la misma.

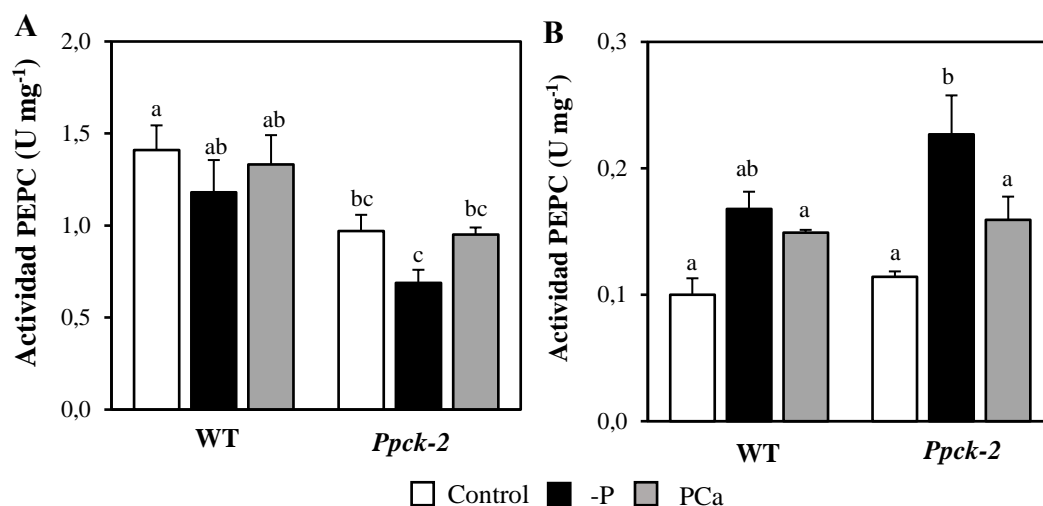


Figura 84. Efectos del silenciamiento de *SbPPCKI-3* y de la falta de fósforo sobre la actividad PEPC. Las plantas de sorgo crecieron en condición control (C) (medio Hewitt), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) durante tres semanas. **A.** Actividad PEPC en hojas. **B.** Actividad PEPC en raíces. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

Además, se determinó el estado de fosforilación de la PEPC en hojas mediante la cuantificación de su IC_{50} para el malato. En plantas WT, el tratamiento -P incrementó significativamente la IC_{50} , mientras que en el tratamiento PCa el valor obtenido fue intermedio entre las condiciones control y -P. Por el contrario, la IC_{50} de las hojas de la línea *Ppck-2* se mantuvo prácticamente constante en ambos tratamientos (**Fig. 85**). Estos resultados muestran que el silenciamiento de los genes *SbPPCKI-3* tiene una repercusión clara en el estado de fosforilación de la PEPC en condiciones de deficiencia de P.

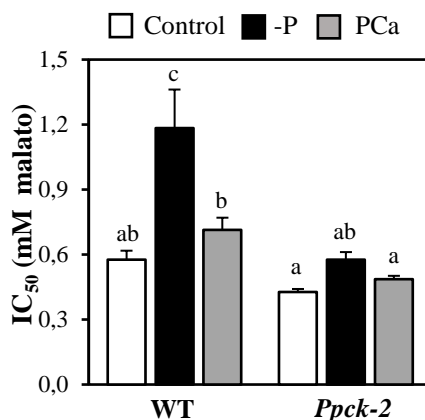


Figura 85. Efectos del silenciamiento de *SbPPCKI-3* y de la falta de fósforo sobre la fosforilación de la PEPC en hojas. Las plantas de sorgo crecieron en condición control (C) (medio Hewitt), sin fósforo (-P) o con fósforo insoluble (PCa, 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) durante tres semanas. Se representa la IC_{50} (mM) para el malato de la PEPC de hojas. Los datos son la media \pm EE (n = 3). Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$).

3.5.2. Efectos del silenciamiento de *SbPPCK1-3* en estrés salino

Plantas WT y de las líneas *Ppck-2* y *Ppck-4* fueron cultivadas hidropónicamente en condiciones de salinidad, como se indica en materiales y métodos. Antes de recolectar los tejidos, se tomaron las hojas más jóvenes totalmente desplegadas de cada planta, línea y tratamiento para exponerlas a la luz o a la oscuridad como se describe en materiales y métodos.

En primer lugar, se realizaron medidas biométricas al finalizar el tratamiento. Tal y como se muestra en la **figura 86**, el tratamiento salino afectó severamente al crecimiento de las plantas de sorgo, siendo más afectada la línea *Ppck-2*.

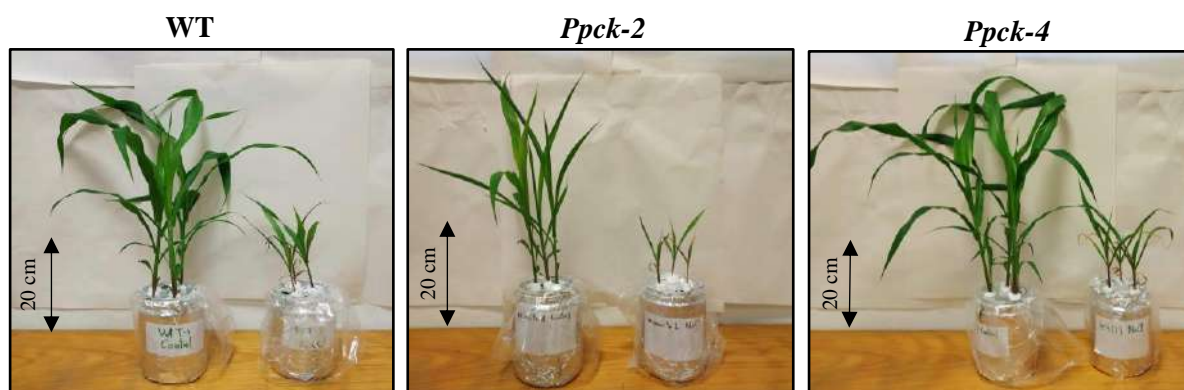


Figura 86. Efectos del silenciamiento de *SbPPCK1-3* y del estrés salino en el crecimiento vegetativo de las plantas. Plantas de sorgo de siete días fueron sometidas a un gradiente de salinidad. En primer lugar, se trataron durante 3 días con 5 g/l, luego la concentración se subió a 10 g/l durante 7 días y finalmente, se mantuvieron 5 días a una concentración de 15 g/l de NaCl. La imagen fue tomada al finalizar el tratamiento.

En cuanto a las medidas biométricas, en primer lugar, se cuantificó la altura de las plantas. En condiciones control, la altura de la línea *Ppck-2* fue significativamente menor, mientras que *Ppck-4* tan solo redujo levemente su altura respecto a la planta WT en estas condiciones. El estrés salino redujo drásticamente la altura de las plantas, encontrando un efecto mayor en las líneas modificadas, especialmente en la línea *Ppck-2*. En cuanto a la biomasa producida, tanto de la parte aérea como de raíces, los resultados fueron en el mismo sentido, siendo la línea *Ppck-2* la que tenía menor biomasa tanto en condiciones control como bajo estrés salino, mientras que la línea *Ppck-4* se vio tan solo ligeramente más afectada por sal que el WT (**Tabla 12**).

Tabla 12. Efecto del silenciamiento de *SbPPCK1-3* y el estrés salino en el crecimiento vegetativo de las plantas. Plantas de sorgo sometidas a estrés salino como se indica en materiales y métodos. Las medidas se realizaron al finalizar el tratamiento. Se muestran la altura de la planta, el peso fresco de la parte aérea y de las raíces. Los datos son la media \pm EE (n = 3-4). Las diferentes letras denotan diferencias significativas en cada columna (Duncan, $P < 0,05$).

		Altura planta (cm)	Peso parte aérea (g)	Peso raíz (g)
WT	Control	53,9 \pm 0,5 ^a	5,2 \pm 0,15 ^a	3,9 \pm 0,17 ^a
	NaCl	20,4 \pm 0,45 ^c	0,47 \pm 0,03 ^c	0,49 \pm 0,02 ^c
<i>Ppck-2</i>	Control	35,6 \pm 2,5 ^b	1,8 \pm 0,1 ^b	1,7 \pm 0,13 ^b
	NaCl	14,5 \pm 0,9 ^d	0,29 \pm 0,04 ^c	0,39 \pm 0,07 ^c
<i>Ppck-4</i>	Control	50,8 \pm 0,9 ^a	5,4 \pm 0,6 ^a	3,7 \pm 0,56 ^a
	NaCl	19 \pm 1,9 ^{cd}	0,37 \pm 0,1 ^c	0,34 \pm 0,1 ^c

Posteriormente, se determinó la actividad y el estado de fosforilación de la PEPC en hojas iluminadas o en oscuridad procedentes de las plantas cultivadas en condiciones control y de estrés salino. La actividad PEPC en hojas fue similar entre las plantas WT y todas las líneas silenciadas, aunque la actividad PEPC aumentó en condiciones de estrés salino, no se detectaron diferencias significativas (**Fig. 87A**). Por otro lado, el estado de fosforilación de la PEPC de hojas fue medido determinando la IC_{50} para malato de esta enzima. El estrés salino no alteró la IC_{50} en hojas respecto a las condiciones control en ninguna de las plantas. Sin embargo, la iluminación de las hojas sí tuvo efectos importantes sobre la IC_{50} de la PEPC independientemente de si las plantas habían crecido en condiciones control o bajo estrés salino. La iluminación incrementó la IC_{50} en hojas de todas las líneas, aunque el incremento fue significativamente mayor en la planta WT que en las líneas modificadas, especialmente en la línea *Ppck-2* donde el incremento en la IC_{50} fue severamente menor (**Fig. 87B**).

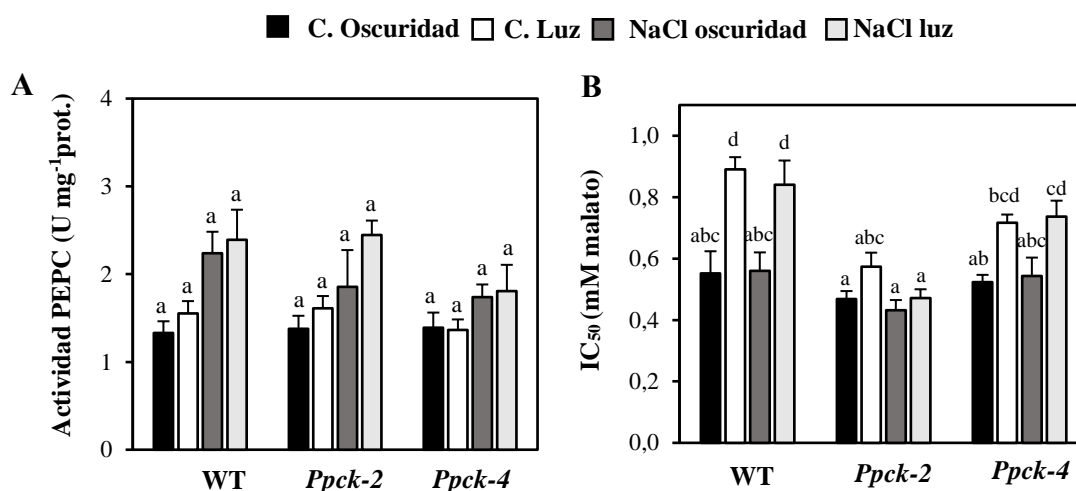


Figura 87. Efecto del estrés salino en la actividad y fosforilación de la PEPC de hojas de plantas de sorgo WT y *Ppck*. P lantans de sorgo sometidas a un gradiente de salinidad (3 días con 5 g/l, 7 días con 10 g/l y 5 días con 15 g/l de NaCl). Hojas de estas plantas fueron iluminadas o mantenidas en oscuridad durante 2 h como se describe en materiales y métodos. **A.** Actividad PEPC a pH 8. **B.** IC₅₀ de la PEPC para el malato. Los datos son la media ± EE (n = 4). Las diferentes letras denotan diferencias significativas (Duncan, P<0,05).

3.6. Efectos del silenciamiento de *SbPPCK1-3* sobre el tiempo de floración y la productividad

A continuación, estudiamos el efecto del silenciamiento sobre la floración y la productividad de las líneas anteriores cultivando las distintas líneas en macetas con tierra en invernadero, como se indica en materiales y métodos. En primer lugar, se encontró que las plantas silenciadas sufrían un retraso en la floración, siendo mayor en la línea *Ppck-4*. A los 50 días, el porcentaje de plantas con flor era del 50% en la línea WT, del 14 % en las líneas *Ppck-2*, mientras que en la línea *Ppck-4* no había ninguna planta florecida (**Fig. 88**). Además, en esta línea no llegaron a florecer todas las plantas sembradas, mientras que sí lo hicieron las demás.

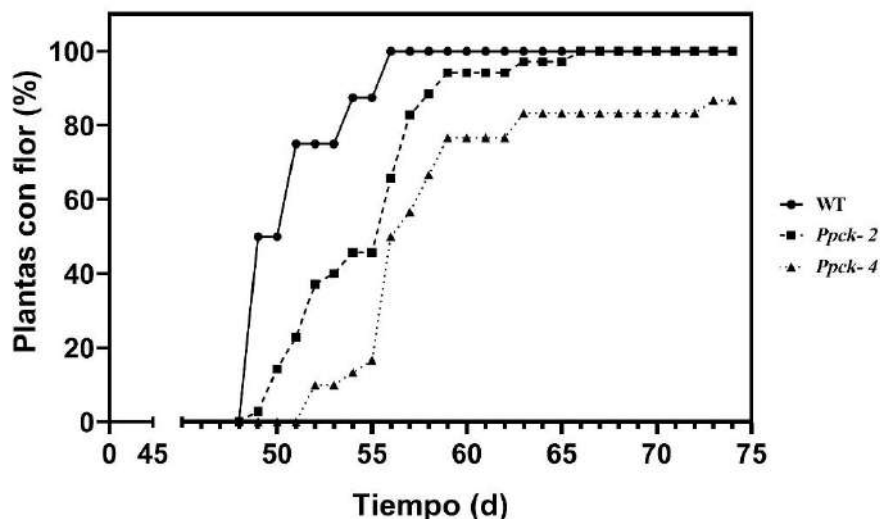


Figura 88. Tiempo de floración de plantas de sorgo WT y *Ppck*. Plantas de sorgo de las líneas WT, *Ppck-2* y *Ppck-4* crecieron en el invernadero hasta la obtención de semillas, se determinó el tiempo de floración de cada planta.

Posteriormente, se analizaron las espigas producidas por las diferentes líneas (**Fig. 89**). Todos los parámetros medidos (longitud y peso de la espiga, número y peso total de las semillas producidas por planta) se vieron reducidos en las líneas *Ppck*. Esta reducción fue mayor en la línea *Ppck-2*, mientras que la línea *Ppck-4* mantuvo unos valores intermedios de todos estos parámetros (**Tabla 13**). Resultados similares fueron obtenidos al cuantificar la producción total en número y en peso de semillas de todas las plantas sembradas (**Tabla 14**). Por otro lado, el volumen y el peso de las semillas fue mayor en las líneas *Ppck-2* y *4*, mostrando que estas líneas, aunque producían una menor cantidad de semillas, éstas eran de un mayor tamaño (**Tabla 13**).

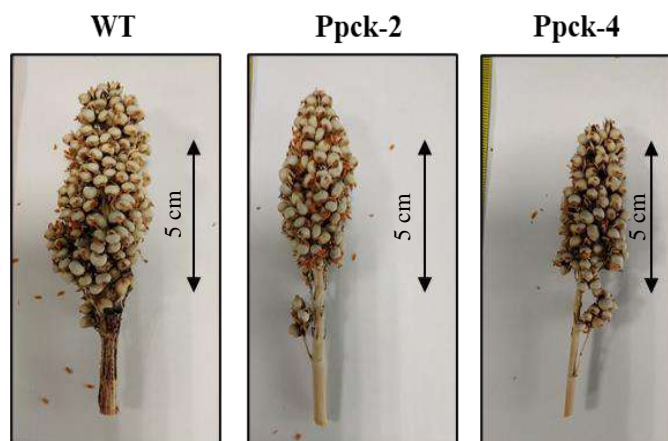


Figura 89. Aspecto de las espigas de plantas de sorgo WT y *Ppck*. Espigas obtenidas de plantas de sorgo de las líneas WT, *Ppck-2* y *Ppck-4* cultivadas en invernadero en el momento de la cosecha.

Tabla 13. Efecto del silenciamiento de SbPPCK1-3 sobre las espigas y la producción de semillas. Plantas de sorgo de las líneas WT, *Ppck-2* y *Ppck-4* fueron cultivadas en invernadero durante 6 meses hasta la obtención de semillas. Se midió la longitud y peso de las espigas y el número y peso total de las semillas producidas. Los datos son la media \pm EE (n = 4, siendo n cada espiga producida). Cuantificó el volumen, el eje relación y el peso por semilla. Los datos son la media \pm EE (n = 3). *P<0,05 versus WT (t-test) dentro de cada columna.

	Longitud espiga (cm)	Peso espiga (g)	Nº semillas por planta	Peso total semillas por planta (g)	Volumen (mm ³)	Eje relación	Peso 1 semilla (g)
WT	9,3 \pm 0,8	6,9 \pm 0,8	204 \pm 20	5,7 \pm 0,6	28,9 \pm 1,46	1,01 \pm 0,01	0,024 \pm 0,001
<i>Ppck-2</i>	7,3 \pm 0,12*	4 \pm 0,5*	101 \pm 20*	3,4 \pm 0,4*	35,3 \pm 1,9	0,99 \pm 0,01	0,033 \pm 0,001*
<i>Ppck-4</i>	8,2 \pm 0,6	5,2 \pm 1,1	131 \pm 22	4,3 \pm 0,6	37,4 \pm 1,93*	0,99 \pm 0,01	0,035 \pm 0,001*

Tabla 14. Efecto del silenciamiento de SbPPCK1-3 sobre la producción de semillas. Número y peso total de las semillas producidas por las plantas WT, *Ppck-2* y *4* cultivadas en invernadero.

	Nº de semillas	Peso total de semillas
WT	819	22,9
<i>Ppck-2</i>	405	13,5
<i>Ppck-4</i>	526	17,5

Finalmente, se caracterizó la composición de las semillas. El silenciamiento de SbPPCK1-3 alteró el contenido de proteínas y provocó una disminución en el contenido de almidón de las semillas, siendo más severo en la línea *Ppck-4*. Por otra parte, incrementó el contenido de taninos y de fitatos, de forma más importante en las líneas *Ppck-2* y *Ppck-4*, respectivamente, y, además, alteró el contenido de fenoles, aumentando en la línea *Ppck-2* (Tabla 15). Aunque los resultados varían entre las dos líneas mutantes, son potencialmente muy interesantes, ya que parámetros como los taninos y los fitatos, que se consideran antinutrientes, pueden tener un gran impacto sobre la calidad nutricional de las semillas (Raboy, 2009; Dehghanian et al., 2022).

Tabla 15. Caracterización de semillas secas WT, *Ppck-2* y *Ppck-4*. Se analizó la composición de las semillas, analizando su contenido en proteínas, almidón, taninos, fenoles y fitatos, como se indica en materiales y métodos. Los datos son la media \pm EE (n = 3, siendo n una mezcla de semillas). *P<0,05 versus WT (t-test) dentro de cada columna.

Datos semilla seca	Proteínas (μ g prot. mg ⁻¹)	Almidón (μ mol mg ⁻¹)	Taninos (mg g ⁻¹)	Fenoles (μ g mg ⁻¹)	Fitatos (g/100 g)
WT	0,59 \pm 0,05	1,43 \pm 0,02	1,39 \pm 0,36	0,51 \pm 0,01	4,37 \pm 0,08
<i>Ppck-2</i>	0,48 \pm 0,004	1,41 \pm 0,03	2,36 \pm 0,25*	0,71 \pm 0,008*	4,77 \pm 0,07*
<i>Ppck-4</i>	0,85 \pm 0,02*	1,24 \pm 0,04*	1,5 \pm 0,36	0,46 \pm 0,005	5,47 \pm 0,08*

DISCUSIÓN

1. EFECTOS DE ESTRESSES ABIÓTICOS EN PLANTAS DE SORGO CON *SbPPC3* SILENCIADO

La PEPC es una enzima presente en multitud de organismos en los que desempeña papeles fundamentales en el metabolismo del carbono, destacando su papel en la fijación inicial del CO₂ en la fotosíntesis de plantas C₄ y CAM (O'Leary et al., 2011b). Además, esta enzima tiene una gran diversidad de funciones no-fotosintéticas que desarrolla en todos los tejidos de la planta (Chollet et al., 1996; O'Leary et al., 2011a). Mientras que el papel de la PEPC de tipo C₄, así como su regulación se encuentran ampliamente estudiados, no sucede así con las múltiples funciones que llevan a cabo las distintas isoformas de la PEPC de tipo C₃. En general, el papel de este tipo de PEPC C₃ está relacionado con la carboxilación anaplerótica del PEP para permitir la reposición de esqueletos de carbono del TCA (Chollet et al., 1996; Izui et al., 2004). Sin embargo, hoy existen múltiples pruebas que confirman que las funciones de la PEPC son mucho más numerosas (O'Leary et al., 2011a, 2011b; Feria et al., 2016), estando implicada en múltiples procesos fisiológicos como el movimiento estomático, la homeostasis del pH celular, la absorción y transporte de iones en las raíces, la fijación del nitrógeno atmosférico en las leguminosas, el desarrollo y la germinación de las semillas, y en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Chollet et al., 1996; Echevarria y Vidal, 2003; Izui et al., 2004; O'Leary et al., 2011a; Ruiz-Ballesta et al., 2014, 2016).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la importancia de la isoforma PPC3 de sorgo en múltiples contextos. Esta isoforma es crucial en el desarrollo y germinación de las semillas (Ruiz-Ballesta et al., 2016), siendo importante también en la producción de las mismas (de la Osa et al., 2022). Además, se ha demostrado que esta isoforma está involucrada en la apertura y cierre estomático, así como en el crecimiento de las plantas de sorgo (de la Osa et al., 2022). Cabe destacar que esta isoforma es la principal isoenzima PEPC en las raíces de sorgo, y participa en las respuestas a distintos tipos de estrés en dichos órganos, como el estrés causado por amonio (Arias-Baldrich et al., 2017) y el estrés salino (de la Osa et al., 2022). También nuestro grupo ha visto que el homólogo funcional de *SbPPC3* en *Arabidopsis thaliana*, *AtPPC3*, es importante para el desarrollo de la planta y en respuesta a distintos estreses como la falta de fósforo o el estrés salino (Feria et al., 2016). En este sentido, otras investigaciones han demostrado la importancia de esta isoforma en la respuesta frente a estrés por cadmio en *A. thaliana* (Willick et al., 2019). El conjunto de estos trabajos ha mostrado la importancia de *SbPPC3* en la fisiología de la planta y en la respuesta a múltiples estreses abióticos, motivos por los que en esta tesis se ha continuado la caracterización de dicha isoforma en otros contextos de estrés abiótico.

Para profundizar en la caracterización de *SbPPC3* en la respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico se emplearon dos líneas de sorgo con menores niveles de esta isoforma (una disminución en torno al 95% en los niveles de transcritos) (de la Osa et al., 2022), obtenidas mediante la técnica del ARNi. Estas líneas se sometieron para su estudio a estrés por aluminio, estrés por cadmio y estrés por déficit de fósforo.

Debido a su importancia, la PEPC es una enzima altamente regulada. Uno de los mecanismos de regulación más importantes consiste en la modificación postraduccional (PTM). Entre las PTMs que regulan la PEPC se encuentran las modificaciones por ácido fosfatídico, la S-nitrosilación y la monoubiquitinación, aunque la más estudiada es la fosforilación reversible de la enzima. Esta es llevada a cabo por la PEPCk, una proteína de la familia de las quinasas dependientes de Ca^{2+} . Esta enzima a su vez también se encuentra regulada en varios niveles. En hojas, la actividad PEPCk es inducida por luz tanto en plantas C_4 como C_3 (Nimmo, 2003; Feria et al., 2016). Además, pese a que la luz es el principal mecanismo regulador de la fosforilación de la PEPC en las hojas de sorgo, nuestro grupo ha demostrado que el estrés salino y el estrés por amonio aumentan la expresión y la estabilidad de PEPCk. En sorgo, existen tres genes que codifican esta enzima: *SbPPCK1*, 2 y 3 (Arias-Baldrich et al., 2017; Monreal et al., 2007a,b, 2013b). En este sentido, hemos estudiado líneas de sorgo con estas tres isoformas silenciadas mediante ARNi para evaluar las repercusiones del silenciamiento sobre el crecimiento y desarrollo del sorgo, así como sobre sus respuestas a estrés.

1.1. Respuesta a aluminio y cadmio en plantas *Ppc3*

En este primer apartado, hemos estudiado los efectos del estrés por aluminio y por cadmio y las respuestas en las distintas líneas de sorgo. Ambos metales incrementaron tanto la actividad PEPC como la expresión de *SbPPC3* en raíces WT, pero no en las líneas silenciadas. En estas líneas, el estrés por ambos metales incrementó la expresión de *SbPPC2* en raíces en mayor grado que en las WT; sin embargo, esto no compensó la falta de *PPC3* a nivel de actividad enzimática. Estos resultados vuelven a confirmar que esta isoforma es la dominante en raíces (Arias-Baldrich et al., 2017; de la Osa et al., 2022) y que, además, *PPC3* participa en las respuestas de las raíces de sorgo al Al y al Cd, y que no es reemplazada por otras isoenzimas en las líneas silenciadas.

En *Arabidopsis*, existen cuatro isoformas de PEPC. Los transcritos de *AtPPC2* están presentes en todos los órganos, funcionando posiblemente como un housekeeping. *AtPPC3*, se expresa en raíces, y *AtPPC1* y *AtPPC4* se expresa en raíces y flores (Sánchez et al., 2006). Estudios previos han mostrado que *AtPPC3* es la isoforma que contribuye a la mayor parte de la actividad PEPC detectada en raíces, encontrando que en líneas knock-out de mutantes SALK sólo las plantas *atppc3* reducían drásticamente su actividad PEPC de dichos órganos (Feria et al., 2016). En consecuencia, aunque no existe una relación filogenética entre ellas, *SbPPC3* y *AtPPC3* son las isoformas mayoritarias en raíces de sorgo y *Arabidopsis*, respectivamente, y, por tanto, se podrían considerar como homólogos funcionales. La exposición a cadmio aumentó la expresión de *AtPPC1* y *AtPPC3* y la actividad PEPC en raíces de *Arabidopsis* (Willick et al., 2019). En ese mismo estudio, se utilizaron dos líneas mutantes de inserción de T-DNA: *atppc1* y *atppc3*; estas líneas, especialmente *atppc3* fueron más sensibles a cadmio. Esto muestra el papel importante de la PEPC, destacando sobre todo el gen *AtPPC3*, en la respuesta a estrés por cadmio en *Arabidopsis*. En la misma línea, nuestros resultados muestran que es

esta isoforma (PPC3) la que presenta una mayor contribución en la respuesta a nivel de PEPC frente a la toxicidad por este metal.

El cadmio aumenta la actividad PEPC de raíces de otras especies vegetales como tomate (*L. esculentum*) (López-Millán et al., 2009), arroz (*O. sativa*) (Huang et al., 2017c) y maíz (*Z. mays*) (Nocito et al., 2008). El aluminio induce un mayor aumento relativo de la actividad PEPC en raíces de las variedades de sorgo con mayor tolerancia a este metal frente al incremento provocado en variedades con mayor sensibilidad (De Carvalho Gonçalves et al., 2005). Un resultado muy similar ha sido obtenido también en soja, donde la inducción de la expresión de PPC en raíces fue mayor en el cultivar más tolerante de los estudiado (Huang et al., 2017a). Además, previamente en esta misma especie se habían encontrado tres isoformas de PEPC (GmPPC6, 8 y 9) inducidas por aluminio (Wang et al., 2016). Todo esto nos muestra que la implicación de la PEPC en la respuesta de raíces a estreses como el aluminio y cadmio es común a diversas especies vegetales.

Al mismo tiempo que se producen cambios de actividad PEPC, en distintos tipos de estrés se observan cambios en su estado de fosforilación. El estrés salino y el estrés por amonio, además de aumentar la actividad PEPC en raíces, produjeron un aumento de actividad PEPCk en raíces y hojas de sorgo (Echevarría et al., 2001; Monreal et al., 2013a; Arias-Baldrich et al., 2017). El incremento de la actividad PEPCk de hojas estaba asociado a PPCK1, la isoenzima fotosintética, mientras que el producido en raíces se relacionaba con PPCK2. En hojas, el aluminio aumentó la actividad PEPCk en plantas WT debido al incremento de expresión de SbPPCK1, mientras que bajo el estrés por cadmio no se detectaron grandes cambios en la expresión de las tres isoformas de PEPCk. En Arabidopsis, existen dos isoformas de PEPCk. AtPPCK1, se detecta sobre todo en hojas de la roseta, y es inducido fuertemente por luz. AtPPCK2, está especialmente localizado en raíces y flores, y se induce por la luz en este último tejido (Fontaine et al., 2002). En hojas de Arabidopsis, se ha visto que el cadmio aumenta levemente la expresión de AtPPCK1 y de AtPPCK2, mientras que en las líneas mutantes *atppc1* y *atppc3*, el cadmio aumenta significativamente la expresión de ambos genes, destacando sobre todo AtPPCK1. Sin embargo, estos cambios no supusieron un aumento en la actividad PEPCk (Willick et al., 2019). Estos resultados parecen indicar que los cambios en la fosforilación de la PEPC en hojas son menos importantes que los cambios que se producen en raíces frente a la toxicidad por estos metales, los cuáles se van a discutir a continuación.

En raíces de sorgo, tanto el cadmio como el aluminio incrementaron la actividad PEPCk, lo que se relacionó con un aumento de la expresión de SbPPCK2, mayor en la línea *Ppc3-1* que en el WT. Además, el aluminio también aumentó de forma similar la expresión de SbPPCK3. En arroz, se ha encontrado también que OsPPCK2 es altamente inducido por cadmio en raíces (Huang et al., 2017c). En raíces de Arabidopsis, el cadmio induce la expresión de AtPPCK1 y AtPPCK2, aunque esto no aumentó la actividad PEPCk. Sin embargo, en las líneas *atppc1* y *atppc3* el aumento de la expresión de las dos isoformas de PEPCk si causó un incremento significativo de la actividad PEPCk en raíces (Willick et al., 2019). Estos resultados sugieren que, en respuesta al Cd, las plantas tratan

de compensar un menor nivel de PEPC con un aumento en su estado de fosforilación en raíces, aunque estos cambios no consiguen subsanar la falta de PPC3 ni en sorgo ni en *Arabidopsis*.

El cadmio afecta a la absorción de nutrientes minerales ya que compite directamente con los transportadores de los mismos (Benavides et al., 2005), por lo que algunos de estos elementos fueron cuantificados en hojas y raíces. El cadmio redujo el contenido de Fe, Zn y Mg, mientras que aumentó el Ca en hojas; estos resultados fueron similares a los obtenidos por Jia et al. (2016). Esta reducción puede ser causada por la competencia directa de los iones de Cd por los mismos transportadores que dichos elementos, con lo que la translocación de éstos hacia las hojas se vería reducida. En raíces, el cadmio redujo el contenido de Mg y Ca e incrementó el contenido de Zn y Fe; estos resultados, de nuevo concuerdan con los obtenidos por Jia et al. (2016) en sorgo. Además, el aumento en el contenido de Fe en raíces también ha sido descrito en presencia de Cd en otras especies, como *Noccaea caerulea* (Halimaa et al., 2019). En esa especie, el tratamiento con cadmio indujo la expresión de genes relacionados con la homeostasis de Fe. Nosotros hemos comprobado que una respuesta similar se estaba dando en sorgo. El cadmio inducía la expresión de genes relacionados con la homeostasis de Fe, como resultado de una posible deficiencia causada por éste. Se analizaron genes tanto de la estrategia I como de la estrategia II debido a que, se había descrito que existen plantas que combinan o que inducen genes de ambas estrategias en carencia de Fe, como el arroz o como el propio sorgo (Wairich et al., 2019). En este sentido, hemos encontrado que el cadmio induce la expresión de *NRAMP* en todas las líneas, y de *IRO2* en las líneas silenciadas. *NRAMP* es un gen perteneciente a la estrategia I de captación de Fe (Wairich et al., 2019), la cual está asociada a la secreción de compuestos entre los que se encuentran los ácidos orgánicos. Por otro lado, *IRO2* es un factor de transcripción asociado a la estrategia II, (Kobayashi y Nishizawa, 2012). Además de la diferencia de expresión de *IRO2* en plantas WT y silenciadas expuestas a cadmio, también hemos visto que las líneas silenciadas acumulaban una menor cantidad de Fe en raíces bajo este tratamiento que en las plantas WT. Todo esto indica que la homeostasis de Fe se encuentra alterada en las líneas *Ppc3*, posiblemente debido a un funcionamiento incorrecto de las respuestas a la deficiencia de Fe causada por cadmio.

La PPC3 juega un papel importante en la germinación de semillas de sorgo, y su falta provoca un retraso en la germinación (de la Osa, 2020). El estrés por aluminio, y, especialmente por cadmio, provocó un retraso en la germinación, que fue mayor en las líneas silenciadas. Estudios previos han demostrado que los efectos del cadmio sobre la germinación de semillas de sorgo están relacionados con los efectos de este metal sobre la actividad de enzimas hidrolíticas, inhibiendo la movilización de las reservas de carbohidratos, y, en consecuencia, afectando a la germinación (Kuriakose y Prasad, 2008). El estudio de la actividad de enzimas hidrolíticas, como fosfatasas ácidas, proteasas y α -amilasas, así como del contenido de almidón y azúcares solubles en estas semillas tratadas con cadmio, contribuiría a elucidar las causas y mecanismos responsables de los efectos del cadmio en las semillas *Ppc3*.

Además, de los efectos sobre la germinación mencionados previamente, otros de los efectos del aluminio y el cadmio también fueron más severos en las plantas de líneas *Ppc3* que en las plantas WT, indicando que las primeras fueron más sensibles a estos metales. Por ejemplo, el aluminio redujo la velocidad de elongación de las raíces e incrementó el contenido de antocianinas en hojas; y el cadmio, disminuyó el contenido de clorofila b e incrementó la síntesis de MDA y prolina en hojas. Esto podría estar asociado al conjunto de alteraciones metabólicas producidas por la falta de PPC3 en hojas y raíces (de la Osa et al., 2022). Estas alteraciones afectan a la eficiencia de la respuesta a estrés, haciendo que las plantas *Ppc3* sean más sensibles a estreses como la salinidad, el cadmio o el aluminio. Además, la ausencia de síntesis de citrato y malato, directamente dependientes de la actividad de PPC3, altera mecanismos que aumentan la resistencia de las plantas a la toxicidad de Al y Cd, y que están relacionados con los exudados radicales.

Las formas aniónicas de los ácidos orgánicos actúan como importantes quelantes de metales tóxicos, entre los que se incluyen el aluminio y el cadmio, constituyendo la secreción de estos ácidos una de las principales estrategias de las plantas que aumentan la resistencia a estos metales. En concreto, el citrato (Kochian, 1995; Sivaguru et al., 2013; Carvalho et al., 2016) y en menor medida el malato (De Carvalho Gonçalves et al., 2005), son los principales ácidos orgánicos secretados por el sorgo en respuesta a la presencia de metales, con el objetivo de excluirlos extracelularmente y así, disminuir su absorción (Ma, 2000). Además, los ácidos orgánicos actúan también en la detoxificación intracelular de los metales reduciendo sus efectos tóxicos. Por ejemplo, el cadmio forma complejos intracelulares con citrato y malato, que se almacenan en la vacuola (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999). En este trabajo, hemos demostrado que el aluminio y el cadmio incrementan la secreción de citrato, y en menor medida de malato, en los exudados. En el caso del aluminio (tratamiento de 2 días), la cantidad de citrato en los exudados aumentó en torno a 40 veces, pero no se observaron diferencias entre la planta WT y las líneas silenciadas. Por otro lado, el cadmio (tratamiento de 7 días) incrementó la exudación de citrato 400 veces en plantas WT y tan sólo unas 30 veces en las líneas silenciadas. Estos resultados demuestran la implicación de PPC3 en la secreción de ácidos orgánicos como respuesta al estrés por metales, aunque parece que su importancia depende de la duración del tratamiento. Finalmente, cabe destacar que, contrariamente a lo esperado, la acumulación de cadmio en raíces al finalizar la primera semana de tratamiento fue menor en las líneas *Ppc3*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Willick et al. (2019) en *Arabidopsis*; los mutantes *atppc3* presentan una menor acumulación de cadmio en raíces que en la planta Col-0. Ante estos resultados, medimos el contenido de cadmio tras una semana más de tratamiento con cadmio, encontrando que el incremento en la acumulación de cadmio fue mucho mayor en las líneas silenciadas. En nuestro grupo previamente ya habíamos demostrado que las líneas *Ppc3* en condiciones control presentan una mayor actividad citrato sintasa y un mayor contenido de citrato que las plantas WT (de la Osa et al., 2022). Este mayor nivel basal de citrato podría ser suficiente para mantener los mismos niveles en los exudados que en las plantas WT en los tratamientos cortos, a pesar de la disminución en su síntesis por la falta de PPC3. Sin embargo, al alargar este tratamiento, la menor síntesis de citrato por la falta de PPC3 y,

por tanto, la menor cantidad de éste en los exudados, conllevaría un incremento mayor en el contenido de cadmio en raíces que en las plantas WT. Estos resultados muestran la importancia de PPC3 en las respuestas del sorgo a aluminio y cadmio. Entre ellas, para mantener la síntesis y secreción de citrato a largo plazo.

1.2. Respuesta a la deficiencia de fósforo en plantas *Ppc3*

La exudación de ácidos orgánicos no solo es una respuesta vegetal para excluir iones metálicos, sino que también constituye un mecanismo importante en la solubilización de numerosos elementos importantes para la planta (Ryan et al., 2001). Un claro y relevante ejemplo es la secreción de ácidos orgánicos para la solubilización del fósforo, elemento esencial que se encuentra con frecuencia en el suelo formando compuestos insolubles de fosfato como el fosfato cálcico, no disponibles para la planta (López-Arredondo et al., 2014). Por este motivo, en este trabajo hemos analizado los efectos de la deficiencia de este macronutriente en plantas *Ppc3*.

En primer lugar, para encontrar las concentraciones ideales de P para realizar el estudio, se realizó un gradiente usando concentraciones equimolares de dos fuentes distintas de este elemento, usando fosfato soluble (NaH_2PO_4 ; Ps) y fosfato insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; PCa). En este primer bloque se consiguió determinar que el aporte de P en forma insoluble afecta de forma negativa al crecimiento de las plantas, que mostraron menor altura y biomasa en comparación con el aporte de concentraciones equimolares de P soluble. Además, las mayores diferencias de crecimiento y de contenido de P en raíces entre las líneas silenciadas y WT se encontraron en las concentraciones equimolares más altas de ambas fuentes de P (1,34 mM NaH_2PO_4 y 0,67 mM $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Hay que destacar que la actividad PEPC disminuyó en raíces WT al aumentar el contenido de Ps, mientras que se incrementó al elevar el contenido de fosfato insoluble. Estos resultados muestran que la PEPC responde frente a la falta de P, indicando la importancia de la PEPC en la respuesta para solubilizar ese P (López-Arredondo et al., 2014). Estos resultados hacen relevante desarrollar el estudio, no solo en condiciones de ausencia de P, sino también empleando una fuente insoluble de P que refleje mejor las condiciones naturales a las que se enfrentan las plantas en la naturaleza. Además, se observó que en las líneas silenciadas el nivel de actividad en raíces fue siempre significativamente inferior al encontrado en plantas WT, mostrando la importancia de PPC3 en raíces, donde es la isoenzima de PEPC predominante (de la Osa et al., 2022).

En segundo lugar, se determinó la duración del tratamiento necesaria para encontrar la mayor respuesta a la falta de P a nivel de la PEPC. Para ello, se utilizaron las concentraciones de fosfato soluble e insoluble determinadas anteriormente, así como un tratamiento en ausencia total de fósforo (-P). Los resultados mostraron que los efectos fisiológicos de la falta de P no son relevantes a partir de la segunda semana de tratamiento, tanto en condiciones -P como PCa. Esto fue así para distintos indicadores de estrés analizados como son la actividad fotosintética, la conductancia estomática o la acumulación de antocianinas en hojas, los cuales solo fueron significativamente distintos a las condiciones Ps a la tercera semana de tratamiento. Esto también fue así para la

inducción de la actividad PEPC en raíces en el tratamiento PCa. Por lo tanto, el resto de análisis realizados en este capítulo se realizaron tras 3 semanas de los distintos tratamientos de P (Ps, -P y PCa).

La deficiencia de P indujo la expresión de *SbPPC2* en hojas en todas las líneas, y de *SbPPC3* sólo en la línea WT, mientras que *SbPPC1* no presentó cambios significativos en ninguna de las condiciones analizadas. Sin embargo, la actividad PEPC, así como la cantidad de PEPC inmunodetectada en hojas, no se vio afectada. Esta falta de correlación entre la expresión génica y la actividad PEPC se debe a que la mayor parte de la actividad y cantidad de PEPC presente en hojas de sorgo corresponde a la PEPC de tipo C₄ (*SbPPC1*), por lo que cualquier cambio en la cantidad de otras isoformas de PEPC queda enmascarado por la cantidad de PEPC fotosintética (Shenton et al., 2006). En hojas de *A. thaliana* también se ha detectado un aumento de la expresión de genes *PPC* (*AtPPC1* y *AtPPC2*), así como de la actividad PEPC, en respuesta a la falta de P. En este caso, dicho incremento puede ser detectado puesto que se trata de una planta C₃ que carece de PEPC fotosintética (Gregory et al., 2009; Feria et al., 2016).

En raíces de sorgo, la deficiencia de P incrementó la actividad y expresión de PEPC. Este aumento de actividad enzimática en raíces como resultado de la falta de P ha sido descrito en diversas especies (Plaxton y Tran, 2011). Por ejemplo, la deficiencia de P aumenta la actividad PEPC en raíces de soja (*G. max*), donde se detecta además un aumento de su estado de fosforilación (Jiang et al., 2021). En alfalfa (*M. sativa*) se ha descrito que este estrés induce la expresión de PEPC en raíces (Li et al., 2022), al igual que en garbanzo (*C. arietinum*) (Esfahani et al., 2021), en altramuza blanca (*L. albus*) (Uhde-Stone et al., 2003) o en maíz (*Z. mays*) (Calderon-Vazquez et al., 2008). Estos resultados muestran la participación de la enzima PEPC en la respuesta a este tipo de estrés en raíces. Así mismo, nosotros pudimos asociar el incremento de actividad PEPC con el aumento de la expresión de *SbPPC3* en raíces, debido a que en las líneas silenciadas no se detectaron estos cambios de actividad y de expresión. Además, este tratamiento también incrementó la expresión de *SbPPC2* en todas las líneas, aunque esto no compensó la falta de *PPC3*, como puede observarse en los niveles de actividad PEPC. Resultados similares fueron obtenidos en presencia de fosfato cálcico, aunque tanto los niveles de expresión como de actividad fueron inferiores. Estos datos se relacionan con los obtenidos por nuestro grupo en *A. thaliana* (Feria et al., 2016). En esta planta, la isoforma con mayor expresión como respuesta a falta de P en raíces es *AtPPC3*, homólogo funcional de *SbPPC3*. Además, en ese mismo trabajo, el estudio de mutantes *knock-out* (líneas SALK) de las distintas isoenzimas de PEPC muestra que es *PPC3* la principal isoenzima responsable de la actividad PEPC en raíces en condiciones de falta de P. Todo esto vuelve a demostrar la importancia específica de esta isoforma en la respuesta a la deficiencia de P en raíces de sorgo.

El déficit de fósforo también provocó cambios en el estado de fosforilación de la PEPC. En hojas de sorgo, la falta de P indujo la expresión de los tres genes que codifican *PPCK* (*SbPPCK1-3*) de forma similar en todas las líneas, lo que estuvo asociado también

a un aumento de la actividad PEPCk y del estado de fosforilación de la PEPC. En otras especies también se ha demostrado el aumento de la expresión de genes *PPCK*. Por ejemplo, en arroz la deficiencia de P induce la expresión de *OsPPCK1* y un transcrito corto de *OsPPCK2* en hojas, incrementando el nivel de fosforilación de la PEPC (Fukayama et al., 2006). En algodón (*G. hirsutum*), la falta de P induce la expresión de *PPCK1* en todos los tejidos (Lei et al., 2022), mientras en hojas de *A. thaliana* induce la expresión de *AtPPCK1* y 2, lo que se traduce en un aumento de la fosforilación de la PEPC (Gregory et al., 2009; Feria et al., 2016). En consecuencia, la fosforilación de la PEPC de hojas parece ser una respuesta relativamente extendida a la deficiencia de P. En mutantes SALK de Arabidopsis para *AtPPC3* estudiados por nuestro grupo, no se detectaron cambios en la fosforilación de la PEPC en hojas respecto a las plantas silvestres en ausencia total de P (Feria et al., 2016). En este trabajo, tampoco se encontraron diferencias en la fosforilación de la PEPC entre hojas de plantas WT y las líneas *Ppc3* de sorgo en ausencia total de P (-P), pero sí cuando se suministraba el fósforo de forma insoluble (PCa). En hojas de plantas *Ppc3* tratadas con fosfato cálcico, el nivel de fosforilación de la PEPC (IC₅₀) se mantuvo al mismo nivel que en el tratamiento sin P, es decir, fosforilada, mientras que en las plantas WT, la fosforilación de la PEPC fue igual que en condiciones control, es decir, desfosforilada. Estos resultados indican que las líneas *Ppc3* mantienen ciertas respuestas al déficit de P en presencia de PCa, lo que podría asociarse a una menor capacidad de solubilización de fosfato cálcico por parte de estas plantas en comparación con la línea WT. Esto explicaría que, en estas condiciones, la planta WT pierda una de las respuestas frente al déficit de P en hojas, la fosforilación de la PEPC, mientras que se mantiene en las líneas *Ppc3*. Por otro lado, los niveles de expresión de los genes *SbPPCK1-3* en hojas fueron similares en todas las plantas tratadas con fosfato cálcico, mostrando valores intermedios entre el control y la ausencia de P. Esto puede indicar que la PEPCk no solo está siendo regulada a nivel transcripcional, induciendo su expresión por deficiencia de P, sino que también debe estar siendo regulada a nivel postraduccional y/o por degradación, manteniéndose más activa o estable durante más tiempo en las líneas *Ppc3*. Este mecanismo de regulación de la actividad PEPCk a través de una menor degradación de la proteína ha sido demostrado por nuestro grupo en condiciones de estrés salino. Este estrés provoca una disminución de la degradación de la PEPCk y un aumento de su actividad mediada por ABA y donde participa la molécula señal óxido nítrico (NO) (Monreal et al., 2007a, 2013b). Es posible que la deficiencia de P induzca respuestas similares, aunque sería necesario profundizar en esta dirección.

En raíces, la falta de P incrementó la expresión de *SbPPCK2*, especialmente en la línea *Ppc3-2*, y de *SbPPCK3* en todas las líneas. De nuevo, la presencia de fosfato insoluble como fuente de P permitió alcanzar unos valores de expresión más próximos a las condiciones control, aunque aún inducidos. Sin embargo, la actividad PEPCk fue tan solo ligeramente mayor en las líneas silenciadas, especialmente en *Ppc3-2*. En Arabidopsis también se ha descrito que la expresión de los genes *PPCK* se induce por falta de P en raíces, sobre todo *AtPPCK2*, asociado con un aumento en la fosforilación de la PEPC. Sin embargo, en mutantes SALK de *AtPPC3* esta respuesta desaparece (Feria et al., 2016). Estos resultados muestran que, en la respuesta a la deficiencia de P en raíces,

parece tener más importancia el aumento de la cantidad y actividad PEPC que la fosforilación de la misma, aunque ésta también tenga lugar, aunque de forma menos clara que en hojas.

Además del papel en la solubilización del fosfato insoluble, la PEPC es una enzima que puede cumplir otras funciones en condiciones de falta de P. La actividad conjunta de la PEPC y la malato deshidrogenasa (MDH) puede suponer una ruta glucolítica alternativa a la piruvato quinasa (PK) en condiciones de déficit de ADP, y además puede participar en el reciclaje del fosfato que se genera en la carboxilación del PEP (Vance et al., 2003; Kumari et al., 2008; Plaxton y Tran, 2011).

La carencia de PPC3 afectó de forma severa al contenido de ATP en raíces, pero no en hojas, en condiciones control. Las diferencias observadas en ambos tejidos podrían estar asociadas a la importancia de esta isoenzima en cada uno de los tejidos, siendo dominante en raíces y, en consecuencia, siendo estas las primeras afectadas por su carencia (de la Osa et al., 2022). El menor contenido de ATP en raíces de las líneas *Ppc3* se asocia al conjunto de perturbaciones metabólicas causadas por la falta de PPC3, posiblemente consecuencia de la activación de las rutas fermentativas en raíces. Esto ya había sido sugerido por nuestro grupo al determinar que las líneas silenciadas presentaban una mayor cantidad de sacarosa y de lactato en raíces, indicativo de un bloqueo parcial de la glucólisis y de la activación de un metabolismo fermentativo (de la Osa et al., 2022). Por otra parte, la deficiencia de P provocó una importante reducción en el contenido de ATP, debido a los cambios metabólicos provocados por este déficit tal y como se ha descrito en multitud de especies vegetales (Fang et al., 2009; Malhotra et al., 2018). Sin embargo, esta disminución fue similar en los tratamientos -P y PCa y en todas las líneas. Esto podría deberse a que los efectos de la falta de P sobre el metabolismo son muy elevados, impidiendo ver diferencias entre las líneas a nivel de ATP.

El déficit de P provoca importantes cambios en el metabolismo central, limitando la respiración celular y afectando a la glucólisis, donde se activan enzimas alternativas independientes de ATP. Algunas de estas enzimas potenciadas por falta de P son la fosfofructoquinasa dependiente de PPi (PPiPFK), la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa dependiente de NADP (GAPDH), la PEPC, la enzima NAD-málica (NAD-ME) y la MDH (Malhotra et al., 2018), lo que ha sido descrito en varias especies (Fang et al., 2009; Esfahani et al., 2021; Li et al., 2022). Por ello, se analizó la actividad de importantes enzimas del metabolismo central, algunas de ellas relacionadas con estos cambios, tanto en hojas como en raíces de todas las plantas. De entre todas las enzimas metabólicas analizadas, la que mostró una mayor inducción de su actividad en los tratamientos de P fue la PEPC en raíces de las plantas WT pero, como ya se ha comentado anteriormente, no en las líneas silenciadas. En déficit de P se detectó una disminución de las actividades de algunas enzimas del ciclo de Krebs como la ICDH y CS en hojas o la ACO en raíces. La disminución de esta última enzima ha sido descrita en raíces bajo falta de P, esto impide la síntesis de isocitrato, provocando la acumulación de citrato para ser exudado por las raíces (Gupta et al., 2012). Sin embargo, en general, no se encontraron diferencias

entre las líneas bajo deficiencia de P, excepto moderadas disminuciones de la actividad de ICDH, ACO o MDH respecto a raíces WT. Interesantemente, todas las plantas mostraron una inhibición total de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AAT) en hojas en condiciones de deficiencia de P (-P y PCa). Esta enzima utiliza el OAA sintetizado por la PEPC, junto con glutamato, para formar aspartato y 2-OG (O'Leary et al., 2011). Si bien la actividad PEPC total no cambia debido a la presencia de la isoenzima fotosintética, como mencionamos anteriormente sí que se produce una importante inducción de la expresión de los genes de PEPC no fotosintéticas (*SbPPC2* y *SbPPC3*). Una mayor cantidad de estas isoenzimas de PEPC, junto con la inhibición de la AAT, podría provocar una mayor síntesis de malato por la MDH, incluso con parte del ciclo de Krebs (CS, ACO o IDH) inhibido. De este modo se podría conseguir mantener o aumentar el nivel de malato en condiciones de falta de P. En trabajos futuros se profundizará en este aspecto cuantificando los distintos metabolitos implicados en este proceso.

La enzima PK, que cataliza la desfosforilación del PEP formando piruvato y ATP (Ambasht y Kayastha, 2002), presentó menor actividad en las líneas *Ppc3* en condiciones control. Esto se relaciona con el menor contenido de piruvato medido en hojas de las plantas silenciadas (de la Osa et al., 2022), aunque en este trabajo no se detectaron cambios en este metabolito en raíces. La menor actividad PK de raíces y la ausencia de cambios en el contenido de piruvato podrían asociarse a la activación de otras enzimas cuyo producto es el piruvato como la piruvato fosfato diquinasa (PPDK) o la fosfoenolpiruvato fosfatasa (PEPP) (Chen et al., 2013) o a una menor demanda del mismo debido a la activación de rutas fermentativas como demuestran los niveles de ATP, de lactato y sacarosa en las líneas silenciadas (de la Osa et al., 2022). Por otro lado, en condiciones de falta de P, la actividad PK puede verse reducida debido a la limitación de ADP, por lo que *bypass* como el de la PEPC-MDH-ME son importantes en estas condiciones (Plaxton y Podestá, 2006; O'Leary y Plaxton, 2020), esto concuerda con los resultados obtenidos en hojas. Sin embargo, en raíces WT la actividad PK aumentó moderadamente bajo deficiencia de P. Esto ha sido descrito en algunas especies (Esfahani et al., 2021; Li et al., 2022) aunque no es así en otros estudios (Chen et al., 2013, Malhotra et al., 2018). Esta diferencia en los resultados de actividad PK entre líneas silenciadas y WT, podría indicar un mayor grado de estrés en las primeras, puesto que deberían activar otros *bypass* metabólicos, que no parecen darse en raíces WT, donde continúa la actividad PK en deficiencia de P. Estos resultados indican, de nuevo, que el silenciamiento de *SbPPC3* provoca importantes perturbaciones en el metabolismo general de las plantas y también en su respuesta a estrés por déficit de P.

En general, el déficit de P produce una disminución de la absorción y metabolismo del N (Paz-Ares et al., 2022). En nuestro trabajo, los tratamientos -P y PCa inhibieron completamente la actividad de la glutamato sintasa (GOGAT) en hojas en todas las líneas. Sin embargo, detectamos un aumento de actividad de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y de la glutamato deshidrogenasa (GDH), y un ligero aumento de la actividad nitrato reductasa (NR), tal vez como respuesta para mantener la formación de glutamato y

glutamina en ausencia de actividad GOGAT. La activación de la GDH ha sido descrita en numerosas especies en respuestas a estrés salino, exceso de amonio, o senescencia (Skopelitis et al., 2006). En este sentido, en garbanzo se produce una reducción de la expresión de la GOGAT en hojas y un aumento de la expresión de NR y GS en raíces bajo deficiencia de P (Esfahani et al., 2021). Sin embargo, en este mismo trabajo se describió una disminución de la GDH en estas condiciones. Por otro lado, en alfalfa se produce una inhibición de la NR en condiciones de falta de P (Li et al., 2022). Por lo tanto, existen diferentes respuestas a nivel del metabolismo del N a la falta de P según la planta.

El déficit de P limita la actividad fotosintética al reducir la fotofosforilación, lo que reduce la fijación de carbono, además de afectar a todos los complejos que intervienen en la fotosíntesis. Bajo deficiencia de P, las proteínas de las antenas se desfosforilan, reduciendo la movilidad de las mismas. A largo plazo, provoca la fotoinhibición del PSII, incrementando la fotorrespiración (Malhotra et al., 2018). Estos efectos del estrés por falta de P explicarían la disminución en la actividad fotosintética y en la conductancia que hemos encontrado en este trabajo, donde la inhibición del PSII ha sido observada como una reducción rendimiento cuántico (F_v/F_m), lo que a su vez estuvo asociado al incremento de F_0 , que fue ligeramente mayor en las líneas *Ppc3*. En algodón, se han descrito cambios similares en estos parámetros, asociando el incremento de F_0 a la pérdida de clorofila y a la desconexión de las antenas captadoras de luz dentro del PSII (Singh y Reddy, 2014). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron cambios en el contenido de las clorofilas, salvo un ligero aumento en falta de P, por lo que los efectos del déficit de P sobre los parámetros fotosintéticos deben estar asociados a los efectos directos de este estrés sobre el funcionamiento del PSII. En otras plantas se han obtenido resultados similares. Por ejemplo, en guisantes (*P. sativum*) o *Lotus Japonicus*, el déficit de P provocó una disminución de la actividad fotosintética pero no del contenido en clorofilas, siendo éstas incluso más abundantes en condiciones de falta de P (Kondracka y Rychter, 1997; Thuynsma et al., 2016). Estos cambios en la fotosíntesis, junto a las alteraciones en el metabolismo catabólico y al nivel de P, podrían explicar la reducción en el contenido de ATP provocado por el déficit de P en hojas. Por otra parte, la presencia de fosfato insoluble en el medio permitió la recuperación parcial de parámetros como la actividad fotosintética, la conductancia o F_0 y F_v/F_m , aunque estos últimos se mantuvieron igual que en el tratamiento -P en la línea *Ppc3-2*. Estos resultados parecen indicar que esta línea silenciada está siendo más afectada por el déficit de P, al menos al nivel de funcionamiento fotosintético.

Un síntoma clásico de la deficiencia de P es la acumulación de antocianinas en hojas de numerosas especies vegetales (Henry et al., 2012), donde este flavonoide puede tener una función fotoprotectora (Hammond et al., 2004; Plaxton y Tran, 2011), y constituyen un indicador del nivel de estrés por falta de P (Peng et al., 2020). Las antocianinas protegen los ácidos nucleicos del daño por UV y a la los cloroplastos del daño fotoinhibitorio causado por la reducción de la fotosíntesis inducida por el déficit de P (Hammond et al., 2004). En este trabajo, hemos visto cómo la falta de P (-P) redujo

severamente la fotosíntesis neta y aumentó de forma considerable la acumulación de antocianinas en hojas en todas las líneas. Sin embargo, en las plantas WT el tratamiento con fosfato cálcico produjo una bajada en el contenido de antocianinas en hojas, indicando menor nivel de estrés por falta de P, mientras que en las líneas *Ppc3* el nivel se mantuvo igual que en ausencia total de P. Estos resultados apoyarían nuevamente que las líneas silenciadas seguirían manteniendo el mismo nivel de estrés con fosfato insoluble que cuando no hay fosfato, posiblemente debido a que tienen una menor capacidad de solubilizar el P insoluble. En este sentido, sería interesante estudiar otros marcadores de estrés vegetal como podrían ser la actividad de enzimas antioxidantes como las catalasas o peroxidasas, así como el indicador de peroxidación lipídica MDA (Morales y Munné-Bosch, 2019).

El conjunto de todos estos efectos causados por la falta de P provocó una reducción del crecimiento y de la producción de biomasa. De nuevo, el aporte de fosfato cálcico como fuente de P propició unos valores intermedios entre el tratamiento sin P y las condiciones control. Cabe destacar que las líneas *Ppc3* presentaron menor tamaño que las plantas WT en todos los tratamientos, especialmente en la biomasa de raíces, aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Esto va en el mismo sentido que los resultados obtenidos por nuestro grupo en mutantes *knock-out* de *Arabidopsis*, en los que la falta de *PPC3* tuvo mayor efecto sobre el desarrollo de la raíz en condiciones control que en deficiencia de P (Feria et al., 2016). Otro parámetro destacable a nivel de crecimiento fue el ratio raíz/parte aérea. El déficit de P provoca cambios en el desarrollo de las plantas originando un mayor desarrollo de las raíces en detrimento del desarrollo de la parte aérea, lo que se traduce en un aumento del ratio del peso raíz/parte aérea. Esto ha sido descrito en numerosas especies vegetales como en *Arabidopsis* (Li et al., 2022), en sorgo (Zhang et al., 2019) o en arroz (Chang et al., 2009), como mecanismos para aumentar la superficie de búsqueda y captación de P en el suelo (López-Arredondo et al., 2014). En este trabajo hemos mostrado un aumento muy importante y significativo de este ratio en condiciones de falta de total de fosfato (-P) en las plantas WT, que fue, menor, pero aún significativo, en presencia de fosfato cálcico. Sin embargo, aunque el ratio aumentó en las líneas *Ppc3* por la falta de P (-P) respecto a su control, dicho incremento fue mucho menor al encontrado en plantas WT. Además, las plantas silenciadas no disminuyeron el ratio en el tratamiento con fosfato cálcico en comparación con el tratamiento sin P. Por lo tanto, como ya ocurriese para otros parámetros relacionados con la falta de P, el aporte de fosfato insoluble reduce la respuesta en las plantas WT, pero no en las líneas silenciadas, que siguen respondiendo de manera similar a la ausencia total de este elemento. Esto también ocurrió al analizar la expresión del gen que codifica el transportador de fosfato de alta afinidad *PHT*, inducible por falta de P (López-Arredondo et al., 2014; Wang et al., 2019b), donde detectamos un incremento de su expresión en ausencia de P que desaparece en las plantas WT tratadas con fosfato cálcico, pero no en las líneas *Ppc3*.

Por último, se estudió el nivel de P en las plantas para determinar si esta era la causada todos los resultados obtenidos. Como era de esperar, la falta de P redujo drásticamente el

contenido de este elemento en hojas y raíces de forma similar en todas las líneas. Sin embargo, el tratamiento con fosfato insoluble recuperó estos valores en raíces pero no en hojas, donde los niveles de P fueron levemente superiores a condiciones -P pero muy por debajo de los encontrados en condiciones control. Interesantemente, Es con este tratamiento (PCa) donde se observaron diferencias significativas del contenido de P entre las líneas silenciadas y la WT, en concreto en raíces, encontrándose una menor cantidad de P en las primeras en comparación con las segundas, aunque los niveles de P fueron similares a los encontrados en condiciones control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las líneas *Ppc3* tienen una menor capacidad para solubilizar el fosfato insoluble e incorporar ese P a sus raíces, aunque esto no repercute sobre el contenido de P medido en hojas, que se mantienen siempre muy por debajo de las condiciones control. En conjunto, estos resultados podrían indicar que, en condiciones de limitación de P, la planta prioriza la recuperación de este elemento en raíces y no en hojas para poder mantener el desarrollo de las mismas con el objetivo de ampliar la captación de P en detrimento del crecimiento de la parte aérea. Esto implicaría un mayor metabolismo para el crecimiento de las raíces, lo que podría explicar también que los niveles de ATP no aumenten en raíces en los tratamientos PCa aunque si lo haga el P, ya que este ATP se estaría consumiendo. Este aspecto será objeto de estudio en futuros trabajos de nuestro grupo de investigación.

En definitiva, estos resultados muestran que las líneas *Ppc3* tienen más dificultades para obtener P en condiciones donde es necesario solubilizarlo, y además presentan dificultades en la respuesta de desarrollo radicular frente a la deficiencia de P. Todo esto confirma la importancia de la isoforma PPC3 en raíces de sorgo para la solubilización de P en estas condiciones. Por otro lado, las distintas respuestas observadas en hojas WT y *Ppc3* en el tratamiento PCa podrían indicar que la isoforma PPC3 participa de forma relativamente importante en el bypass glucolítico que permite aumentar la eficiencia en el uso del P, provocando que las líneas silenciadas presenten mayores efectos por la deficiencia de P que las plantas WT en hojas. Además, cabría destacar que los resultados obtenidos indican que la respuesta a este tipo de estrés basada en la PEPC se produce mediante un aumento de la fosforilación de la proteína en hojas y con el aumento en la cantidad de la misma en raíces.

El conjunto de todos los resultados presentados en estos 3 capítulos muestra el importante papel de la isoforma PPC3 en sorgo, particularmente en las respuestas a estreses abióticos que se detectan en raíces donde, entre otras cosas, participa en la síntesis de ácidos orgánicos, bien como quelantes de metales bien para solubilizar nutrientes como el fósforo. Además, sumado a su rol ya demostrado en otros estreses como el exceso de amonio (Arias-Baldrich et al., 2017) o la salinidad (de la Osa et al., 2022), la convierten en una enzima relevante frente a condiciones ambientales adversas en sorgo.

El papel que puede jugar la PEPC frente a condiciones de estrés abiótico ha sido sugerido por varios grupos. La sobreexpresión de esta enzima aumenta la tolerancia frente a ciertos estreses. Plantas de arroz que sobreexpresan la PEPC de tipo C₄ de maíz presentan mayor tolerancia al aluminio al incrementar la síntesis y acumulación de ácidos

orgánicos como malato y citrato, y la secreción principalmente de oxalacetato (Begum et al., 2009). Además, aumenta la tolerancia a la deficiencia de fósforo, asociando la mayor actividad PEPC también a una mayor secreción de oxalato (Begum et al., 2005). En esta línea, los resultados aquí presentados, así como otros resultados de nuestro grupo de investigación, sugieren la isoenzima PPC3 de sorgo, una PEPC no fotosintética y mayoritaria en raíces, como una posible diana de mejora de la tolerancia de este cultivo frente a múltiples estreses abióticos.

2. CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS DE SORGO CON LOS GENES *SbPPCK1-3* SILENCIADOS EN CONDICIONES CONTROL Y DE ESTRÉS ABIÓTICO

En sorgo, existen tres genes que codifican isoformas distintas de PEPCk. En los órganos vegetativos, *SbPPCK1* se expresa exclusivamente en hojas, y es la isoenzima fotosintética que fosforila a la PEPC C₄. *SbPPCK2* se expresa en hojas y raíces; en este último órgano, su expresión se induce por estrés por amonio (Arias-Baldrich et al., 2017) y por salinidad (de la Osa et al., 2022). *SbPPCK3* se expresa también en hojas y raíces, aunque funcionalmente está poco caracterizado (Monreal et al., 2013a). Para profundizar en las funciones de estas PEPCk de sorgo, se diseñaron y obtuvieron plantas de sorgo modificadas con niveles disminuidos de expresión de *SbPPCK1-3* mediante la técnica del ARN interferente. En este segundo bloque se han caracterizado distintas líneas silenciadas, y se han estudiado las repercusiones del silenciamiento sobre el crecimiento, respuestas a estrés, floración y producción de semillas.

El silenciamiento por ARN interferente permitió obtener varias líneas con un menor nivel de expresión de los genes *SbPPCK1-3*. Esto se correlacionó con una menor fosforilación de la PEPC. Sin embargo, estas líneas silenciadas presentaron un nivel de inhibición génica muy inferior al encontrado para *SbPPCK3* en las líneas de sorgo *Ppc3*, indicando una menor efectividad del ARNi en estos mutantes *Ppck*. Pese a esto, la menor capacidad de fosforilar a la PEPC tuvo efectos moderados sobre el crecimiento, y más importantes sobre la productividad de las plantas de sorgo modificadas.

En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican PEPCk: *AtPPCK1* y *AtPPCK2*. *AtPPCK1*, se expresa mayoritariamente en hojas, aunque también puede detectarse en otros tejidos como raíces y flores. Además, su expresión es por luz. *AtPPCK2* se expresa sobre todo en raíces y flores, donde también es inducido por luz (Fontaine et al., 2002; Nimmo, 2003). Mutantes insercionales del gen *AtPPCK1* (*dln1* y *csi8*) en *Arabidopsis* tienen menor crecimiento, tanto de la roseta como del tallo floral (Meimoun et al., 2009), mientras que mutantes SALK del gen *AtPPCK2* presentan una ligeramente menor densidad radicular en condiciones control (Feria et al., 2016). En este trabajo los mutantes *Ppck* presentaron una ligera reducción de la altura de la planta al final de su ciclo de vida y también una leve reducción en la altura de la planta y la biomasa producida en plantas de 1 mes. Estos resultados indican que la disminución en la expresión de los genes *SbPPCK1-3* repercute sobre el crecimiento, aunque no lo hace de forma severa. Meimoun et al. (2009) hipotizaron que la falta de *AtPPCK1* provoca un aumento de la

fotorrespiración en *Arabidopsis*. La hipótesis se basaba en una reducción de los niveles de glucosa y sacarosa, como consecuencia de la disminución del flujo del carbono en la fotosíntesis, y en la disminución del glicolato y glicina y el aumento de la serina observada en los mutantes. Sin embargo, la inhibición de la fosforilación de la PEPC en hojas de *Arabidopsis* no altera los flujos metabólicos de la vía anaplerótica (Meimoun et al., 2009). Por otro lado, Boxall et al. (2017) investigaron los efectos del silenciamiento de PEPCk (*KfPPCK1*), también por ARNi, en la planta CAM *Kalanchoë fedtschenkoi*. El silenciamiento de *KfPPCK1* afectó severamente a la fijación de CO₂ y a la acumulación de malato durante la noche, alterando el control del ritmo circadiano, y además redujo la biomasa tanto de raíces como de hojas (Boxall et al., 2017). Por el contrario, en la especie C₄ *Flaveria bidentis* en la que se silenció por ARNi su única isoforma PEPCk, no se detectaron cambios importantes de metabolitos fotosintéticos ni de la asimilación fotosintética de CO₂, pese a la severa disminución en la fosforilación de la PEPC (Furumoto et al., 2007). Por lo que estos autores sugirieron que la fosforilación de la PEPC no es esencial para una alta actividad fotosintética en *F. bidentis*. Las diferencias encontradas en investigaciones similares, pero en distintas especies indican que la enzima PEPCk, y por tanto la fosforilación de la PEPC en hojas, podrían presentar diferencias en cuanto a función e importancia fisiológica según la especie vegetal estudiada.

Meimoun et al. (2009) encontraron también que mutantes *AtPPCK1* presentaban un retraso en su floración. Éste se atribuyó a una economía de carbono y un estado energético celular reducidos a causa de las alteraciones provocadas por la reducción en la fosforilación de la PEPC, especialmente por los cambios en la vía fotorrespiratoria, en el contenido de azúcares y en el ciclo de Krebs. Nosotros hemos encontrado que las líneas *Ppck* presentaron también un retraso en la floración. Además, en una de las líneas estudiadas (*Ppck-4*) no todas las plantas llegaron a florecer. El retraso en la floración iba acompañado de una disminución del número y del peso total de semillas. Esto indica que el silenciamiento afecta de forma importante a la productividad del sorgo. De forma análoga, en mutantes SALK de *Arabidopsis* para los genes *AtPPCK1* y *AtPPCK2* se redujo significativamente el rendimiento en semillas (Feria et al., 2022), especialmente en la línea *ppck1-*. En este trabajo, la producción de semillas también se ha visto reducida por el silenciamiento de *SbPPCK1-3*, aunque la disminución fue más severa en la línea *Ppck-2*. El papel de la fosforilación de la PEPC ha sido demostrado tanto en la formación como en la germinación de semillas, encontrándose regulada por metabolitos como el malato o la glucosa-6-fosfato y otros fotosintatos (Nhiri et al., 2000; Feria et al., 2008; Ruiz-Ballesta et al., 2016). En semillas de sorgo, se ha detectado actividad PEPC a lo largo del todo el proceso de maduración. Sin embargo, es en las primeras etapas de éste, cuando se detecta una mayor actividad y fosforilación de la PEPC, mientras que en las etapas posteriores es desfosforilada casi en su totalidad y, por tanto, se reduce también la actividad PEPC (Feria et al., 2008; Ruiz-Ballesta et al., 2016; Bouargalne et al., 2018). Todo esto indica que no solo la actividad PEPC, sino también su fosforilación a través de las PEPCk, juega un rol importante durante la formación y maduración de las semillas. No obstante, es necesario profundizar en este sentido, analizando los perfiles de actividad

y fosforilación de la PEPC a lo largo de la maduración de las semillas *Ppck* y, además también estudiar los efectos de este silenciamiento sobre la germinación de las semillas en distintas condiciones.

La mayor actividad PEPC y PEPCk en las primeras fases de formación de las semillas está asociada a la acumulación de sustancias de reservas como las proteínas (Bouargal et al., 2018). En soja (*G. max*), cultivares con mayores niveles de actividad PEPC presentan mayor contenido de proteínas (Yamamoto et al., 2019). En esta misma línea nuestro grupo (Feria et al., 2022) ha estudiado la calidad nutricional de semillas mutantes SALK de Arabidopsis para los genes *AtPPCK1* y *AtPPCK2*. Estas líneas silenciadas, especialmente *ppck1-*, presentaban una disminución en el contenido de proteínas, debido a cambios en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, afectándose también otros elementos importantes en la calidad de las semillas, como el contenido lipídico. Esto indica que la fosforilación de la PEPC tiene implicaciones importantes en la composición de las semillas. En el caso de las líneas silenciadas de sorgo no se detectan cambios tan severos, posiblemente debido a que son líneas parcialmente silenciadas, sin una drástica inhibición de la expresión de los genes *SbPPCK1-3*, mientras que las líneas de Arabidopsis son *knock-out*. En definitiva, sería necesario profundizar en el estudio no sólo de la composición de las semillas *Ppck*, sino también de los cambios metabólicos que se producen en las plantas y que provocan la alteración de la composición de las semillas, siendo destacable estudiar los efectos del silenciamiento sobre la fotosíntesis. Además, de investigar los cambios en la fosforilación y la actividad de la PEPCk en semillas.

Además, se cuantificaron otros elementos importantes que influyen en la calidad nutricional de las semillas, como los fenoles, grupo de moléculas de gran variedad que intervienen en las respuestas a distintas condiciones de estrés y mantienen la homeostasis redox en las células (Kolton et al., 2022); los taninos, abundante polifenol con función defensiva (Dehghanian et al., 2022); y el fitato o ácido fítico, principal reserva de P en semillas (Raboy, 2009). El contenido de estos compuestos fue alterado por el silenciamiento de *SbPPCK1-3*, observándose un aumento en el contenido de taninos y, sobre todo, de fitatos. Una menor fosforilación de la PEPC podría estar reduciendo la actividad PEPC, provocando que mayor cantidad de PEP vaya a la ruta del ácido shikímico. En dicha ruta se sintetizan aminoácidos aromáticos, como la fenilalanina, que es un importante sustrato para la síntesis de compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los taninos (Buchanan et al, 2015; Dehghanian et al., 2022). La síntesis del ácido fítico se lleva a cabo a partir de la G6P (Wang et al. 2022). Los cambios metabólicos causados por la el silenciamiento de *SbPPCK1-3* estarían provocando el desvío del flujo del carbono hacía la síntesis de la principal reserva de fosfato durante el desarrollo de las semillas, en detrimento de otras reservas como la del almidón, que se vio ligeramente reducida. Estos resultados sugieren que la fosforilación de la PEPC puede impactar de forma relevante sobre la calidad nutricional de las semillas.

Finalmente, se estudiaron los efectos del silenciamiento de los genes *SbPPCK1-3* en plantas expuestas a diferentes condiciones de estrés, y el efecto de la luz. Se encontró que el estado de fosforilación de la PEPC fue significativamente menor bajo deficiencia de P en hojas de las plantas modificadas que en las WT, demostrando el efecto del silenciamiento de estos genes. Al tratarse de hojas, probablemente el efecto mayoritario sobre el estado de fosforilación se debe a la quinasa y la PEPC fotosintéticas. Este mismo efecto fue observado en hojas tratadas con luz, que incrementó la fosforilación de la PEPC en las plantas WT, pero no en las líneas silenciadas. Por otro lado, el tratamiento salino empleado no aumento el estado de fosforilación de la PEPC en hojas. Sin embargo, nuestro grupo había demostrado el aumento de la fosforilación de la PEPC y de la actividad PEPCk en hojas de plantas aclimatadas a estrés salino (Echevarría et al., 2001; Monreal et al., 2007a, 2013a), aunque las condiciones de tratamiento fueron distintas, lo que podría explicar las diferencias. Además, los efectos tanto del estrés por falta de P como por sal, no afectaron drásticamente al crecimiento de las plantas silenciadas respecto a los efectos causados en la planta WT. Estos resultados sugieren que, aunque el silenciamiento de las *SbPPCK* provoca una menor fosforilación de la PEPC, el nivel de fosforilación alcanzado es suficiente para llevar a cabo la respuesta frente a estas condiciones.

En resumen, con este apartado se ha iniciado la caracterización de plantas de sorgo con los genes *SbPPCK1-3* silenciados, que repercute sobre el nivel de fosforilación de la PEPC en diferentes condiciones. Aunque no se han encontrado efectos drásticos sobre el crecimiento, son destacables los efectos sobre el tiempo de floración y la cantidad y calidad de las semillas. Esta investigación debe ser continuada estudiando en profundidad los efectos del silenciamiento sobre el metabolismo en hojas y en raíces, y sobre la fosforilación de la PEPC, bajo estos y otros estreses abióticos. Además, también sería importante investigar los efectos del silenciamiento sobre la producción bajo condiciones adversas como el estrés salino y continuar con el estudio de la composición de las semillas silenciadas, así como analizar los efectos del silenciamiento sobre la germinación de las mismas.

CONCLUSIONES

1. Las líneas *Ppc3* manifiestan en mayor grado los síntomas de toxicidad por aluminio: disminución de la velocidad de germinación, menor crecimiento en longitud de hojas y raíces, y mayor síntesis foliar de moléculas de estrés (MDA, prolina y antocianinas).
2. Los efectos del cadmio también son mayores en las líneas *Ppc3* en distintos aspectos: disminución de la velocidad de germinación y de elongación foliar, disminución del contenido en clorofila b, y aumento del contenido en MDA y prolina. Además, en la respuesta al déficit de hierro que causa el Cd, se pone de manifiesto una alteración en la homeostasis del Fe en las líneas silenciadas.
3. La actividad PEPC y la expresión de *SbPPC3* aumentan en las raíces de sorgo en respuesta a Al y Cd, pero no en las líneas *Ppc3*. Aunque el Al y el Cd incrementan la expresión de *SbPPC2* en las líneas silenciadas, incluso más que en el WT, eso no se traduce en un aumento de la actividad PEPC de raíces. No hay efectos marcados del aluminio sobre la actividad PEPC de hojas. Estos resultados muestran que PPC3 es la isoenzima PEPC responsable de las respuestas a Al y Cd que implican a dicha actividad enzimática en raíces de sorgo.
4. Tanto el Al como el Cd aumentan la actividad PEPCk en raíces. En ambos casos, aumenta la expresión de *SbPPCK2*, y dicho aumento, al igual que el aumento de actividad, son mayores en las líneas *Ppc3*. Esto puede reflejar un intento de compensar la falta de PPC3 en dichas líneas.
5. El Al y el Cd aumentan la cantidad de ácidos orgánicos, y, especialmente, de citrato, en los exudados radicales. El citrato es el principal ácido orgánico responsable de la resistencia a Al y Cd en sorgo. Aunque la actividad PPC3 no es necesaria para la síntesis y secreción de citrato a corto plazo, sí lo es para mantener un nivel alto de citrato en los exudados a más largo plazo. Consecuentemente, aunque el contenido en Cd en raíces es mayor en el WT a corto plazo, al aumentar el tiempo de tratamiento aumenta la velocidad de absorción de Cd en las líneas silenciadas.
6. El aporte de fosfato de calcio como fuente de P induce algunas respuestas al déficit de este, elemento, tanto en hojas como en raíces de sorgo. En general estas respuestas son de menor intensidad que a la falta total de P.
7. La deficiencia de P aumenta la expresión de los genes *SbPPC2* y *SbPPC3*, y de la actividad PEPC, en raíces de sorgo en la línea WT. Sin embargo, en las líneas *Ppc3* sólo se detecta aumento de la expresión de *SbPPC2*, pero no de *SbPPC3*, ni tampoco una mayor actividad PEPC. Estos resultados indican que PPC3 es la isoenzima responsable de los cambios de actividad PEPC detectada en raíces de sorgo en condiciones de falta de P. En hojas de todas las líneas se obtienen resultados similares en cuanto a la expresión de *SbPPC2* y *SbPPC3*, aunque esto no se traduce en un aumento de actividad PEPC debido a la presencia mayoritaria de la PEPC fotosintética.

8. La deficiencia de P aumenta la expresión de los genes *SbPPCK1-3* en hojas y de *SbPPCK2* y *3* en raíces, lo que se corresponde con un aumento en la actividad PEPCk.
9. Las líneas silenciadas, pero no la WT, siguen mostrando ciertas respuestas a la falta de P en presencia de fosfato cálcico, como son los altos niveles de antocianinas y de fosforilación de la PEPC en hojas, o la mayor expresión del gen *SbPHT1* en raíces. Además, estas plantas presentan menores niveles de P en raíces en comparación con las plantas silvestres. Estos resultados indican que *SbPPCK3* es una proteína importante para la solubilización del fosfato insoluble del medio.
10. La transformación de embriones inmaduros de sorgo con el plásmido pFGC161, albergando la secuencia completa de 855 pb del gen *SbPPCK1* en sentido y anti-sentido, causa el silenciamiento promedio para los tres genes *SbPPCK* del 58 y el 35%, en hojas de las líneas *Ppck-2* y *Ppck-4*, respectivamente.
11. El silenciamiento de *SbPPCK1-3* afecta a la fosforilación in vivo de la PEPC, estimada a partir de la IC_{50} de inhibición por malato. Las principales diferencias se observan en hojas, en las que la luz produce un aumento de fosforilación de la PEPC en el WT y no en las líneas silenciadas. De forma similar, la carencia de P aumenta la fosforilación de la PEPC sólo en el WT. No obstante, en condiciones control, la fosforilación es similar en el WT y en las líneas silenciadas, indicando que, en éstas, al no ser el silenciamiento completo, no se abole totalmente la fosforilación de la PEPC.
12. El silenciamiento de *SbPPCK1-3* impacta modestamente sobre el crecimiento vegetativo (crecimiento en longitud) y la producción de biomasa (peso de la parte aérea y de las raíces) en las líneas silenciadas.
13. El silenciamiento de *SbPPCK1-3* retrasa la floración y afecta a la productividad del sorgo, observándose una disminución en el peso y en la longitud de la espiga, y en el número y peso total de las semillas de las líneas silenciadas. Además, se alteraron diversos parámetros nutricionales. Especialmente destacable es el aumento en el contenido en fitatos, que son antinutrientes que disminuyen la capacidad nutricional de las semillas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, E., Hussien, S., Laing, M., Mengistu, F., 2013.** Aluminium toxicity tolerance in cereals: Mechanisms, genetic control and breeding methods. **African J. Agric. Res.** **8**, 711–722. <https://doi.org/10.5897/AJARx12.003>
- Abdel-Latif, A., 2008.** Cadmium induced changes in pigment content, ion uptake, proline content and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in *Triticum aestivum* seedlings. **Aust. J. Basic Appl. Sci.** **2**, 57–62.
- Abdul-Baki, A.A., 1974.** Short communication hypochlorite and tissue sterilization. **Planta** **376**, 373–376.
- Adriano, D.C., 1986.** Chapter 4: Cadmium, in: Trace elements in the terrestrial environment. Springer US, Aitken, USA, pp. 106–155.
- Adriano, D.C., 2001.** Chapter 8 Cadmium, in: Trace elements in the terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Springer US, Aitken, USA, pp. 263–314. <https://doi.org/10.2134/jeq1987.00472425001600010030x>
- Agency, E.E., 2019.** The European environment-state and outlook 2020. Knowledge for transition to a sustainable Europe, Teruleti Statisztika. Copenhagen, Denmark. <https://doi.org/10.15196/TS600305>
- Agetsuma, M., Furumoto, T., Yanagisawa, S., Izui, K., 2005.** The ubiquitin-proteasome pathway is involved in rapid degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase for C₄ photosynthesis. **Plant Cell Physiol.** **46**, 389–398. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci043>
- Ahmed, R.I., Ding, A., Xie, M., Kong, Y., 2018.** Progress in optimization of agrobacterium-mediated transformation in sorghum (*Sorghum bicolor*). **Int. J. Mol. Sci.** **19**. <https://doi.org/10.3390/ijms19102983>
- Akinseye, F.M., Adam, M., Agele, S.O., Hoffmann, M.P., Traore, P.C.S., Whitbread, A.M., 2017.** Assessing crop model improvements through comparison of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) simulation models: A case study of West African varieties. **F. Crop. Res.** **201**, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.10.015>
- Al-Ghafari, A., Elmorsy, E., Fikry, E., Alrowaili, M., Carter, W.G., 2019.** The heavy metals lead and cadmium are cytotoxic to human bone osteoblasts via induction of redox stress. **PLoS One** **14**, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225341>
- Álvarez, R., García-Mauriño, S., Feria, A.B., Vidal, J., Echevarría, C., 2003.** A conserved 19-amino acid synthetic peptide from the carboxy terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the in vitro phosphorylation of the enzyme by the calcium-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. **Plant Physiol.** **132**, 1097–1106. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023937>
- Ambasht, P.K., Kayastha, A.M., 2002.** Plant pyruvate kinase. **Biol. Plant** **45**, 1–10. <https://doi.org/10.1023/A:1015173724712>

- Amzallag, G.N., Lerner, H.R., Poljakoff-mayber, A., 1990.** Exogenous ABA as a modulator of the response of sorghum to high salinity. **J. Exp. Bot.** **41**, 1529–1534. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.12.1529>
- Andreo, C.S., Gonzalez, D.H., Iglesias, A.A., 1987.** Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. **FEBS Lett.** **213**, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81454-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81454-0)
- Arias-Baldrich, C., Bosch, N., Begines, D., Feria, A.B., Monreal, J.A., García-Mauriño, S., 2015.** Proline synthesis in barley under iron deficiency and salinity. **J. Plant Physiol.** **183**, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.05.016>
- Arias-Baldrich, C., de la Osa, C., Bosch, N., Ruiz-Ballesta, I., Monreal, J.A., García-Mauriño, S., 2017.** Enzymatic activity, gene expression and posttranslational modifications of photosynthetic and non-photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase in ammonium-stressed sorghum plants. **J. Plant Physiol.** **214**, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.03.020>
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (eds.), 2008.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Mc Graw Hill. Madrid, España.
- Bakrim, N., Brulfert, J., Vidal, J., Chollet, R., 2001.** Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is controlled by a similar signaling cascade in CAM and C₄ plants. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **286**, 1158–1162. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5527>
- Bakrim, N., Echevarría, C. Cretin, C., Arrio-Dupont, M., Pierre, J.N., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., 1992.** Regulatory phosphorylation of Sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Identification of the protein-serine kinase and some elements of the signal-transduction cascade. **Eur. J. Biochem.** **204**, 821–830. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16701.x>
- Bakrim, N., Nhiri, M., Pierre, J.N., Vidal, J., 1998.** Metabolite control of sorghum C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase catalytic activity and phosphorylation state. **Photosynth. Res.** **58**, 153–162. <https://doi.org/10.1023/A:1006164209129>
- Bali, A.S., Sidhu, G.P.S., Kumar, V., 2020.** Root exudates ameliorate cadmium tolerance in plants: A review. **Environ. Chem. Lett.** **18**, 1243–1275. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01012-x>
- Balzerque, C., Dartevelle, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J.M., Creff, A., Bissler, M., Brouchoud, C., Hagège, A., Müller, J., Chiarenza, S., Javot, H., Becuwe-Linka, N., David, P., Péret, B., Delannoy, E., Thibaud, M.C., Armengaud, J., Abel, S., Pellequer, J.L., Nussaume, L., Desnos, T., 2017.** Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. **Nat. Commun.** **8**, 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms15300>
- Bandarian, V., Poehner, W.J., Grover, S.D., 1992.** Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol.** **100**, 1411–1416. <https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1411>

- Barceló, J., Poschenrieder, C., 2002.** Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: A review. **Environ. Exp. Bot.** **48**, 75–92. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00013-8)
- Bari R., Datt Pant B., Stitt M., Scheible W.R., 2006.** PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. **Plant Physiol.** **141**, 988-999. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707>
- Bates, T.R., Lynch, J.P., 1996.** Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. **Plant Cell Environ.** **19**, 529–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00386.x>
- Begum, H.H., Osaki, M., Shinano, T., Miyatake, H., Wasaki, J., Yamamura, T., Watanabe, T., 2005.** The Function of a maize-derived phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC) in phosphorus-deficient transgenic rice. **Soil Sci Plant Nutr** **51**, 497–506.
- Begum, H.H., Osaki, M., Watanabe, T., Shinano, T., 2009.** Mechanisms of aluminum tolerance in phosphoenolpyruvate carboxylase transgenic rice. **J. Plant Nutr.** **32**, 84–96. <https://doi.org/10.1080/01904160802531035>
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005.** Cadmium toxicity in plants. **Brazilian J. Plant Physiol.** **17**, 21–34. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>
- Ben-Zioni, A., Vaadia, Y., Herman Lips, S., 1970.** Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. **Physiol. Plant** **23**, 1039–1047. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1970.tb08878.x>
- Berna, A., Bernier, F., 1999.** Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. **Plant Mol. Biol.** **39**, 539–549. <https://doi.org/10.1023/A:1006123432157>
- Bian, M., Zhou, M., Sun, D., Li, C., 2013.** Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. **Crop J.** **1**, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2013.08.002>
- Bläsing, O.E., Westhoff, P., Svensson, P., 2000.** Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in *Flaveria*, a conserved serine residue in the carboxyl-terminal part of the enzyme is a major determinant for C₄-specific characteristics. **J. Biol. Chem.** **275**, 27917–27923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909832199>
- Blonde, J.D., Plaxton, W.C., 2003.** Structural and kinetic properties of high and low molecular mass phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the endosperm of developing castor oilseeds. **J. Biol. Chem.** **278**, 11867–11873. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211269200>

- Borland, A.M., Taybi, T., 2004.** Synchronization of metabolic processes in plants with crassulacean acid metabolism. **J. Exp. Bot.** **55**, 1255–1265. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh105>
- Bouargalne, Y., Mrid, R. ben, el Omari, R., Nhiri, M., 2018.** Phosphoenolpyruvate carboxylase during maturation and germination sorghum seeds: enzyme activity and regulation. **Russ. J. Plant Physiol.** **65**, 824–832. <https://doi.org/10.1134/S1021443718060031>
- Boussama, N., Ouariti, O., Ghorbal, M.H., 1999.** Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. **J. Plant Nutrition** **22**, 731–752. <https://doi.org/10.1080/01904169909365668>
- Boxall, S.F., Dever, L.V., Knerová, J., Gould, P.D., Hartwell, J., 2017.** Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is essential for maximal and sustained dark CO₂ fixation and core circadian clock operation in the obligate crassulacean acid metabolism species *Kalanchoë fedtschenkoi*. **Plant Cell** **29**, 2519–2536. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00301>
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buchanan, B.B., Gruissem W., Jones, R.L., 2015.** Biochemistry and molecular biology of plants. (2nded). Ed. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville (Maryland). United States.
- Buchanan, C.D., Lim, S., Salzman, R.A., Kagiampakis, I., Morishige, D.T., Weers, B.D., Klein, R.R., Pratt, L.H., Cordonnier-Pratt, M.M., Klein, P.E., Mullet, J.E., 2005.** *Sorghum bicolor*'s transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. **Plant Mol. Biol.** **58**, 699–720. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-7876-2>
- Budde, R.J.A., Chollet, R., 1986.** *In Vitro* phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol.** **82**, 1107–1114. <https://doi.org/10.1104/pp.82.4.1107>
- Bukhov, N.G., Bondar, V. V., Drozdova, I.S., 1995.** Long-term effects of blue or red light on ATP and ADP contents in primary barley leaves. **Planta** **196**, 211–216. <https://doi.org/10.1007/BF00201376>
- Cakmak, I., 2002.** Plant nutrition research: Priorities to meet human needs for food in sustainable ways. **Plant Soil** **247**, 3–24. <https://doi.org/10.1023/A:1021194511492>

- Calderon-Vazquez, C., Ibarra-Laclette, E., Caballero-Perez, J., Herrera-Estrella, L., 2008.** Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. **J Exp Bot** **59**, 2479–2497. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern115>
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W., 2019.** Root exudation of primary metabolites: Mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. **Front. Plant Sci.** **10**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>
- Carillo, P., Gibon, Y., 2011.** Extraction and determination of proline. PrometheusWiki. <https://prometheusprotocols.net/function/tissue-chemistry/primary-metabolites/extraction-and-determination-of-proline/>
- Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., 1990.** *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. **FEBS Lett.** **263**, 233–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81381-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81381-W)
- Carvalho, G., Schaffert, R.E., Malosetti, M., Viana, J.H.M., Menezes, C.B., Silva, L.A., Guimaraes, C.T., Coelho, A.M., Kochian, L. V., Eeuwijk, F.A. van, Magalhaes, J.V., 2016.** Back to acid soil fields: The citrate transporter sbmate is a major asset for sustainable grain yield for sorghum cultivated on acid soils. **G3: Genes, Genomes, Genetics** **6**, 475–484. <https://doi.org/10.1534/g3.115.025791>
- Casas, A.M., Kononowicz, A.K., Zehri, U.B., Tomes, D.T., Axtell, J.D., Butler, L.G., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1993.** Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **90**, 11212–11216. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11212>
- Casati, P., Lara, M. V., Andreo, C.S., 2000.** Induction of a C₄-like mechanism of CO₂ fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. **Plant Physiol.** **123**, 1611–1622. <https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1611>
- Casimiro, I., Beckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J., 2003.** Dissecting Arabidopsis lateral root development. **Trends Plant Sci.** **8**, 165–171. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00051-7)
- Casson, S.A., Lindsey, K., 2003.** Genes and signalling in root development. **New Phytol.** **158**, 11–38. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00705.x>
- Champigny, M.L., Foyer, C., 1992.** Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: Basis for a new concept. **Plant Physiol.** **100**, 7–12. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.7>

- Chang, C., Hu, Y., Sun, S., Zhu, Y., Ma, G., Xu, G., 2009.** Proton pump OsA8 is linked to phosphorus uptake and translocation in rice. **J. Exp. Bot.** **60**, 557–565. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern298>
- Chardot, T.P., Wedding, R.T., 1992.** Role of cysteine in activation and allosteric regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol.** **98**, 780–783. <https://doi.org/10.1104/pp.98.2.780>
- Chen, L.S., Qi, Y.P., Jiang, H.X., Yang, L.T., Yang, G.H., 2010a.** Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. **African J. Biotechnol.** **9**, 9237–9247. <https://doi.org/10.5897/AJB2010.000-3350>
- Chen, L.S., Yang, L.T., Lin Z.H., Tang, N., 2013.** Roles of organic acid metabolism in plant tolerance to phosphorus-deficiency. In: Lüttge, U., Beyschlag, W., Francis, D., Cushman, J. (eds). **Progress in Botany** **74**, 213-230. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30967-0_8
- Chen, M., Tang, Y., Zhang, J., Yang, M., Xu, Y., 2010b.** RNA Interference-based suppression of phosphoenolpyruvate carboxylase results in susceptibility of rapeseed to osmotic stress. **J. Integr. Plant Biol.** **52**, 585–592. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00948.x>
- Chen, P., Li, X., Huo, K., Wei, X., Dai, C., Lv, C., 2014.** Promotion of photosynthesis in transgenic rice over-expressing of maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors. **J. Plant Physiol.** **171**, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.11.006>
- Chen, Z.C., Liao, H., 2016.** Organic acid anions: An effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils. **J. Genet. Genomics** **43**, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.11.003>
- Chen, Z.H., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 2008.** pH and carbon supply control the expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell Environ.** **31**, 1844–1850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01885.x>
- Chen, Z.H., Nimmo, G.A., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 2007.** BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. **Biochem. J.** **405**, 191–198. <https://doi.org/10.1042/BJ20070102>
- Cheng, D., Tan, M., Yu, H., Li, L., Zhu, D., Chen, Y., Jiang, M., 2018.** Comparative analysis of Cd-responsive maize and rice transcriptomes highlights Cd co-modulated orthologs. **BMC Genomics** **19**, 709. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5109-8>
- Chollet, R., Vidal, J., O’Leary, M.H., 1996.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **47**, 273–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.273>

- Ciereszko, I., Johansson, H., Hurry, V., Kleczkowski, L.A., 2001.** Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. **Planta** **212**, 598–605. <https://doi.org/10.1007/s004250000424>
- Clemens, S., 2006.** Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie** **88**, 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Cointry, V., Vert, G., 2019.** The bifunctional transporter-receptor IRT1 at the heart of metal sensing and signalling. **New Phytol.** **223**, 1173–1178. <https://doi.org/10.1111/nph.15826>
- Cordell, D., Drangert, J.O., White, S., 2009.** The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Glob. Environ. Chang.** **19**, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Coursol, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Vidal, J., Pierre, J.N., 2000.** An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation in illuminated and NH₄Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. **Plant J.** **23**, 497–506. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00819.x>
- Cretin, C., Keryer, E., Tagu, D., Lepiniec, L., Vidal, J., Gadal, P., 1990.** Complete cDNA sequence of sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. **Nucleic Acids Res.** **18**, 658. <https://doi.org/10.1093/nar/18.3.658>
- Crombez, H., Motte, H., Beeckman, T., 2019.** Tackling plant phosphate starvation by the roots. **Dev. Cell** **48**, 599–615. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.002>
- Cullen, J.M., Allwood, J.M., 2013.** Mapping the global flow of aluminium: from liquid aluminium to fabricated goods: supplemental information. **Environ. Sci. Technol.** **47**, 3057–3064. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/es304256s>
- Cunillera, N., Boronat, A., Ferrer, A., 1997.** The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. **J. Biol. Chem.** **272**, 15381–15388. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15381>
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J., 1999.** Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. **Annu. Rev. Plant Biol.** **50**, 305–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.305>
- Dahlberg, J., Berenji, J., Sikora, V., Latković, D., 2011.** Assessing sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] germplasm for new traits: food, fuel and unique uses. **Maydica** **56**, 85–92.

- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A., 2008.** How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. **J. Integr. Plant Biol.** **50**, 1268–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x>
- Dalziel, K.J., O’Leary, B., Brikis, C., Rao, S.K., She, Y.M., Cyr, T., Plaxton, W.C., 2012.** The bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme from developing castor oil seeds is subject to in vivo regulatory phosphorylation at serine-451. **FEBS Lett.** **586**, 1049–1054. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.054>
- Daneshgar, S., Callegari, A., Capodaglio, A.G., Vaccari, D., 2018.** The potential phosphorus crisis: Resource conservation and possible escape technologies: A review. **Resources** **7**, 1-22. <https://doi.org/10.3390/resources7020037>
- Das, N., Bhattacharya, S., Maiti, M.K., 2016.** Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene *OsMTP1* is promising for phytoremediation. **Plant Physiol. Biochem.** **105**, 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.049>
- Davis, R.D., 1984.** A complex environmental problem part II. Cadmium in sludges used as fertilizer. **Experientia** **40**, 117–126. <https://doi.org/10.1007/BF01963574>
- De Carvalho Gonçalves, J.F., Cambraia, J., Mosquim, P.R., Araújo, E.F., 2005.** Aluminum effect on organic acid production and accumulation in sorghum. **J. Plant Nutr.** **28**, 507–520. <https://doi.org/10.1081/PLN-200049202>
- De la Osa, C., 2020.** Efecto del silenciamiento de la fosfoenolpiruvato carboxilasa 3 (SbPPC3) en condiciones control y de estrés abiótico en plantas de sorgo. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- De la Osa, C., Pérez-López, J., Feria, A.-B., Baena, G., Marino, D., Coletto, I., Pérez-Montaño, F., Gandullo, J., Echevarria, C., García-Mauriño, S., Monreal, J.A., 2022.** Knock-down of phosphoenolpyruvate carboxylase 3 negatively impacts growth, productivity, and responses to salt stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Plant J.** **111**, 231-249. <https://doi.org/10.1111/tbj.15789>
- De Moraes, L.C., Pinheiro, S.S., Martino, H.S.D., Pinheiro-Sant’Ana, H.M., 2017.** Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): Nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** **57**, 372–390. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887057>
- De Vos, R.C., Lubberding, H.J., Bienfait, F., 1986.** Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. **Plant Physiol.** **81**, 842-846. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.842>.
- Deckert, J., 2005.** Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? **BioMetals** **18**, 475–481. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-1245-0>

- Dehghanian, Z., Habibi, K., Dehghanian, M., Aliyar, S., Asgari Lajayer, B., Astatkie, T., Minkina, T., Keswani, C., 2022. Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. *Heliyon* **8**, e09094. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09094>
- Dever, L.V., Blackwell, R.D., Fullwood, N.J., Lacuesta, M., Leegood, R.C., Onek, L.A., Pearson, M., Lea, P.J., 1995. The isolation and characterization of mutants of the C₄ photosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* **46**, 1363–1376. https://doi.org/10.1093/jxb/46.special_issue.1363
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085–1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- Do, P.T., Lee, H., Mookkan, M., Folk, W.R., Zhang, Z.J., 2016. Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep.* **35**, 2065–2076. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2019-6>
- Do, P.T., Lee, H., Nelson-Vasilchik, K., Kausch, A., Zhang, Z.J., 2018. Rapid and efficient genetic transformation of sorghum via Agrobacterium-mediated method. *Curr. Protoc. plant Biol.* e20077. <https://doi.org/10.1002/cppb.20077>
- Do, P.T., Zhang, Z.J., 2015. Sorghum transformation: achievements, challenges, and perspectives, in: Azhankanandam, K., Silverstone, A., Daniell, H., Davey, M.R. (Eds.), Recent advancements in gene expression and enabling technologies in crop plants. Springer. New York Heidelberg Dordrecht London, pp. 291–312.
- Dong, L., Patil, S., Condon, S.A., Haas, E.J., Chollet, R., 1999. The conserved C-terminal tetrapeptide of sorghum C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase is indispensable for maximal catalytic activity, but not for homotetramer formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 124–128. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1433>
- Dong, L.Y., Masuda, T., Kawamura, T., Hata, S., Izui, K., 1998. Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: Comparison with the C₄-form enzyme. *Plant Cell Physiol.* **39**, 865–873. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029446>
- Doshi, R., McGrath, A.P., Piñeros, M., Szewczyk, P., Garza, D.M., Kochian, L. V., Chang, G., 2017. Functional characterization and discovery of modulators of *SbMATE*, the agronomically important aluminium tolerance transporter from *Sorghum bicolor*. *Sci. Rep.* **7**, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18146-8>
- Doubnerová, V., Ryšlavá, H., 2011. What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? *Plant Sci.* **180**, 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.005>
- Driscoll, C.T., Schecher, W.D., 1990. The chemistry of aluminum in the environment. *Environ. Geochem. Health* **12**, 28–49. <https://doi.org/10.1007/BF01734046>

- Droog, F., 1997.** Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. **J. Plant Growth Regul.** **16**, 95–107. <https://doi.org/10.1007/PL00006984>
- Du, Z., Aghoram, K., Outlaw, W.H., 1997.** *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells of *Vicia faba* L. is enhanced by fusicoccin and suppressed by abscisic acid. **Arch. Biochem. Biophys.** **337**, 345–350. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9790>
- Duarte, B., Delgado, M., Caçador, I., 2007.** The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*. **Chemosphere** **69**, 836–840. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.007>
- Dubeaux, G., Neveu, J., Zelazny, E., Vert, G., 2018.** Metal Sensing by the *IRT1* transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. **Mol. Cell** **69**, 953–964.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.009>
- Duff, S.M., Chollet, R., 1995.** *In vivo* regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. **Plant Physiol.** **107**, 775–782. <https://doi.org/10.1104/pp.107.3.775>
- Duff, S.M., Moorhead, G.B.G., Lefebvre, D.D., Plaxton, W.C., 1989.** Phosphate starvation inducible ‘bypasses’ of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. **Plant Physiol.** **90**, 1275–1278. <https://doi.org/10.1104/pp.90.4.1275>
- Earle, S., Panchuk, K., 2019.** 3.2. Magma and magma formation, in: Victoria, B.C. (Ed.), *Physical Geology - 2nd Edition*. Victoria, B.C.: BCcampus, pp. 71–77.
- Echevarría, C., Garcia-Mauriño, S., Alvarez, R., Soler, A., Vidal, J., 2001.** Salt stress increases the Ca²⁺-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in sorghum leaves. **Planta** **214**, 283–287. <https://doi.org/10.1007/s004250100616>
- Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arriodupont, M., Vidal, J., 1994.** The Effect of pH on the covalent and metabolic control of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum leaf. **Arch. Biochem. Biophys.** **315**, 425–430. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1520>
- Echevarría, C., Vidal, J., 2003.** The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. **Plant Physiol. Biochem.** **41**, 541–547. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00068-8)
- Echevarría, C., Vidal, J., Jiao, J., Chollet, R., 1990.** Reversible light activation of the phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves. **FEBS Lett.** **275**, 25–28. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81430-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81430-V)
- Edwards, G.E., Furbank, R.T., Hatch, M.D., Osmond, C.B., 2001.** What Does It Take to Be C₄? Lessons from the Evolution of C₄ photosynthesis traditionally arisen from close pathways reflects evolutionary outcomes in the face of one dominant. **Plant Physiol.** **125**, 46–49.

- Eekhout, T., Larsen, P., De Veylder, L., 2017.** Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends Plant Sci.** **22**, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.003>
- EFSA, 2012.** Cadmium dietary exposure in the European population. **EFSA J.** **10**, 2551. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoor, M.B., Rizwan, M., 2014.** Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **106**, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.007>
- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D., Ayhan, B., 2008.** Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. **J. Plant Physiol.** **165**, 600–611. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.017>
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E.E., Bolan, N., Tack, F.M.G., Sebastian, A., Prasad, M.N.V., Rinklebe, J., 2022.** Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** **52**, 675–726. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435>
- Epstein, E., Norlyn, J.D., Rush, D.W., Kingsbury, R.W., Kelley, D.B., Cunningham, G.A., Wrona, A.F., 1980.** Saline culture of crops: A genetic approach. **Science** **210**, 399–404. <https://doi.org/10.1126/science.210.4468.399>
- Ermolayev, V., Weschke, W., Manteuffel, R., 2003.** Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. **J. Exp. Bot.** **54**, 2745–2756. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg302>
- Ernst, W.H.O., Krauss, G.J., Verkleij, J.A.C., Wesenberg, D., 2008.** Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. **Plant Cell Environ.** **31**, 123–143. <https://doi.org/10.1111/j.13653040.2007.01746.x>
- Esfahani, M.N., Inoue, K., Nguyen, K.H., Chu, H.D., Watanabe, Y., Kanatani, A., Burritt, D.J., Mochida, K., Tran, L.S.P., 2021.** Phosphate or nitrate imbalance induces stronger molecular responses than combined nutrient deprivation in roots and leaves of chickpea plants. **Plant Cell Environ.** **44**, 574–597. <https://doi.org/10.1111/pce.13935>
- Eticha, D., Zahn, M., Bremer, M., Yang, Z., Rangel, A.F., Rao, I.M., Horst, W.J., 2010.** Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. **Ann. Bot.** **105**, 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq049>

- Ettema, T.J.G., Makarova, K.S., Jellema, G.L., Gierman, H.J., Koonin, E. V., Huynen, M.A., De Vos, W.M., Van Der Oost, J., 2004.** Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism. **J. Bacteriol.** **186**, 7754–7762. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7754-7762.2004>
- Evans, J.R., Santiago, L.S., 2014.** Prometheus wiki gold leaf protocol: Gas exchange using LI-COR 6400. **Funct. Plant Biol.** **41**, 223–226. <https://doi.org/10.1071/FP10900>
- Exley, C., 2009.** Darwin, natural selection and the biological essentiality of aluminium and silicon. **Trends Biochem. Sci.** **34**, 589–593. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.07.006>
- Exley, C., House E.R., 2011.** Aluminium in the human brain. **Monatsh. Chem.** **142**, 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0417-y>
- Fang, Z., Shao, C., Meng, Y., Wu, P., Chen, M., 2009.** Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. **Plant Science** **176**, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.007>
- FAO, 1995.** Sorghum and millets in human nutrition. Food and agriculture organization of the united nations, Rome.
- FAO, 2007.** Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible, Boletín Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Fertilizantes y Nutrición Vegetal. Roma.
- FAO, 2016.** Estado mundial del recurso del suelo -Resumen técnico. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura y Grupo Técnico. Roma, Italia.
- FAO, 2020.** Crops production database. FAOSTAT. Latest update: 08/10/2022. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- FAO, 2021.** Global map of salt-affected soils: GSASmap V1.0. Roma, Italia. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb7247en>
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L., 2012.** Production, import/export, use and disposal, in: Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR)(US), A. (GA) (Ed.), Toxicological profile for cadmium. Atlanta (US), pp. 267–274. [https://doi.org/10.1016/s1090-3798\(09\)70033-9](https://doi.org/10.1016/s1090-3798(09)70033-9)
- Feria, A.B., Alvarez, R., Cochereau, L., Vidal, J., García-Mauriño, S., Echevarría, C., 2008.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and abscisic acid during the development and germination of barley seeds. **Plant Physiol.** **148**, 761–774. <https://doi.org/10.1104/pp.108.124982>

- Feria, A.B., Bosch, N., Sánchez, A., Nieto-Ingelmo, A.I., de la Osa, C., Echevarría, C., García-Mauriño, S., Monreal, J.A., 2016.** Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and PEPC-kinase (PEPC-k) isoenzymes in *Arabidopsis thaliana*: role in control and abiotic stress conditions. **Planta** **244**, 901–913. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2556-9>
- Feria, A.B., Ruíz-Ballesta, I., Baena G., Ruíz-López N., Echevarria C., Vidal J., 2022.** Phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase isoenzymes play an important role in the filling and quality of *Arabidopsis thaliana* seed. **Plant Physiol. Biochem.** **190**, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.012>
- Figuroa, C.M., Feil, R., Ishihara, H., Watanabe, M., Kölling, K., Krause, U., Höhne, M., Encke, B., Plaxton, W.C., Zeeman, S.C., Li, Z., Schulze, W.X., Hoefgen, R., Stitt, M., Lunn, J.E., 2016.** Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. **Plant J.** **85**, 410–423. <https://doi.org/10.1111/tpj.13114>
- Filippelli, G.M., 2011.** Phosphate rock formation and marine phosphorus geochemistry: The deep time perspective. **Chemosphere** **84**, 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.019>
- Fita, A., Bowen, H.C., Hayden, R.M., Nuez, F., Picó, B., Hammond, J.P., 2012.** Diversity in expression of Phosphorus (p) responsive genes in *Cucumis melo* L. **PLoS One** **7**, e35387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035387>
- Fjose, A., Ellingsen, S., Wargelius, A., Seo, H-C., 2001.** RNA interference: mechanisms and applications. **Biotechnol. Annu. Rev.** **7**, 31–57. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(01\)07032-6](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(01)07032-6)
- Fleischer, M., Sarofim, A.F., Fassett, D.W., Hammond, P., Shacklette, H.T., Nisbet, I.C.T., Epstein, S., 1974.** Environmental impact of cadmium: A review by the panel on hazardous trace substances. **J. Environ. Health** **7**, 253–323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1289/ehp.747253>
- Flowers, T.J., Colmer, T.D., 2008.** Salinity tolerance in halophytes. **New Phytol.** **179**, 945–963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
- Flügge, U.I., Häusler, R.E., Ludewig, F., Fischer, K., 2003.** Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. **Physiol. Plant.** **118**, 475–482 <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00137.x>
- Fontaine, V., Hartwell, J., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 2002.** *Arabidopsis thaliana* contains two phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes with different expression patterns. **Plant, Cell Environ.** **25**, 115–122. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00805.x>

- Foy, C.D., 1988. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** **19**, 959–987. <https://doi.org/10.1081/CSS-120002389>
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** **29**, 511–566. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002455>
- Foyer, C., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiol. Plant.** **100**, 241–254. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x>
- Foyer, C., Spencer, C., 1986. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves: Effects on intracellular orthophosphate distribution, photosynthesis and assimilate partitioning. **Planta** **167**, 369–375. <https://doi.org/10.1007/BF00391341>
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Veselov, D., Kudoyarova, G., 2004. Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. **J. Exp. Bot.** **55**, 1115–1123. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh117>
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, P.O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G., Volkov, V., 2006. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. **J. Exp. Bot.** **57**, 1079–1095. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj095>
- Fu, H., Yu, H., Li, T., Wu, Y., 2019. Effect of cadmium stress on inorganic and organic components in xylem sap of high cadmium accumulating rice line (*Oryza sativa* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **168**, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.023>
- Fujita, N., Miwa, T., Ishijime, S., Izui, K., Katsuki, H., 1984. The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the *ppc* gene and deduced amino acid sequence. **J. Biochem.** **95**, 909–916. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134718>
- Fukayama, H., Tamai, T., Taniguchi, Y., Sullivan, S., Miyao, M., Nimmo, H.G., 2006. Characterization and functional analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in rice. **Plant J.** **47**, 258–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02779.x>
- Furumoto, T., Izui, K., Quinn, V., Furbank, R.T., von Caemmerer, S., 2007. Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is not essential for high photosynthetic rates in the C₄ species *Flaveria bidentis*. **Plant Physiol** **144**, 1936–1945. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102541>

- Gadal P., Pacquit V., Giglioni N., Bui V.L., Pierre J.N., Echevarría C., Vidal J., 1996.** The role of PEPC phosphorylation in the regulation of C₄ photosynthesis. In: Shewry PR, Halford NG, Hooley R (eds.). Protein phosphorylation in plants, 53-64. Clarendon Press. Oxford, Inglaterra.
- Gandullo, J., 2010.** Implicación del extremo C-terminal de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la degradación y fosforilación de la proteína. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Gandullo, J., Monreal, J.A., Álvarez, R., Díaz, I., García-Mauriño, S., Echevarria, C., 2019.** Anionic phospholipids induce conformational changes in phosphoenolpyruvate carboxylase to increase sensitivity to cathepsin proteases. **Front. Plant Sci.** **10**, 582. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00582>
- García Mata, C., Lamattina, L., 2001.** Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.** **126**, 1196–1204. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1196>
- García-Atance, G., 1982.** El Sorgo para grano. Hojas Divulg. Minist. Agric. Pesca y Aliment. Número 7/8, Publicaciones de Extensión Agraria.
- García-Mauriño, S., Monreal, J.A., Alvarez, R., Vidal, J., Echevarría, C., 2003.** Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence from osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. **Planta** **216**, 648–655. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0893-3>
- Garson, L., Gray, V., 1991.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by nitrate and alanine. **Biochem. Int.** **23**, 299–305.
- Gasparis, S., Orczyk, W., Zalewski, W., Nadolska-Orczyk, A., 2011.** The RNA-mediated silencing of one of the *Pin* genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, and increases grain hardness. **J. Exp. Bot.** **62**, 4025–4036. <https://doi.org/10.1093/jxb/err103>
- Gaume, A., Mächler, F., De León, C., Narro, L., Frossard, E., 2001.** Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. **Plant Soil** **228**, 253–264. <https://doi.org/10.1023/A:1004824019289>
- Gennidakis, S., Rao, S., Greenham, K., Uhrig, R.G., O’Leary, B., Snedden, W.A., Lu, C., Plaxton, W.C., 2007.** Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides interact in the hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds. **Plant J.** **52**, 839–849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03274.x>

- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I., Yupsanis, T., 2008.** Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **J. Plant Physiol.** **165**, 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.014>
- Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J.H.M., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., Stitt, M., 2004.** A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell** **16**, 3304–3325. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025973>
- Giglioli-Guivarc'h, N., Pierre, J.N., Brown, S., Chollet, R., Vidal, J., Gadal, P., 1996.** The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. **Plant Cell** **8**, 573–586. <https://doi.org/10.2307/3870336>
- Gil, F. (ed.), 1995.** Fotosíntesis C₄. En: Elementos de Fisiología Vegetal, 627-666. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R., Mittler, R., 2014.** A tidal wave of signals: Calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends Plant Sci.** **19**, 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.013>
- Giordano, M., 2001.** Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO₂ and high N concentrations. **J. Plant Physiol.** **158**, 577–581. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00234>
- Glenn, E.P., Brown, J.J., Blumwald, E., 1999.** Salt tolerance and crop potential of halophytes. **Crit. Rev. Plant Sci.** **18**, 227–255. [https://doi.org/10.1016/S0735-2689\(99\)00388-3](https://doi.org/10.1016/S0735-2689(99)00388-3)
- Goldstein, A., Baertlein, D., McDaniel, R., 1988.** Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum* : I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. **Plant Physiol.** **87**, 711–715. <https://doi.org/10.1104/pp.87.3.711>
- Gonçalves, B.X., Lima-Melo, Y., Maraschin, F. dos S., Margis-Pinheiro, M., 2020.** Phosphate starvation responses in crop roots: from well-known players to novel candidates. **Environ. Exp. Bot.** **178**, 104162. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104162>
- González, M.C., Osuna, L., Echevarría, C., Vidal, J., Cejudo, F.J., 1998.** Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains. **Plant Physiol.** **116**, 1249–1258. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1249>

- González, M.C., Sánchez, R., Cejudo, F.J., 2003.** Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* **216**, 985–992. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0951-x>
- González-Segura, L., Muñica-Jiménez, C., Juárez-Díaz, J.A., Güémez-Toro, R., Martínez-Castilla, L.P., Muñoz-Clares, R.A., 2018.** Identification of the allosteric site for neutral amino acids in the maize C₄ isozyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: The critical role of Ser-100. *J. Biol. Chem.* **293**, 9945–9957. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002884>
- Gouia, H., Ghorbal M.H., Meyer C., 2000.** Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 629-638. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00775-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00775-0)
- Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H., 2003.** Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *J. Plant Physiol.* **160**, 367–376. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00785>
- Gousset-Dupont, A., Lebouteiller, B., Monreal, J., Echevarria, C., Pierre, J.N., Hodges, M., Vidal, J., 2005.** Metabolite and post-translational control of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves and mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **169**, 1096–1101. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.07.014>
- Gregory, A.L., Hurley, B.A., Tran, H.T., Valentine, A.J., She, Y.M., Knowles, V.L., Plaxton, W.C., 2009.** *In vivo* regulatory phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase *AtPPCI* in phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **420**, 57–65. <https://doi.org/10.1042/BJ20082397>
- Grootboom, A.W., Mkhonza, N.L., O’Kennedy, M.M., Chakauya, E., Kunert, K., Chikwamba, R.K., 2010.** Biolistic mediated sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) transformation via mannose and bialaphos based selection systems. *Int. J. Bot.* **6**, 89–94. <https://doi.org/10.3923/ijb.2010.89.94>
- Güémez-Toro, R., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R.A., 2012.** Allosteric regulation of the photosynthetic C₄ isoenzyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: A comparative study between enzymes from monocot and dicot plants. *J. Mex. Chem. Soc.* **56**, 58–66. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v56i1.275>
- Guidici-Ortoni, M.T., Vidal, J., Le Maréchal, P., Thomas, M., Gadal, P., Rémy, R., 1988.** *In vivo* phosphorylation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochimie* **70**, 769–772. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90106-X](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90106-X)
- Gupta, B., Huang, B., 2014.** Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J. Genomics* **2014**, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>

- Gupta, K.J., Shah, J.K., Brotman, Y., Jahnke, K., Willmitzer, L., Kaiser, W.M., Bauwe, H., Igamberdiev A.U., 2012.** Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. **J. Exp. Bot.** **63**, 1773-1784. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers053>
- Gurel, S., Gurel, E., Kaur, R., Wong, J., Meng, L., Tan, H.Q., Lemaux, P.G., 2009.** Efficient, reproducible Agrobacterium-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos. **Plant Cell Rep.** **28**, 429–444. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0655-1>
- Haberlandt G., 1914.** Physiological plant anatomy. Ed. McMillan. London, United Kingdom.
- Haider, F.U., Liqun, C., Coulter, J.A., Cheema, S.A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., Farooq, M., 2021.** Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **211**, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Halimaa, P., Blande, D., Baltzi, E., Aarts, M.G.M., Granlund, L., Keinänen, M., Kärenlampi, S.O., Kozhevnikova, A.D., Peräniemi, S., Schat, H., Seregin, I.V., Tuomainen, M., Tervahauta A.I., 2019.** Transcriptional effects of cadmium on iron homeostasis differ in calamine accessions of *Noccaea caerulescens*. **Plant Journal** **97**, 306-320. <https://doi.org/10.1111/tpj.14121>
- Ham, B.K., Chen, J., Yan, Y., Lucas, W.J., 2018.** Insights into plant phosphate sensing and signaling. **Curr. Opin. Biotechnol.** **49**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.005>
- Hammond, J.P., Broadley, M.R., White, P.J., 2004.** Genetic responses to phosphorus deficiency. **Ann. Bot.** **94**, 323–332. <https://doi.org/10.1093/aob/mch156>
- Hanikenne, M., Esteves, S.M., Fanara, S., Rouached, H., 2021.** Coordinated homeostasis of essential mineral nutrients: A focus on iron. **J. Exp. Bot.** **72**, 2136–2153. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa483>
- Harris-Shultz, K.R., Hayes, C.M., Knoll, J.E., 2019.** Mapping QTLs and identification of genes associated with drought resistance in sorghum, in: Zhao, Z.-Y., Dahberg, J. (Eds.), Sorghum methods and protocols. Springer New York, pp. 11–40.
- Hartwell, J., Gill, A., Nimmo, G.A., Wilkins, M.B., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 1999.** Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. **Plant J.** **20**, 333–342. <https://doi.org/10.1046/j.1365313X.1999.t01-1-00609.x>
- Hartwell, J., Smith, L.H., Wilkins, M.B., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 1996.** Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is regulated at the level of translatable mRNA in response to light or a circadian rhythm. **Plant J.** **10**, 1071–1078. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10061071.x>

- Hasan, S.A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., Ahmad, A., 2009.** Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. **J. Environ. Biol.** **30**, 165–174. <https://doi.org/10.1016/c2017-0-02050-5>
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J., 2000.** Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **51**, 463–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- Hasni, I., Yaakoubi, H., Hamdani, S., Tajmir-Riahi, H.A., Carpentier, R., 2015.** Mechanism of interaction of Al³⁺ with the proteins composition of photosystem II. **PLoS One** **10**, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120876>
- Hatch, M.D., 1987.** C₄ photosynthesis: a unique elend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. **BBA Rev. Bioenerg.** **895**, 81–106. [https://doi.org/10.1016/S0304-4173\(87\)80009-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4173(87)80009-5)
- Hatch, M.D., Slack, C.R., 1970.** Photosynthetic CO₂-Fixation Pathways. **Annu. Rev. Plant Physiol.** **21**, 141–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.21.060170.001041>
- Henry, A., Chopra, S., Clark, D.G., Lynch, J.P., 2012.** Responses to low phosphorus in high and low foliar anthocyanin coleus (*Solenostemon scutellarioides*) and maize (*Zea mays*). **Funct. Plant Biol.** **39**, 255–265. <https://doi.org/10.1071/FP11256>
- Herppich, W., Herppich, M., Von Willert, D.J., 1992.** The irreversible C₃ to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of mesembryanthemum crystallinum is under strict ontogenetic control. **Bot. Acta** **105**, 34–40. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00264.x>
- Hetrick, B.A.D., 1991.** Mycorrhizas and root architecture. **Experientia** **47**, 355–362. <https://doi.org/10.1007/BF01972077>
- Hewitt, E.J., 1966.** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticultural and Plantation Crops, East Malling Tech Commun No. 22.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999.** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** **207**, 604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Hoffland, E., Van Den Boogaard, R., Nelemans, J., Findenegg, G., 1992.** Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. **New Phytol.** **122**, 675–680. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb00096.x>
- Huang, S.C., Chu, S.J., Guo, Y.M., Ji, Y.J., Hu, D.Q., Cheng, J., Lu, G.H., Yang, R.W., Tang, C.Y., Qi, J.L., Yang, Y.H., 2017a.** Novel mechanisms for organic acid-mediated aluminium tolerance in roots and leaves of two contrasting soybean genotypes. **AoB Plants** **9**, 1–12. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx064>

- Huang, D., Gong, X., Liu, Y., Zeng, G., Lai, C., Bashir, H., Zhou, L., Wang, D., Xu, P., Cheng, M., Wan, J., 2017b. Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. *Planta* **245**, 863–873. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2664-1>
- Huang, L.-Y., Lin, C.W.W., Lee, R.-H.H., Chiang, C.-Y.Y., Wang, Y.-C.C., Chang, C.H.H., Huang, H.J.J., 2017c. Integrating early transcriptomic responses to rhizotoxins in rice (*Oryza sativa* L.) reveals key regulators and a potential early biomarker of cadmium toxicity. *Front. Plant Sci.* **8**, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01432>
- Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2002. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* **29**, 649–659. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01247.x>
- Huppe, H.C., Turpin, D.H., 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **45**, 577–607. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.003045>
- Hur, Y.J., Lee, H.G., Jeon, E.J., Lee, Y.Y., Nam, M.H., Yi, G., Eun, M.Y., Nam, J., Lee, J.H., Kim, D.H., 2007. A phosphate starvation-induced acid phosphatase from *Oryza sativa*: Phosphate regulation and transgenic expression. *Biotechnol. Lett.* **29**, 829–835. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9318-5>
- Igbokwe, I.O., Igwenagu, E., Igbokwe, N.A., 2020. Aluminium toxicosis: A review of toxic actions and effects. *Interdiscip. Toxicol.* **12**, 45–70. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0007>
- Iglesias, A.A., Andreo, C.S., 1984. On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* **75**, 983–987. <https://doi.org/10.1104/pp.75.4.983>
- Inostroza-Blancheteau, C., Renge, Z., Alberdi, M., De La Luz Mora, M., Aquea, F., Arce-Johnson, P., Reyes-Díaz, M., 2012. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 2069–2079. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0954-4>
- Ivushkin K., Bartholomeus H., Bregt A.K., Pulatov A., Kempen B., de Sousa L., 2019. Global mapping of soil salinity change. *Remote Sens. Environ.* **231**, 111260. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111260>
- Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T., Kai, Y., 2004. Phosphoenol pyruvate carboxylase: A new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 69–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141619>
- Izui, K., Sabe, H., Katsuki, H., 1981. Increased synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in a strain of *Escherichia coli* bearing a ColE1-*ppc*⁺ hybrid plasmid. *FEBS Lett.* **133**, 311–315. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80531-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80531-5)

- Jackson, T., MacGillivray, A., 1995.** Accounting for cadmium: Tracking emissions of cadmium from the global economy. **Chem. Ecol.** **11**, 137–181. <https://doi.org/10.1080/02757549508039067>
- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., 2011.** Gene expression profiling of plants under salt stress. **Crit. Rev. Plant Sci.** **30**, 435–458. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.605739>
- Jawali, N., 1990.** The dimeric form of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: Physical and kinetic properties. **Arch. Biochem. Biophys.** **277**, 61–68. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90550-I](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90550-I)
- Jeanneau, M., Gerentes, D., Foueillassar, X., Zivy, M., Vidal, J., Toppan, A., Perez, P., 2002a.** Improvement of drought tolerance in maize: Towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C₄-PEPC. **Biochimie** **84**, 1127–1135. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)00024-X)
- Jeanneau, M., Vidal, J., Gousset-Dupont, A., Lebouteiller, B., Hodges, M., Gerentes, D., Perez, P., 2002b.** Manipulating PEPC levels in plants. **J. Exp. Bot.** **53**, 1837–1845. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf061>
- Jedmowski, C., Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., Brüggemann, W., 2014.** Comparative analysis of *Sorghum bicolor* proteome in response to drought stress and following recovery. **Int. J. Proteomics** **2014**, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/395905>
- Jia, W., Lv, S., Feng, J., Li, J., Li, Y., Li, S., 2016.** Morphophysiological characteristic analysis demonstrated the potential of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in the phytoremediation of cadmium-contaminated soils. **Environ. Sci. Pollut. Res.** **23**, 18823–18831. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7083-5>
- Jiang, W., He, P., Zhou, M., Lu, X., Chen, K., Liang, C., Tian, J., 2021.** Soybean responds to phosphate starvation through reversible protein phosphorylation. **Plant Physiol. Biochem.** **167**, 222–234. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.007>
- Jiao, J.A., Chollet R., 1991.** Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ and crassulacean acid metabolism plants. **Plan Physiol.** **95**, 981–985. <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.981>
- Jiao, J.A., Echevarría, C., Vidal, J., Chollet, R., 1991.** Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C₄ plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **88**, 2712–2715. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2712>
- Johnson, J.F., Vance, C.P., Allan, D.L., 1996.** Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol.** **112**, 31–41. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.31>

- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L. V., Gilroy, S., 2006.** Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell Environ.** **29**, 1309–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01509.x>
- Jungk, A., 2001.** Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** **164**, 121–129. [https://doi.org/10.1002/15222624\(200104\)164:2<121::AID-JPLN121>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/15222624(200104)164:2<121::AID-JPLN121>3.0.CO;2-6)
- Kaeppler, H.F., Pedersen, J.F., 1997.** Evaluation of 41 elite and exotic inbred Sorghum genotypes for high quality callus production. **Plant Cell. Tissue Organ Cult.** **48**, 71–75. <https://doi.org/10.1023/A:1005765009568>
- Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K., Izui, K., 1999.** Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **96**, 823–828. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.823>
- Kajala, K., Covshoff, S., Karki, S., Woodfield, H., Tolley, B.J., Dionora, M.J.A., Mogul, R.T., Mabilangan, A.E., Danila, F.R., Hibberd, J.M., Quick, W.P., 2011.** Strategies for engineering a two-celled C₄ photosynthetic pathway into rice. **J. Exp. Bot.** **62**, 3001–3010. <https://doi.org/10.1093/jxb/err022>
- Kimatu, J.N., Diarso, M., Song, C., Agboola, R.S., Pang, J., Qi, X., Liu, B., 2011.** DNA cytosine methylation alterations associated with aluminium toxicity and low pH in *Sorghum bicolor*. **African J. Agric. Res.** **6**, 4579–4593. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.954>
- Kluge, M., 1983.** The role of PEPC in C₄ photosynthesis and crassulacean acid metabolism. **Physiol. Veg.** **21**, 817–852.
- Kobayashi, T., Nishizawa, N.K., 2012.** Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** **63**, 131–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>
- Kobayashi, Y., Hoekenga, O.A., Itoh, H., Nakashima, M., Saito, S., Shaff, J.E., Maron, L.G., Piñeros, M.A., Kochian, L. V., Koyama, H., 2007.** Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiol.** **145**, 843–852. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102335>
- Kochian, L. V., 1995.** Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **46**, 237–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.001321>
- Kochian, L. V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004.** How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.** **55**, 459–493. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655>

- Kochian, L. V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A., 2005.** The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant Soil** **274**, 175–195. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1158-7>
- Kochian, L. V., Piñeros, M.A., Liu, J., Magalhaes, J. V., 2015.** Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. **Annu. Rev. Plant Biol.** **66**, 571–598. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>
- Kolton, A., Dlugosz-Grochowska, O., Wojciechowska R., Czaja M., 2022.** Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. **Sci. Hort.** **291**, 110561. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110561>
- Kondracka, A., Rychter, A.M., 1997.** The role of P(i) recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. **J. Exp. Bot.** **48**, 1461–1468. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.7.1461>
- Kramer, P.J., Boyer, J.S., 1995.** Cell water relations, in: Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego. <https://doi.org/10.1016/b978-012425060-4/50003-6>
- Kresovich, S., Barbazuk, B., Bedell, J.A., Borrell, A., Buell, C.R., Burke, J., Clifton, S., Cordonnier-Pratt, M.M., Cox, S., Dahlberg, J., Erpelding, J., Fulton, T.M., Fulton, B., Fulton, L., Gingle, A.R., Hash, C.T., Huang, Y., Jordan, D., Klein, P.E., Klein, R.R., Magalhaes, J., McCombie, R., Moore, P., Mullet, J.E., Ozias-Akins, P., Paterson, A.H., Porter, K., Pratt, L., Roe, B., Rooney, W., Schnable, P.S., Stelly, D.M., Tuinstra, M., Ware, D., Warek, U., 2005.** Toward sequencing the sorghum genome. A U.S. National Science Foundation-sponsored workshop report. **Plant Physiol.** **138**, 1898–1902. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065136>
- Kumar, S., Pallavi, Chugh, C., Seem, K., Kumar, S., Vinod, K.K., Mohapatra, T., 2021.** Characterization of contrasting rice (*Oryza sativa* L.) genotypes reveals the Pi-efficient schema for phosphate starvation tolerance. **BMC Plant Biol.** **21**, 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03015-4>
- Kumar, S., Prasad, S., Yadav, K.K., Shrivastava, M., Gupta, N., Nagar, S., Bach, Q.V., Kamyab, H., Khan, S.A., Yadav, S., Malav, L.C., 2019.** Hazardous heavy metals contamination of vegetables and food chain: Role of sustainable remediation approaches - A review. **Environ. Res.** **179**, 108792. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108792>
- Kumari, M., Taylor, G.J., Deyholos, M.K., 2008.** Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Genet. Genomics** **279**, 339–357. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0316-z>
- Kuriakose, S. V., Prasad, M.N. V., 2008.** Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. **Plant Growth Regul** **54**, 143–156. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9237-4>

- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature** **227**, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Landi, M., Tattini, M., Gould, K.S., 2015.** Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. **Environ. Exp. Bot.** **119**, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.012>
- Lara, M.V., Casati, P., Andreo, C.S., 2001.** *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. **Plant Cell Physiol.** **42**, 441–445. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce052>
- Latzko E., Kelly G.J., 1983.** The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. **Physiol. Veg.** **21**, 805-815.
- Law, R.D., Plaxton, W.C., 1997.** Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase by a copurifying phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. **Eur. J. Biochem.** **247**, 642–651. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00642.x>
- Lei, K., Cheng, J.Q., An, Y., Li, X.S., An, G., 2022.** Organ specific transcriptome analysis of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) in response to low phosphorus stress during early stage of growth. **Soil Sci Plant Nutr** **68**, 463–472. <https://doi.org/10.1080/00380768.2022.2098533>
- Lei, M., Zhu, C., Liu, Y., Karthikeyan, A.S., Bressan, R.A., Raghothama, K.G., Liu, D., 2011.** Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*. **New Phytol.** **189**, 1084–1095. <https://doi.org/10.1111/j.14698137.2010.03555.x>
- Lepiniec, L., Keryer, E., Philippe, H., Gadal, P., Créatin, C., 1993.** Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. **Plant Mol. Biol.** **21**, 487–502. <https://doi.org/10.1007/BF00028806>
- Lepiniec, L., Thomas, M., Vidal, J., 2003.** From enzyme activity to plant biotechnology: 30 Years of research on phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol. Biochem.** **41**, 533–539. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00069-X)
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., Créatin, C., 1994.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. **Plant Sci.** **99**, 111–124. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90168-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90168-6)
- Leung, J., Giraudat, J., 1998.** Abscisic acid signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.** **49**, 199–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.199>
- Li, B., Chollet, R., 1993.** Resolution and identification of C₄ phosphoenolpyruvate-carboxylase protein-kinase polypeptides and their reversible light activation in maize leaves. **Arch. Biochem. Biophys.** **307**, 416-419. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1609>

- Li, B., Chollet, R., 1994.** Salt induction and the partial purification/characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase from an inducible crassulacean-acid-metabolism (CAM) plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Arch. Biochem. Biophys** **314**, 247-254. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1437>
- Li, B., Pacquit, V., Jiao, J.A., Duff, S.M.G., Maralihalli, G.B., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Chollet, R., 1997.** Structural requirements for phosphorylation of C₄-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by its highly regulated protein-serine kinase. A comparative study with synthetic-peptide substrates and mutant target proteins. **Aust. J. Plant Physiol.** **24**, 443–449. <https://doi.org/10.1071/PP97009>
- Li, B., Zhang, X.Q., Chollet, R., 1996.** Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize. **Plant Physiol.** **111**, 497–505. <https://doi.org/10.1104/pp.111.2.497>
- Li, N., Meng, H., Xing, H., Liang, L., Zhao, X., Luo, K., 2017.** Genome-wide analysis of MATE transporters and molecular characterization of aluminum resistance in *Populus*. **J. Exp. Bot.** **68**, 5669–5683. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx370>
- Li, Y., Zhang, S., Jiang, W., Liu, D., 2013.** Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. **Environ. Sci. Pollut. Res.** **20**, 1117–1123. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1054-2>
- Li, Z., Gao, Q., Liu, Y., He, C., Zhang, X., Zhang, J., 2011.** Overexpression of transcription factor *ZmPTF1* improves low phosphate tolerance of maize by regulating carbon metabolism and root growth. **Planta** **233**, 1129–1143. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1368-1>
- Li, Z., Hu, J., Wu, Y., Wang, J., Song, H., Chai, M., Cong, L., Miao, F., Ma, L., Tang, W., Yang, C., Tao, Q., Zhong, S., Zhao, Y., Liu, H., Yang, G., Wang, Z., Sun, J., 2022.** Integrative analysis of the metabolome and transcriptome reveal the phosphate deficiency response pathways of alfalfa. **Plant Physiol. Biochem.** **170**, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.039>
- Liang, C., Wang, J., Zhao, J., Tian, J., Liao, H., 2014.** Control of phosphate homeostasis through gene regulation in crops. **Curr. Opin. Plant Biol.** **21**, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.06.009>
- Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., Kochian, L. V., 2006.** Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. **Plant Physiol.** **141**, 674–684. <https://doi.org/10.1104/pp.105.076497>
- Lichtenthaler, H.K., 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.** **148**, 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

- Lin, Z., Chen, L., Chen, R., Zhang, F., Jiang, H., Tang, N., 2009.** CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. **BMC Plant Biol.** **9**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/14712229943>
- Liu, C.A., Liang, M.Y., Nie, Y., Tang, J.W., Siddique, K.H.M., 2019.** The conversion of tropical forests to rubber plantations accelerates soil acidification and changes the distribution of soil metal ions in topsoil layers. **Sci. Total Environ.** **696**, 134082. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134082>
- Liu, G., Godwin, I.D., 2012.** Highly efficient sorghum transformation. **Plant Cell Rep.** **31**, 999–1007. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1218-4>
- Liu, J., Luo, X., Shaff, J., Liang, C., Jia, X., Li, Z., Magalhaes, J., Kochian, L. V., 2012a.** A promoter-swap strategy between the *AtALMT* and *AtMATE* genes increased Arabidopsis aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. **Plant J.** **71**, 327–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365313X.2012.04994.x>
- Liu, J., Qian, M., Cai, G., Zhu, Q., Wong, M.H., 2007.** Variations between rice cultivars in root secretion of organic acids and the relationship with plant cadmium uptake. **Environ. Geochem. Health** **29**, 189–195. <https://doi.org/10.1007/s10653-006-9063-z>
- Liu, T.Y., Huang T.K., Tseng C.Y., Lai Y.S., Lin S.I., Lin W.Y., Chen J.W., Chiou T.J., 2012b.** PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in Arabidopsis. **Plant cell** **24**, 2168–2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096636>
- Liu, X., Li, X., Zhang, C., Dai, C., Zhou, J., Ren, C., Zhang, J., 2017.** Phosphoenolpyruvate carboxylase regulation in C₄-PEPC-expressing transgenic rice during early responses to drought stress. **Physiol. Plant.** **159**, 178–200. <https://doi.org/10.1111/ppl.12506>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods** **25**, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Arredondo, D.L., Leyva-González, M.A., González-Morales, S.I., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., 2014.** Phosphate nutrition: Improving low-phosphate tolerance in crops. **Annu. Rev. Plant Biol.** **65**, 95–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035949>
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L., 2003.** The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Curr. Opin. Plant Biol.** **6**, 280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)

- López-Millán, A.F., Morales, F., Andaluz, S., Gogorcena, Y., Abadía, A., De Las Rivas, J., Abadía, J., 2000.** Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use? **Plant Physiol.** **124**, 885–897. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.885>
- López-Millán, A.F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., Abadía, J., 2009.** Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environ. Exp. Bot.** **65**, 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.11.010>
- Lu, L., Wu, X., Yin, X., Morrand, J., Chen, X., Folk, W.R., Zhang, Z.J., 2009.** Development of marker-free transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using standard binary vectors with bar as a selectable marker. **Plant Cell. Tissue Organ Cult.** **99**, 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9580-4>
- Lu, M., Wang, Z., Fu, S., Yang, G., Shi, M., Lu, Y., Wang, X., Xia, J., 2017.** Functional characterization of the *SbNrat1* gene in sorghum. **Plant Sci.** **262**, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.05.010>
- Lumbreras, V., Campos, N., Boronat, A., 1995.** The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* *HMG1* gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. **Plant J.** **8**, 541–549. <https://doi.org/10.1046/j.1365313X.1995.8040541.x>
- Lynch, J.P., Brown, K.M., 2001.** Topsoil foraging - An architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. **Plant Soil** **237**, 225–237. <https://doi.org/10.1023/A:1013324727040>
- Lynch, J.P., Ho, M.D., 2005.** Rhizoeconomics: Carbon costs of phosphorus acquisition. **Plant Soil** **269**, 45–56. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1096-4>
- Ma, J.F., 2000.** Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant Cell Physiol.** **41**, 383–390. <https://doi.org/10.1093/pcp/41.4.383>
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E., 2001a.** Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Sci.** **6**, 273–278. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01961-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01961-6)
- Ma, Z., Bielenberg, D.G., Brown, K.M., Lynch, J.P., 2001b.** Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. **Plant. Cell Environ.** **24**, 459–467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00695.x>
- Ma, Z., Wang, J., Li, C., Ren, P., Yao, L., Li, B., Meng, Y., Ma, X., Si, E., Yang, K., Shang, X., Wang, H., 2021.** Global profiling of phosphorylation reveals the barley roots response to phosphorus starvation and resupply. **Front. Plant Sci.** **12**, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.676432>

- MacDonald, G.K., Bennett, E.M., Potter, P.A., Ramankutty, N., 2011.** Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **108**, 3086–3091. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010808108>
- Mace, E.S., Tai, S., Gilding, E.K., Li, Y., Prentis, P.J., Bian, L., Campbell, B.C., Hu, W., Innes, D.J., Han, X., Cruickshank, A., Dai, C., Frère, C., Zhang, H., Hunt, C.H., Wang, X., Shatte, T., Wang, M., Su, Z., Li, J., Lin, X., Godwin, I.D., Jordan, D.R., Wang, J., 2013.** Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa's indigenous cereal crop sorghum. **Nat. Commun.** **4**, 2320 <https://doi.org/10.1038/ncomms3320>
- Magalhaes, J. V., Garvin, D.F., Wang, Y., Sorrells, M.E., Klein, P.E., Schaffert, R.E., Li, L., Kochian, L. V., 2004.** Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics** **167**, 1905–1914. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.023580>
- Magalhaes, J. V., Liu, J., Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Alves, V.M.C., Wang, Y.H., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N., Kochian, L. V., 2007.** A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (*MATE*) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nat. Genet.** **39**, 1156–1161. <https://doi.org/10.1038/ng2074>
- Malhotra, H., Vandana, Sharma, S., Pandey, R., 2018.** Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess, in: Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B. (Eds.), *Plant nutrients and abiotic stress tolerance*. Springer, Singapore, pp. 171–190. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8>
- Mamedov, T.G., Moellering, E.R., Chollet, R., 2005.** Identification and expression analysis of two inorganic C- and N-responsive genes encoding novel and distinct molecular forms of eukaryotic phosphoenolpyruvate carboxylase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant J.** **42**, 832–843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02416.x>
- Mancinelli, A.L., 1984.** Photoregulation of anthocyanin synthesis : VIII. Effect of light pretreatments. **Plant Physiol.** **75**, 447–53. <https://doi.org/10.1104/pp.75.2.447>
- Mancinelli, A.L., Ku, P. k., Susinno, R., 1974.** Photocontrol of anthocyanin synthesis. **J. Wash. Acad. Sci** **20**, 251–257.
- Maranville, J.W., 1970.** Influence of nickel on the detection of nitrate reductase activity in sorghum extracts. **Plant Physiol.** **45**, 591–593. <https://doi.org/10.1104/pp.45.5.591>
- Marschner, H., Römheld, V., 1994.** Strategies of plants for acquisition of iron. **Plant Soil** **165**, 261–274. <https://doi.org/10.1007/BF00008069>

- Matsumura, H., Xie, Y., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Ueno, Y., Izui, K., Kai, Y., 2002.** Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. **Structure** **10**, 1721–1730. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00913-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00913-9)
- Matsuoka, M., Yamamoto, N., 1989.** Induction of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate, orthophosphate dikinase in leaves of a C₃ plant exposed to light. **Plant Cell Physiol.** **30**, 479–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077766>
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000.** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **J. Exp. Bot.** **51**, 659–668. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.02.001>
- May, H.M., Nordstrom, D.K., 1991.** Assessing the solubilities and reaction kinetics of aluminous minerals in soils, in: B., U., Summer, M.E. (Eds.), Soil Acidity. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 125–148. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74442-6_6
- McCue, K.F., Hanson, A.D., 1990.** Drought and salt tolerance: towards understanding and application. **Trends Biotechnol.** **8**, 358–362. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90225-M](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90225-M)
- McLean, E.O., 1976.** Chemistry of soil aluminum. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** **7**, 619–636. <https://doi.org/10.1080/00103627609366672>
- McNaughton, G.A., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G., 1989.** Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochem. J.** **261**, 349–355. <https://doi.org/10.1042/bj2610349>
- Meda, A.R., Scheurmann, E.B., Prechsl, U.E., Erenoglu, B., Schaaf, G., Hayen, H., Weber, G., von Wirén, N., 2007.** Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. **Plant Physiol.** **143**, 1761–1773. <https://doi.org/10.1104/pp.106.094474>
- Meimoun, P., Gousset-Dupont, A., Lebouteiller, B., Ambard-Bretteville, F., Besin, E., Lelarge, C., Mauve, C., Hodges, M., Vidal, J., 2009.** The impact of PEPC phosphorylation on growth and development of *Arabidopsis thaliana*: Molecular and physiological characterization of PEPC kinase mutants. **FEBS Lett** **583**, 1649–1652. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.030>
- Melo, J.O., Martins, L.G.C., Barros, B.A., Pimenta, M.R., Lana, U.G.P., Duarte, C.E.M., Pastina, M.M., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E., Kochian, L. V., Fontes, E.P.B., Magalhaes, J. V., 2018.** Repeat variants for the *SbMATE* transporter protect sorghum roots from aluminum toxicity by transcriptional interplay in cis and trans. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **116**, 313–318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808400115>

- Milkereit, B., Starink, M.J., Rometsch, P.A., Schick, C., Kessler, O., 2019.** Review of the quench sensitivity of aluminium alloys: Analysis of the kinetics and nature of quench-induced precipitation. **Materials (Basel)** **12**, 4083–4175. <https://doi.org/10.3390/MA12244083>
- Miller G.L., 1959.** Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **J. Anal. Chem.** **31**, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Monreal, J.A., Arias-Baldrich, C., Pérez-Montaña, F., Gandullo, J., Echevarría, C., García-Mauriño, S., 2013a.** Factors involved in the rise of phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase activity caused by salinity in sorghum leaves. **Planta** **237**, 1401–1413. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1855-7>
- Monreal, J.A., Arias-Baldrich, C., Tossi, V., Feria, A.B., Rubio-Casal, A., García-Mata, C., Lamattina, L., García-Mauriño, S., 2013b.** Nitric oxide regulation of leaf phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase activity: Implication in sorghum responses to salinity. **Planta** **238**, 859–869. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1933-x>
- Monreal, J.A., Feria, A.B., Vinardell, J.M., Vidal, J., Echevarría, C., García-Mauriño, S., 2007a.** ABA modulates the degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in sorghum leaves. **FEBS Lett.** **581**, 3468–3472. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.055>
- Monreal, J.A., López-Baena, F.J., Vidal, J., Echevarría, C., García-Mauriño, S., 2010a.** Involvement of phospholipase D and phosphatidic acid in the light-dependent up-regulation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. **J. Exp. Bot.** **61**, 2819–2827. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq114>
- Monreal, J.A., López-Baena, F.J., Vidal, J., Echevarría, C., García-Mauriño, S., 2007b.** Effect of LiCl on phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf disks and leaves of *Sorghum vulgare*. **Planta** **225**, 801–812. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0391-0>
- Monreal, J.A., McLoughlin, F., Echevarría, C., García-Mauriño, S., Testerink, C., 2010b.** Phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ leaves is selectively targeted for inhibition by anionic phospholipids. **Plant Physiol.** **152**, 634–638. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150326>
- Moraes, T.F., Plaxton, W.C., 2000.** Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. Implications for phosphoenolpyruvate carboxylase regulation during phosphate starvation, and the integration of glycolysis with nitrogen assimilation. **Eur. J. Biochem.** **267**, 4465–4476. <https://doi.org/10.1046/j.14321327.2000.01495.x>

- Morales, M., Munné-Bosch, S., 2019. Malondialdehyde: facts and artifacts. **Plant Physiol.** **180**, 1246–1250. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B.D., Bläsing, O., Usadel, B., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Stitt, M., Scheible, W.R., 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. **Plant Cell Environ.** **30**, 85–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x>
- Müller, C., Scheible, W.R., Stitt, M., Krapp, A., 2001. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the *NIA* transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. **Plant Cell Environ.** **24**, 191–203. <https://doi.org/10.1046/j.13653040.2001.00664.x>
- Munns, R., Termaat, A., 1986. Whole-plant responses to salinity. **Aust. J. Plant Physiol.** **13**, 143–160. <https://doi.org/10.1071/PP9860143>
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.** **59**, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murmu, J., Plaxton, W.C., 2007. Phosphoenolpyruvate carboxylase protein kinase from developing castor oil seeds: Partial purification, characterization, and reversible control by photosynthate supply. **Planta** **226**, 1299–1310. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0551-x>
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Anal. Chim. Acta** **8**, 31–36. <https://doi.org/10.18393/ejss.477560>
- Nagayama, T., Nakamura, A., Yamaji, N., Satoh, S., Furukawa, J., Iwai, H., 2019. Changes in the distribution of pectin in root border cells under aluminum stress. **Front. Plant Sci.** **10**, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01216>
- Nakagawa, T., Izumi, T., Banba, M., Umehara, Y., Kouchi, H., Izui, K., Hata, S., 2003. Characterization and expression analysis of genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase of *Lotus japonicus*, a model legume. **Mol. Plant-Microbe Interact.** **16**, 281–288. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.4.281>
- Nakanishi, H., Ogawa, I., Ishimaru, Y., Mori, S., Nishizawa N.K., 2006. Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. **Soil Sci. Plant Nutr.** **52**, 464–469. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00055.x>
- Neumann, G., Römheld, V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. **Plant Soil** **211**, 121–130. <https://doi.org/10.1023/A:1004380832118>

- Neumann, G., Römheld, V., 2012.** Chapter 14: Rhizosphere chemistry in relation to plant nutrition, in: Marschner, P. (Ed.), Marschner's mineral nutrition of higher plants: Third Edition. Elsevier Ltd, pp. 347–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00014-5>
- Nguyen, T. Van, Thanh Thu, T., Claeys, M., Angenon, G., 2007.** Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. **Plant Cell. Tissue Organ Cult.** **91**, 155–164. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9228-1>
- Nhiri, M., Bakrim, N., Bakrim, N., El Hachimi-Messouak, Z., Echevarria, C., Vidal, J., 2000.** Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase during germination of sorghum seeds: Influence of NaCl and L-malate. **Plant Sci.** **151**, 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00191-0)
- Nimmo, G.A., McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G., 1987.** Changes in the kinetic properties and phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* leaves in response to light and dark. **FEBS Lett.** **213**, 18–22. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81457-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81457-6)
- Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., 1984.** Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Bryophyllum* leaves: a possible covalent modification. **FEBS Lett.** **178**, 199–203. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80600-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80600-6)
- Nimmo, H.G., 2000.** The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. **Trends Plant Sci.** **5**, 75–80. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01543-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01543-5)
- Nimmo, H.G., 2003.** Control of the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. **Arch. Biochem. Biophys.** **414**, 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00115-2)
- Nimmo, H.G., Fontaine, V., Hartwell, J., Jenkins, G.I., Nimmo, G.A., Wilkins, M.B., 2001.** PEP carboxylase kinase is a novel protein kinase controlled at the level of expression. **New Phytol.** **151**, 91–97. <https://doi.org/10.1046/j.14698137.2001.00155.x>
- Nishijo, M., Nakagawa, H., Suwazono, Y., Nogawa, K., Kido, T., 2017.** Causes of death in patients with Itai-itai disease suffering from severe chronic cadmium poisoning: A nested case-control analysis of a follow-up study in Japan. **BMJ Open** **7**, 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015694>
- Nishikido, T., Takanashi, H., 1973.** Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C₄ plants. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **53**, 126–133. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91410-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91410-1)
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M., 1995.** Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiol.** **109**, 735–742. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.735>

- Niyogi, K.K., 1999.** Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. **Annu. Rev. Plant Biol.** **50**, 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.333>
- Niyogi, K.K., 2000.** Safety valves for photosynthesis. **Curr. Opin. Plant Biol.** **3**, 455–460. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00113-8)
- Nocito, F.F., Espen, L., Crema, B., Cocucci, M., Sacchi, G.A., 2008.** Cadmium induces acidosis in maize root cells. **New Phytol.** **179**, 700–711. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02509.x>
- Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L., 2014.** The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends Plant Sci.** **19**, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.006>
- O’Kennedy, M.M., Grootboom, A., Shewry, P.R., 2006.** Harnessing sorghum and millet biotechnology for food and health. **J. Cereal Sci.** **44**, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.08.001>
- O’Leary, B., Fedosejevs, E.T., Hill, A.T., Bettridge, J., Park, J., Rao, S.K., Leach, C.A., Plaxton, W.C., 2011a.** Tissue-specific expression and post-translational modifications of plant and bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase isozymes of the castor oil plant, *Ricinus communis* L. **J. Exp. Bot.** **62**, 5485–5495. <https://doi.org/10.1093/jxb/err225>
- O’Leary, B., Park, J., Plaxton, W.C., 2011b.** The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs Title. **Biochem. J.** **436**, 15–34. <https://doi.org/10.1042/BJ20110078>
- O’Leary, B., Plaxton, W.C., 2020.** Multifaceted functions of post-translational enzyme modifications in the control of plant glycolysis. **Curr Opin Plant Biol** **55**, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.01.009>
- O’Leary, B., Rao, S.K., Kim, J., Plaxton, W.C., 2009.** Bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) functions as a catalytic and regulatory subunit of the novel class-2 PEPC complex of vascular plants. **J. Biol. Chem.** **284**, 24797–24805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022863>
- O’Leary, B., Rao, S.K., Plaxton, W.C., 2011c.** Phosphorylation of bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase at Ser425 provides a further tier of enzyme control in developing castor oil seeds. **Biochem. J.** **433**, 65–74. <https://doi.org/10.1042/BJ20101361>
- O’Leary, M.H., 1982.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist’s view. **Annu. Rev. Plant Physiol.** **33**, 297–315 <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.001501>
- Oaks, A., 1994.** Efficiency of nitrogen utilization in C₃ and C₄ cereals. **Plant Physiol.** **106**, 407–414. <https://doi.org/10.1104/pp.106.2.407>

- Ondrasek, G., Rengel, Z., 2021.** Environmental salinization processes: Detection, implications and solutions. **Sci. Total Environ.** **754**, 142432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142432>
- Orcutt D.M., Nilsen E.T., 2000.** Salinity stress. In: Physiology of plants under stress. Soil and biotic factors. Wiley, New York, pp 177–235.
- Osmond, C.B., 1978.** Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Annu. Rev. Plant Physiol.** **29**, 379–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002115>
- Osuna, L., Coursol, S., Pierre, J.N., Vidal, J., 2004.** A Ca²⁺-dependent protein kinase with characteristics of protein kinase C in leaves and mesophyll cell protoplasts from *Digitaria sanguinalis*: Possible involvement in the C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation cascade. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **314**, 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.103>
- Osuna, L., González, M.C., Cejudo, F.J., Vidal, J., Echevarría, C., 1996.** *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. **Plant Physiol.** **111**, 551–558. <https://doi.org/10.1104/pp.111.2.551>
- Osuna, L., Pierre, J.N., González, M.C., Alvarez, R., Cejudo, F.J., Echevarria, C., Vidal, J., 1999.** Evidence for a slow-turnover form of the Ca²⁺-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone-endosperm tissue of germinating barley seeds. **Plant Physiol.** **119**, 511–520. <https://doi.org/10.1104/pp.119.2.511>
- Outlaw, Jr., W.H., 1990.** Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochem. und Physiol. der Pflanz.** **186**, 317–325. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(11\)80224-6](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(11)80224-6)
- Pacquit, V., Giglioli, N., Crétin, C., Pierre, J.N., Vidal, J., Echevarria, C., 1995.** Regulatory phosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum: An immunological study using specific anti-phosphorylation site-antibodies. **Photosynth. Res.** **43**, 283–288. <https://doi.org/10.1007/BF00029941>
- Pacquit, V., Santi, S., Cretin, C., Bui, V.L., Vidal, J., Gadal, P., 1993.** Production and properties of recombinant C₃-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum vulgare*: *in vitro* phosphorylation by leaf and root PyrPC protein serine kinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **197**, 1415–1423. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2635>
- Pandey, R., Meena, S.K., Krishnapriya, V., Ahmad, A., Kishora, N., 2014.** Root carboxylate exudation capacity under phosphorus stress does not improve grain yield in green gram. **Plant Cell Rep.** **33**, 919–928. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1570-2>

- Park, J., Khuu, N., Howard, A.S.M., Mullen, R.T., Plaxton, W.C., 2012.** Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase isozymes from developing castor oil seeds interact *in vivo* and associate with the surface of mitochondria. **Plant J.** **71**, 251–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04985.x>
- Paterson, A.H., 2008.** Genomics of sorghum. **Int. J. Plant Genomics** **2008**, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2008/362451>
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A.K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I. V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Ojilliar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob-Ur-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J., Rokhsar, D.S., 2009.** The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature** **457**, 551–556. <https://doi.org/10.1038/nature07723>
- Paulus, J.K., Schlieper, D., Groth, G., 2013.** Greater efficiency of photosynthetic carbon fixation due to single amino-acid substitution. **Nat. Commun.** **4**, 4–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms2504>
- Paz-Ares, J., Puga, M.I., Rojas-Triana, M., Martínez-Hevia, I., Díaz, S., Poza-Carrión, C., Miñambres, M., Leyva, A., 2022.** Plant adaptation to low phosphorus availability: core signaling, crosstalks, and applied implications. **Mol. Plant** **15**, 104–124. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.005>
- Peng, Y., Cai, J., Wang, W., Su, B., 2012.** Multiple inter-kingdom horizontal gene transfers in the evolution of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene family. **PLoS One** **7**, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051159>
- Peng, Z., Tian, J., Luo, R., Kang, Y., Lu, Y., Hu, Y., Liu, N., Zhang, J., Cheng, H., Niu, S., Zhang, J., Yao, Y., 2020.** MiR399d and epigenetic modification comodule anthocyanin accumulation in *Malus* leaves suffering from phosphorus deficiency. **Plant Cell Environ.** **43**, 1148–1159. <https://doi.org/10.1111/pce.13697>
- Peñaloza, E., Muñoz, G., Salvo-Garrido, H., Silva, H., Corcuera, L.J., 2005.** Phosphate deficiency regulates phosphoenolpyruvate carboxylase expression in proteoid root clusters of white lupin. **J. Exp. Bot.** **56**, 145–153. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri008>
- Pérez-López, J., de la Osa, C., Gandullo, J., Ferial, A-B, García-Mauriño, S., Monreal, J. A., 2021b.** RNAi silencing of *SbPPC3*, a non-photosynthetic PEPC, influences sorghum responses to phosphate deficiency. Poster in Plant Biology Europe 2021 online congress; 28 June – 1 July 2021 in Turin, p534.

- Pérez-López, J., de la Osa, C., Gandullo, J., Monreal, J. A., García-Mauriño, S., 2021a.** Cadmium effects on RNAi *SbPPC3* silenced sorghum lines. Oral communication in XVII Hispano-Portuguese Plant Physiology Online Congress; 7-8 July 2021 in Vigo, p284.
- Pérez-López, J., Sáez, T., de la Osa, C., Baena, G., Echevarria, C., Monreal, J. A., García-Mauriño, S., 2019.** Aluminium effects on RNAi *SbPPC3* silenced sorghum lines. Poster in XVI Hispano-Portuguese Plant Physiology Congress; 26-28 June 2019 in Pamplona, p180.
- Pierre, J.N., Pacquit, V., Vidal, J., Gadal, P., 1992.** Regulatory phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from sorghum mesophyll cells and the role of pH and Ca²⁺ as possible components of the light-transduction pathway. **Eur. J. Biochem.** **210**, 531–537. <https://doi.org/10.1111/j.14321033.1992.tb17451.x>
- Pilbeam, D.J., Cakmak, I., Marschner, H., Kirkby, E.A., 1993.** Effect of withdrawal of phosphorus on nitrate assimilation and PEP carboxylase activity in tomato. **Plant Soil** **154**, 111–117. <https://doi.org/10.1007/BF00011079>
- Pinheiro Junior, C.R., Pereira, M.G., de Souza O. Filho, J., Beutler, S.J., 2019.** Can topography affect the restoration of soil properties after deforestation in a semiarid ecosystem? **J. Arid Environ.** **162**, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2018.11.004>
- Plaxton, W.C., O’Leary, B., 2012.** The central role of phosphoenolpyruvate metabolism in developing oilseeds, in: Agrawal, G., Rakwal, R. (Eds.), Seed development OMICS technologies toward improvement of seed quality and crop yield. Springer, Dordrecht, pp. 279–301. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-4749-4_15
- Plaxton, W.C., Podestá, F.E., 2006.** The functional organization and control of plant respiration. **Crit. Rev. Plant Sci.** **25**, 159–198. <https://doi.org/10.1080/07352680600563876>
- Plaxton, W.C., Tran, H.T., 2011.** Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. **Plant Physiol.** **156**, 1006–1015. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175281>
- Plénet, D., Mollier, A., Pellerin, S., 2000.** Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. II. Radiation-use efficiency, biomass accumulation and yield components. **Plant Soil** **224**, 259–272. <https://doi.org/10.1023/A:1004835621371>
- Popova, L.P., Stoinova, Z.G., Maslenkova, L.T., 1995.** Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. **J. Plant Growth Regul.** **14**, 211–218. <https://doi.org/10.1007/BF00204914>

- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986.** The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry** **25**, 223-230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J., 2008.** A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Sci. Total Environ.** **400**, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.003>
- Prity, S.A., El-Shehawi, A.M., Elseehy, M.M., Tahura, S., Kabir, A.H., 2021.** Early-stage iron deficiency alters physiological processes and iron transporter expression, along with photosynthetic and oxidative damage to sorghum. **Saudi J. Biol. Sci.** **28**, 4770–4777. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.092>
- Qian, B., Li, X., Liu, X., Chen, P., Ren, C., Dai, C., 2015.** Enhanced drought tolerance in transgenic rice over-expressing of maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene via NO and Ca²⁺. **J. Plant Physiol.** **175**, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.09.019>
- Raboy, V., 2009.** Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science** **177**, 281–296. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.012>
- Raghothama, K.G., Karthikeyan, A.S., 2005.** Phosphate acquisition. **Plant Soil** **274**, 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-2005-6>
- Rajagopalan, A. V., Agarwal, R.M., Raghavendra, A.S., 2004.** Modulation *in vivo* by nitrate salts of the activity and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of *Alternanthera pungens* (C₄ plant) and *A. sessilis* (C₃ species). **Photosynthetica** **42**, 345–349. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000046151.97327.b2>
- Rausser, W.E., 1999.** Structure and function of metal chelators produced by plants: The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. **Cell Biochem. Biophys.** **31**, 19–38. <https://doi.org/10.1007/BF02738153>
- Reddy, P.S., 2019.** Breeding for abiotic stress resistance in sorghum, in: Aruna, C., Visarada, K.B.R.S., Venkatesh Bhat, B., Vilas, A. (Eds.), Breeding sorghum for diverse end uses. Woodhead Publishing, pp. 325–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101879-8.00020-6>
- Reinds, G.J., Posch, M., Leemans, R., 2009.** Modelling recovery from soil acidification in European forests under climate change. **Sci. Total Environ.** **407**, 5663–5673. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.07.013>
- Reuss, J.O., Cosby, B.J., Wright, R.F., 1987.** Chemical processes governing soil and water acidification. **Nature** **329**, 27–32. <https://doi.org/10.1038/329027a0>

- Riaz, M., Yan, L., Wu, X., Hussain, S., Aziz, O., Jiang, C., 2018. Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: A review. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **165**, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.087>
- Rivoal, J., Turpin, D.H., Plaxton, W.C., 2002. *In vitro* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*. **Plant Cell Physiol.** **43**, 785–792. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf092>
- Rodríguez-Penagos, M., Muñoz-Clares, R.A., 1999. Response of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves to moderate water deficit. **J. Plant Physiol.** **155**, 631–638. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80065-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80065-0)
- Roy, S.J., Negrão, S., Tester, M., 2014. Salt resistant crop plants. **Curr. Opin. Biotechnol.** **26**, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.004>
- Ruiz-Ballesta, I., Baena, G., Gandullo, J., Wang, L., She, Y.M., Plaxton, W.C., Echevarría, C., 2016. New insights into the post-translational modification of multiple phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes by phosphorylation and monoubiquitination during sorghum seed development and germination. **J. Exp. Bot.** **67**, 3523–3536. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw186>
- Ruiz-Ballesta, I., Feria, A.B., Ni, H., She, Y.M., Plaxton, W.C., Echevarría, C., 2014. *In vivo* monoubiquitination of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase occurs at Lys624 in germinating sorghum seeds. **J. Exp. Bot.** **65**, 443–451. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert386>
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D.L., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annu. Rev. Plant Biol. Plant Mol. Biol.** **52**, 527–560.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W.J., Delhaize, E., 2009. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiol.** **149**, 340–351. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129155>
- Sage, R.F., Sage, T.L., Kocacinar, F., 2012. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis. **Annu. Rev. Plant Biol.** **63**, 19–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105511>
- Sako, Y., Takai, K., Nishizaka, T., Ishida, Y., 1997. Biochemical relationship of phosphoenolpyruvate carboxylases (PEPCs) from thermophilic archaea. **FEMS Microbiol. Lett.** **153**, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00253-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00253-X)
- Sako, Y., Takai, K., Uchida, A., Ishida, Y., 1996. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus sociabilis*. **FEBS Lett.** **392**, 148–152. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00805-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00805-8)

- Sánchez, A.J., Sienra, A., Ruíz-López, N., Echevarría, C., Feria, A.B., 2015.** Grain production and quality in *A. thaliana* lines with T-DNA insertion in gene coding PEPC and PPCK. Poster in XIV Hispano-Portuguese Plant Physiology Congress; 14-17 June 2015; Toledo, España.
- Sánchez, R., Cejudo, F.J., 2003.** Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiol.** **132**, 949–957. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019653>
- Sánchez, R., Flores, A., Cejudo, F.J., 2006.** *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. **Planta** **223**, 901–909. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0144-5>
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999.** Response to cadmium in higher plants. **Environ Exp Bot** **41**, 105–130. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6)
- Sankhla, N., Huber, W., 1975.** Regulation of balance between C₃ and C₄ pathway: Role of abscisic acid. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie** **74**, 267–271. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(75\)80172-3](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(75)80172-3)
- Sarasketa, A., González-Moro, M.B., González-Murua, C., Marino, D., 2014.** Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. **J. Exp. Bot.** **65**, 6023–6033. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru342>
- Sasaki, T., Horiguchi, H., Arakawa, A., Oguma, E., Komatsuda, A., Sawada, K., Murata, K., Yokoyama, K., Matsukawa, T., Chiba, M., Omori, Y., Kamikomaki, N., 2019.** Hospital-based screening to detect patients with cadmium nephropathy in cadmium-polluted areas in Japan. **Environ. Health Prev. Med.** **24**, 2–9. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0762-3>
- Sato, S., Clemente, T., Dweikat, I., 2004.** Identification of an elite sorghum genotype with high in vitro performance capacity. **Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant** **40**, 57–60. <https://doi.org/10.1079/IVP2003475>
- Saze, H., Ueno, Y., Hisabori, T., Hayashi, H., Izui, K., 2001.** Thioredoxin-mediated reductive activation of a protein kinase for the regulatory phosphorylation of C₄-form phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. **Plant Cell Physiol.** **42**, 1295–1302. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce182>
- Schreiber, H.D., Swink, A.M., Godsey, T.D., 2010.** The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. **J. Inorg. Biochem.** **104**, 732–739. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.03.006>
- Schuller, K.A., Werner, D., 1993.** Phosphorylation of soybean (*Glycine max* L.) nodule phosphoenolpyruvate carboxylase in vitro decreases sensitivity to inhibition by L-malate. **Plant Physiol.** **101**, 1267–1273. <https://doi.org/10.1104/pp.101.4.1267>

- Shahid, S.A., Zaman, M., Heng, L., 2018.** Soil salinity: Historical perspectives and a world overview of the problem, in: *Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques*. Springer, Cham, pp. 43–53. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3>
- Shane, M.W., Fedosejevs, E.T., Plaxton, W.C., 2013.** Reciprocal control of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* monoubiquitination and phosphorylation in developing proteoid roots of phosphate-deficient harsh hakea. **Plant Physiol.** **161**, 1634–1644. <https://doi.org/10.1104/pp.112.213496>
- Shen, H., Chen, J., Wang, Z., Yang, C., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Yan, X., 2006.** Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. **J. Exp. Bot.** **57**, 1353–1362. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj111>
- Shenton, M., Fontaine, V., Hartwell, J., Marsh, J.T., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 2006.** Distinct patterns of control and expression amongst members of the PEP carboxylase kinase gene family in C₄ plants. **Plant J.** **48**, 45–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02850.x>
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 1996.** Molecular responses to drought and cold stress. **Curr. Opin. Biotechnol.** **7**, 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80007-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80007-3)
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997.** Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiol.** **115**, 327–334. <https://doi.org/10.1104/pp.115.2.327>
- Silva, S., 2012.** Aluminium toxicity targets in plants. **J. Bot.** **2012**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/219462>
- Sima, B.D., Desjardins, Y., 2001.** Sucrose supply enhances phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation level *in vitro* *Solanum tuberosum*. **Plant Cell. Tissue Organ Cult.** **67**, 235–242. <https://doi.org/10.1023/A:1012787507223>
- Singh, S.K., Reddy, V.R., 2014.** Combined effects of phosphorus nutrition and elevated carbon dioxide concentration on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, and nutrient efficiency of cotton. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** **177**, 892–902. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400117>
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology** **299**, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S00766879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S00766879(99)99017-1)
- Sivaguru, M., Liu, J., Kochian, L. V., 2013.** Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. **Plant Journal** **76**, 297–307. <https://doi.org/10.1111/tpj.12290>

- Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A.K., Stephanou, E.G., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2006.** Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **Plant Cell** **18**, 2767-2781. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038323>
- Stahl, T., Taschan, H., Brunn, H., 2011.** Aluminium content of selected foods and food products. **Environ. Sci. Eur.** **23**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-37>
- Steffens, B., Rasmussen, A., 2016.** The physiology of adventitious roots. **Plant Physiol.** **170**, 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>
- Stiborová, M., Leblová, S., 1985.** Heavy metal inactivation of maize (*Zea mays* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes. **Photosynthetica** **19**, 177–182.
- Stiborová, M., Leblová, S., 1986.** Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. **FEBS Lett.** **205**, 32–34. [https://doi.org/10.1016/00145793\(86\)80860-2](https://doi.org/10.1016/00145793(86)80860-2)
- Su, C., Jiang, L., Zhang, W., 2014.** A review on heavy metal contamination in the soil worldwide : Situation , impact and remediation techniques 3, 24–38.
- Su, C., Jiang, Y., Yang, Y., Zhang, W., Xu, Q., 2019.** Responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to aluminum stress: Physiological and proteomics analyses. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **170**, 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.113>
- Sullivan, S., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 2004.** Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean. **Plant Physiol.** **135**, 2078–2087. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042762>
- Sun, P., Tian, Q.Y., Chen, J., Zhang, W.H., 2010.** Aluminium-induced inhibition of root elongation in Arabidopsis is mediated by ethylene and auxin. **J. Exp. Bot.** **61**, 347–356. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp306>
- Svensson, P., Bläsing, O.E., Peter, W., 2003.** Evolution of C₄ phosphoenol pyruvate carboxylase. **Arch. Biochem. Biophys.** **414**, 180–188. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00165-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00165-6)
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F.M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., 2010.** Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. **Trends Plant Sci.** **15**, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.006>
- Tang, J., Zhang, J., Ren, L., Zhou, Y., Gao, J., Luo, L., Yang, Y., Peng, Q., Huang, H., Chen, A., 2019.** Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. **J. Environ. Manage.** **242**, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.061>

- Tari, I., Laskay, G., Takács, Z., Poór, P., 2013.** Response of sorghum to abiotic stresses: A review. **J. Agron. Crop Sci.** **199**, 264–274. <https://doi.org/10.1111/jac.12017>
- Taybi, T., Patil, S., Chollet, R., Cushman, J.C., 2000.** A minimal serine/threonine protein kinase circadianly regulates phosphoenolpyruvate carboxylase activity in crassulacean acid metabolism-induced leaves of the common ice plant. **Plant Physiol.** **123**, 1471–1482. <https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1471>
- Taylor, J.R.N., Schober, T.J., Bean, S.R., 2006.** Novel food and non-food uses for sorghum and millets. **J. Cereal Sci.** **44**, 252–271. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.009>
- Terada, K., Kai, T., Okuno, S., Fujisawa, H., Izui, K., 1990.** Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Phosphorylation of Ser15 with a mammalian cyclic AMP-dependent protein kinase diminishes sensitivity to malate. **FEBS Letters** **259**, 241–244. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80018-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80018-E)
- Testerink, C., Dekker, H.L., Lim, Z.Y., Johns, M.K., Holmes, A.B., De Koster, C.G., Ktistakis, N.T., Munnik, T., 2004.** Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. **Plant J.** **39**, 527–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02152.x>
- Testerink, C., Munnik, T., 2005.** Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. **Trends Plant Sci.** **10**, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.06.002>
- Thomas, M., Cretin, C., Vidal, J., Keryer, E., Gadal, P., Monsinger, E., 1990.** Light-regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase mRNA in leaves of C₄ plants: Evidence for phytochrome control on transcription during greening and for rhythmicity. **Plant Sci.** **69**, 65–78. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90105-W](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90105-W)
- Thuynsma, R., Kleinert, A., Kossmann, J., Valentine, A.J., Hills, P.N., 2016.** The effects of limiting phosphate on photosynthesis and growth of *Lotus japonicus*. **S. African J. Bot.** **104**, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.001>
- Tian, D., Niu, S., 2015.** A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. **Environ. Res. Lett.** **10**, 24019. <https://doi.org/10.1088/17489326/10/2/024019>
- Ting, M.K.Y., She, Y.M., Plaxton, W.C., 2017.** Transcript profiling indicates a widespread role for bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase in malate-accumulating sink tissues. **J. Exp. Bot.** **68**, 5857–5869. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx399>
- Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S., Cakmak, I., 2006.** Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. **J. Trace Elem. Med. Biol.** **20**, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.12.004>

- Tocquin, P., Corbesier, L., Havelange, A., Pieltain, A., Kurtem, E., Bernier, G., Périlleux, C., 2003.** A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biol.** **3**, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-2>
- Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M.R., Montanarella, L., 2016a.** Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environ. Int.** **88**, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>
- Tóth, G., Hermann, T., Szatmári, G., Pásztor, L., 2016b.** Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. **Sci. Total Environ.** **565**, 1054–1062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.115>
- Touraine, B., Muller, B., Grignon, C., 1992.** Effect of phloem-translocated malate on NO_3^- uptake by roots of intact soybean plants. **Plant Physiol.** **99**, 1118–1123. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1118>
- Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R.A., 2000.** Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol.** **123**, 149–160. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.149>
- Toyota, K., Koizumi, N., Sato, F., 2003.** Transcriptional activation of phosphoenolpyruvate carboxylase by phosphorus deficiency in tobacco. **J. Exp. Bot.** **54**, 961–969. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg095>
- Tripodi, K.E., Turner, W.L., Gennidakis, S., Plaxton, W.C., 2005.** *In vivo* regulatory phosphorylation of novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in endosperm of developing castor oil seeds. **Plant Physiol.** **139**, 969–978. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066647>
- Ueno, Y., Hata, S., Izui, K., 1997.** Regulatory phosphorylation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase: Role of a conserved basic residue upstream of the phosphorylation site. **FEBS Lett.** **417**, 57–60. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01254-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01254-4)
- Uhde-Stone, C., Gilbert, G., Johnson, J.M.F., Litjens, R., Zinn, K.E., Temple, S.J., Vance, C.P., Allan, D.L., 2003.** Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. **Plant Soil** **248**, 99–116. <https://doi.org/10.1023/A:1022335519879>
- Uhrig, R.G., O’Leary, B., Spang, H.E., MacDonald, J.A., She, Y.M., Plaxton, W.C., 2008a.** Coimmunopurification of phosphorylated bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases with the plastidial pyruvate dehydrogenase complex from developing castor oil seeds. **Plant Physiol.** **146**, 1346–1357. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110361>

- Uhrig, R.G., She, Y.M., Leach, C.A., Plaxton, W.C., 2008b. Regulatory monoubiquitination of phosphoenolpyruvate carboxylase in germinating castor oil seeds. *J. Biol. Chem.* **283**, 29650–29657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806102200>
- UNEP, 2010. Final review of scientific information on cadmium. United Nations Environ. Program. pp.324.
- Ur Rahman, S., Xuebin, Q., Kamran, M., Yasin, G., Cheng, H., Rehim, A., Riaz, L., Rizwan, M., Ali, S., Alsahli, A.A., Alyemeni, M.N., 2021. Silicon elevated cadmium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by endorsing nutrients uptake and antioxidative defense mechanisms in the leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **166**, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.038>
- Uraguchi, S., Fujiwara, T., 2013. Rice breaks ground for cadmium-free cereals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.03.012>
- Usuda, H. Shimogawara, K., 1992. Phosphate deficiency in maize: III. Changes in enzyme activities during the course of phosphate deprivation. *Plant Physiol.* **99**, 1680–1685. . <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1680>
- Van Quy, L., Foyer, C., Champigny, M.L., 1991. Effect of light and NO³⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity: Evidence for covalent modulation of the C₃ enzyme. *Plant Physiol.* **97**, 1476–1482. <https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1476>
- Van Zelm, E., Zhang, Y., Testerink, C., 2020. Salt tolerance mechanisms of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **71**, 403–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>
- Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S., Gantt, J.S., 1994. Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* **101**, 51–64. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90164-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90164-3)
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **157**, 423–447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>
- Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., Kim, H., Cross, J., Morreel, K., Araujo, P., Welsh, L., Hastraete, J., McClellan, C., Vanholme, B., Ralph, J., Simpson, G.G., Haplin, C., Boerjan, W., 2013. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science* **341**, 1103–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1241602>
- Vega-Mas, I., Cukier, C., Coletto, I., González-Murua, C., Limami, A.M., González-Moro, M.B., Marino, D., 2019. Isotopic labelling reveals the efficient adaptation of wheat root TCA cycle flux modes to match carbon demand under ammonium nutrition. *Sci. Rep.* **9**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45393-8>

- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009.** Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** **12**, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.001>
- Verma, A., Nain, V., Kumari, C., Singh, S.K., Narasu, M.L., Kumar, P.A., 2008.** Tissue specific response of *Agrobacterium tumefaciens* attachment to *Sorghum bicolor* (L) Moench. **Physiol. Mol. Biol. Plants** **14**, 307–313. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0028-9>
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K., 2006.** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant J.** **45**, 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- Vidal, J., Bakrim, N., Hodges, M., 2002.** The regulation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation, in: Foyer, C.H., Noctor, G. (Eds.), Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-48138-3_9
- Vidal, J., Chollet, R., 1997.** Regulatory phosphorylation of C₄ PEP carboxylase. **Trends Plant Sci.** **2**, 230–237. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)89548-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89548-9)
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981.** Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta** **153**, 376–387. <https://doi.org/10.1007/BF00384257>
- Von Uexküll, H.R., Mutert, E., 1995.** Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil** **171**, 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF00009558>
- Wahid, A., Ghani, A., Javed, F., 2008.** Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. **Agron. Sustain. Dev.** **28**, 273–280. <https://doi.org/10.1051/agro:2008010>
- Wairich, A., de Oliveira, B.H.N., Arend, E.B., Duarte, G.L., Ponte, L.R., Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Fett, J.P., 2019.** The combined strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). **Sci. Rep.** **9**, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52502-0>
- Walker, G.H., Ku, M.S.B., Edwards, G.E., 1986.** Activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to tautomerization and nonenzymatic decarboxylation of oxaloacetate. **Arch. Biochem. Biophys.** **248**, 489–501. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90502-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90502-3)
- Wallihan, E.F., 1948.** The influence of aluminum on the phosphorus nutrition of plants. **Am. J. Bot.** **35**, 106–112.

- Wang, H., Ji, F., Zhang, Y., Hou, J., Liu, W., Huang, J., Liang, W., 2019a. Interactions between hydrogen sulphide and nitric oxide regulate two soybean citrate transporters during the alleviation of aluminium toxicity. **Plant Cell Environ.** **42**, 1–17. <https://doi.org/10.1111/pce.13555>
- Wang, J., Yang, Y., Liao, L., Xu, J., Liang, X., Liu, W., 2019b. Genome-wide identification and functional characterization of the phosphate transporter gene family in sorghum. **Biomolecules** **9**, 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom9110670>
- Wang, L., Liu, D., 2018. Functions and regulation of phosphate starvation-induced secreted acid phosphatases in higher plants. **Plant Sci.** **271**, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.013>
- Wang, N., Zhong, X., Cong, Y., Wang, T., Yang, S., Li, Y., Gai, J., 2016. Genome-wide analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase gene family and their response to abiotic stresses in soybean. **Sci. Rep.** **6**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep38448>
- Wang, X., Gowik, U., Tang, H., Bowers, J.E., Westhoff, P., Paterson, A.H., 2009. Comparative genomic analysis of C₄ photosynthetic pathway evolution in grasses. **Genome Biol.** **10**, R68. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r68>
- Wang, Y.H., Chollet, R., 1993. *In vitro* phosphorylation of purified tobacco-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **FEBS Lett.** **328**, 215–218. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80995-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80995-7)
- Wang, Y.H., Duff, S.M.G., Lepiniec, L., Cretin, C., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadat, P., Chollet, R., 1992. Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (Ser8) in C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. The effect of negative charge at position 8. **J. Biol. Chem.** **267**, 16759–16762.
- Wang, W., Xie, Y., Liu L., King, J.K., White, P., Ding, G., Wang S., Cai, H., Wang, C., Xu, F., Shi L., 2022. Genetic control of seed phytate accumulation and the development of low-phytate crops: a review and perspective. **J. Agric. Food Chem.** **70**, 3375–3390. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06831>
- Watanabe, T., Osaki, M., Yoshihara, T., Tadano, T., 1998. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. **Plant Soil** **201**, 165–173. <https://doi.org/10.1023/A:1004341415878>
- Westhoff, P., Gowik, U., 2004. Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: A case study with the genus *Flaveria*. **Ann. Bot.** **93**, 13–23. <https://doi.org/10.1093/aob/mch003>
- WHO, 1998. Aluminium in drinking-water background, in: Guidelines for drinking-water quality, 2nd Ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.

- Willeford, K.O., Wu, M.X., Meyer, C.R., Wedding, R.T., 1990.** The role of oligomerization in regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Influence of Mg-PEP and malate on the oligomeric equilibrium of PEP carboxylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **168**, 778–785. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)92389-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92389-H)
- Willick, I.R., Plaxton, W.C., Lolle, S.J., Macfie, S.M., 2019.** Transcriptional and post-translational upregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Arabidopsis thaliana* (L. Heynh) under cadmium stress. **Environ. Exp. Bot.** **164**, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.04.018>
- Wu, E., Lenderts, B., Glassman, K., Berezowska-Kaniewska, M., Christensen, H., Asmus, T., Zhen, S., Chu, U., Cho, M.J., Zhao, Z.Y., 2014.** Optimized *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. **Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant** **50**, 9–18. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9583-z>
- Xie, Y., Mao, Y., Duan, X., Zhou, H., Lai, D., Zhang, Y., Shen, W., 2016.** Arabidopsis HY1-modulated stomatal movement: An integrative hub is functionally associated with ABI4 in dehydration-induced ABA responsiveness. **Plant Physiol.** **170**, 1699–1713. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01550>
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K., 2002.** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell** **14**, 165–183. <https://doi.org/10.1105/tpc.000596>
- Xu, H.X., Weng, X.Y., Yang, Y., 2007.** Effect of phosphorus deficiency on the photosynthetic characteristics of rice plants. **Russ. J. Plant Physiol.** **54**, 741–748. <https://doi.org/10.1134/S1021443707060040>
- Xu, N., Chu, Y., Chen, H., Li, X., Wu, Q., Jin, L., Wang, G., Huang, J., 2018a.** Rice transcription factor *OsMADS25* modulates root growth and confers salinity tolerance via the ABA-mediated regulatory pathway and ROS scavenging. **PLoS Genet.** **14**, 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007662>
- Xu, L., Liu, C., Cui, B., Wang, N., Zhao, Z., Zhou, L., Huang, K., Ding, J., Du, H., Jiang, W., Zhang, S., 2018b.** Transcriptomic responses to aluminum (Al) stress in maize. **J. Integr. Agric.** **17**, 1946–1958. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61832-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61832-X)
- Xu, W., Ahmed, S., Moriyama, H., Chollet, R., 2006.** The importance of the strictly conserved, C-terminal glycine residue in phosphoenolpyruvate carboxylase for overall catalysis: Mutagenesis and truncation of GLY-961 in the sorghum C4 leaf isoform. **J. Biol. Chem.** **281**, 17238–17245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602299200>
- Yadav, R., Tarafdar, J., 2001.** Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. **Biol. Fertil. Soils** **34**, 140–143. <https://doi.org/10.1007/s003740100376>

- Yamamoto, N., Masumura, T., Yano, K., Sugimoto, T., 2019.** Pattern analysis suggests that phosphoenolpyruvate carboxylase in maturing soybean seeds promotes the accumulation of protein. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** **83**, 2238–2243. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1648205>
- Yan, F., Zhu, Y., Müller, C., Zörb, C., Schubert, S., 2002.** Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiol.** **129**, 50–63. <https://doi.org/10.1104/pp.010869>
- Yang, L.T., Jiang, H.X., Qi, Y.P., Chen, L.S., 2012.** Differential expression of genes involved in alternative glycolytic pathways, phosphorus scavenging and recycling in response to aluminum and phosphorus interactions in *Citrus* roots. **Mol. Biol. Rep.** **39**, 6353–6366. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1457-7>
- Yang, L.T., Liu, J.W., Wu, Y.M., Qi, Y.P., Wang, J.L., Lai, N.W., Ye, X., Chen, L.S., 2018.** Proteome profile analysis of boron-induced alleviation of aluminum-toxicity in *Citrus grandis* roots. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **162**, 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.028>
- Yang, Z.M., Nian, H., Sivaguru, M., Tanakamaru, S., Matsumoto, H., 2001.** Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*) plants. **Physiol. Plant.** **113**, 64–71. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130109.x>
- Yang, Z.M., Sivaguru, M., Horst, W.J., Matsumoto, H., 2000.** Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.** **110**, 72–77. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110110.x>
- Yeo, A., 1998.** Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **J. Exp. Bot.** **49**, 915–929. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.323.915>
- Yoshihara, T., Hodoshima, H., Miyano, Y., Shoji, K., Shimada, H., Goto, F., 2006.** Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. **Plant Cell Rep.** **25**, 365–373. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0092-3>
- You, J., Zhang, H., Liu, N., Gao, L., Kong, L., Yang, Z., Gustafson, P., 2011.** Transcriptomic responses to aluminum stress in soybean roots. **Genome** **54**, 923–933. <https://doi.org/10.1139/g11-060>
- Yuan, Z., Luo, T., Liu, X., Hua, H., Zhuang, Y., Zhang, X., Zhang, L., Zhang, Y., Xu, W., Ren, J., 2019.** Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. **Sci. Total Environ.** **676**, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.250>
- Yun, S.J., Kaeppler, S.M., 2001.** Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. **Plant Soil** **237**, 109–115. <https://doi.org/10.1023/A:1013329430212>

- Zhan, Y. hua, Zhang, C. hao, Zheng, Q. xun, Huang, Z. an, Yu, C. liang, 2017.** Cadmium stress inhibits the growth of primary roots by interfering auxin homeostasis in *Sorghum bicolor* seedlings. **J. Plant Biol.** **60**, 593–603. <https://doi.org/10.1007/s12374-017-0024-0>
- Zhang, D., Song, H., Cheng, H., Hao, D., Wang, H., Kan, G., Jin, H., Yu, D., 2014.** The acid phosphatase-encoding gene *GmACPI* contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress. **PLoS Genet.** **10**, 8–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004061>
- Zhang, G., Fukami, M., Sekimoto, H., 2002.** Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. **F. Crop. Res.** **77**, 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00061-8)
- Zhang, J., Jiang, F., Shen, Y., Zhan, Q., Bai, B., Chen, W., Chi, Y., 2019.** Transcriptome analysis reveals candidate genes related to phosphorus starvation tolerance in sorghum. **BMC Plant Biol** **19**, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1914-8>
- Zhang, J. Nguyen, H.T., Blum, A., 1999.** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **J. Exp. Bot.** **50**, 291-302. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.332.291>
- Zhang, R., Liu, G., Wu, N., Gu, M., Zeng, H., Zhu, Y., Xu, G., 2011.** Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase and H⁺-pump to P deficiency in rice roots. **Plant Soil** **349**, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0774-2>
- Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y., Wang, X., 2005.** Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids** **1736**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.07.004>
- Zhang, X.Q., Chollet, R., 1997.** Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a Ca²⁺-dependent protein kinase. **FEBS Lett.** **410**, 126–130. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00537-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00537-1)
- Zhang, X.Q., Li, B., Chollet, R., 1995.** *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol.** **108**, 1561–1568. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1561>
- Zhou, Y., Yang, Z., Xu, Y., Sun, H., Sun, Z., Lin, B., Sun, W., You, J., 2018.** Soybean NADP-malic enzyme functions in malate and citrate metabolism and contributes to their efflux under Al stress. **Front. Plant Sci.** **8**, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02246>
- Zhu, J., 2016.** Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell** **167**, 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>.Abiotic

Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** **53**, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

Zhu, J.K., 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Curr. Opin. Plant Biol.** **6**, 441–445. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00085-2)

AGRADECIMIENTOS

Largo ha sido el camino que me ha conducido hasta aquí. Hace ya mucho tiempo decidí estudiar el grado en biotecnología, yo no sabía qué era una tesis ni un doctorado... Pasó el tiempo, acabé el grado, seguía sin saber que era. Cambié de universidad y acabé haciendo mi trabajo de fin de máster en el área de Fisiología Vegetal, donde me propusieron solicitar una beca para hacer una tesis y después de varios intentos conseguí una beca de la Universidad de Sevilla con tal fin. Hoy, cuatro años después, he me aquí, escribiendo los agradecimientos de mi tesis doctoral. Ahora ya sé qué es un doctorado.

Intentando no alargar más las páginas de esta tesis, en primer lugar, tengo que agradecer todas las personas que forman parte del área de Fisiología Vegetal, la que ha sido mi casa durante más de cuatro años. Especialmente tengo que agradecer a mis directores: la Dra. Sofía García-Mauriño y el Dr. José Antonio Monreal, por haberme convencido y acogido para realizar esta tesis en su grupo de investigación y también por haberme guiado y enseñado en este largo proceso, por vuestra paciencia, dedicación, conocimiento y por vuestra comprensión. A la Dra. Cristina Echevarría por su pasión por la ciencia, por su cariño y su sabiduría, siempre acompañada de consejos y de ideas. A la Dra. Ana Belén Feria por su ayuda con los protocolos, su cariño, sus consejos y su contribución para el estudio de las semillas. A la Dra. Clara de la Osa, quien guio mis primeros y no tan primeros pasos en este laboratorio, enseñándome con mucha paciencia una cantidad innumerable de cosas. Y también por su positividad y alegría, y por las de horas midiendo la fotosíntesis... Te he echado de menos en ésta última etapa de este viaje, que llega ya a su final. Quiero agradecer también a Maite su energía y su alegría y estar siempre dispuesta para una chachara, un ánimo y para echar una mano. Y por ayudarme con las prácticas. Por último, pero no menos importante al Dr. Jacinto Gandullo por estar absolutamente siempre para enseñarme, para aconsejarme y para ayudarme. Por ahogar los silencios de la tarde y acortarlas con meriendas sorpresas, al más puro estilo Hobbit, aunque un poco más ligeras (menos mal) y por nuestras charlas y por poner tanto esa banda sonora de la Tierra Media que ahora me recuerda a la PEPC y al sorgo y también a los gurumelos. Así que como dirían los *eldar* “*¡Elen síla lúmenn`omientielvo!*”. También quiero agradecer a Luis por su amistad desde que entré en este laboratorio y por acompañarme los primeros años de tesis y por las cervecitas en los huecos que nuestras tesis nos han dejado, que, aunque pocos y han sido bonitos. Sé que me llevo a un gran amigo. Gracias a todos y todas, por haberme hecho crecer y no sólo profesionalmente.

Quiero agradecer a todos los alumnos y alumnas que en algún momento cayeron por el departamento, ayudándome o no con la tesis, pero que de una forma u otra siempre hicieron más llevadera esta aventura. Para evitar extenderme, mencionaré solo a los que se han convertido en grandes amigos y personas importantes más allá del laboratorio y espero que también del tiempo. A Rosa por su ayuda incuestionable en las grandes tandas de los primeros experimentos de deficiencia de fosfato, por hacerme reír tantas veces y liarla unas pocas menos, por obligarme o, al menos intentarlo, a descansar. A Miriam y a Dani por su ayuda este último año y por soltar verdades como puños y apuntarse a cervezas, respectivamente. A Mateo por hacerme más entretenidas las jornadas y llenarlas de risas y de mi cara de incomprensión, de forma simultánea. A Marina, siempre

agobiada, por ser suministradora monopolista de “fideítos chinos”, por estar siempre y por hacerme desconectar. A Pablo, que te voy a decir, por apuntarte a todo, también a los “fideítos”, y por acompañarme tantísimo tiempo en el laboratorio, obligándome a desconectar hasta en contra de mi voluntad. También por invitarme y permitirme conocer tu mundo de campos en primavera y de adorables criaturas. A José Eduardo por haber sido mi mano derecha en el último año de tesis y no haberse negado ante mis locuras de procesar 50 muestras en un día, también por su amistad y por haberme sacado al sol, junto a Elena, de vez, en cuando. Y a Tadeo por su colaboración y apoyo en la primera etapa de mi tesis y por su amistad. Por último, quería aprovechar este apartado para agradecer también a todos mis alumnos y alumnas de las prácticas de biología por todo lo que me han enseñado, os deseo lo mejor.

Me gustaría continuar los agradecimientos por aquellas personas que lejos del laboratorio me han apoyado y acompañado a lo largo de esta dura y bella etapa. Primero, darle las gracias a Carlos, Celia y Fernando, y aunque la distancia solo nos ha permitido reunirnos una vez al año, habéis estado siempre ahí para ayudarme a espantar sombras y a resolver mis dudas existenciales, así que gracias. Mención especial se merece aquel hermano que, por artes del destino, me vi adoptando un día, a ti compañero de campos, de batallas, de nocturnidades y de debates, a ti Robin. De un sur a otro sur tan distinto y tan igual, te tengo que dar las gracias por aparecer en mi vida en un momento complicado y por haber estado y estar siempre ahí, aunque ahora sea a lo lejos. Y aunque apareció un poco más tarde, también por el propio tejer de las *Moiras*, te quiero también dar las gracias Adrián, porque también has sido maestro de debates, de compañerismo y de una profunda amistad, propia de leyendas como la de amistad entre los *Eldar* y los *Edain*. A vosotros dos, mis hermanos internacionales, porque sé que la gigantesca distancia que nos separa, no hace nada en nuestra unidad, gracias, por tanto. A Jaime, amigo y compañero de tesis y de piso en los últimos años y a María, amiga incondicional y también vecina, gracias a los dos, por vuestra compañía y acogida. A Ángela y Margarita por haberme apoyado e introducido más en el mundo cultural sevillano y dentro de ésta, a la maravillosa gente de los micros abiertos y del poetry slam, porque no sois conscientes de lo mucho que me habéis aportado en mi vida y, por tanto, también en este duro proceso. Aunque no os puedo nombrar a todos y todas, gracias. También quiero dar las gracias a Rafa y a Tere, por los reencuentros totalmente inesperados y por su apoyo. Gracias porque sin vosotros y vosotras no habría sido posible.

Ahora ya aproximándome a los pilares de mi existencia, la familia. ¡Cómo no iba a nombrar al grupo de “*Cletas en la Revuelta*”!, que como ha sido desde que tengo uso de razón y de memoria habéis estado siempre ahí, mis primas. Gracias por haber soportado toda una vida de inquisición y cuatro años de mi tesis, que parece que se acaba, pero no os preocupéis que me tendréis que soportar igual. Muchas gracias por todo, por aguantarme, por aconsejarme y por mandarme bien lejos cuando lo merezco. En lo personal y en lo político, gracias.

Para continuar con la saga de la familia, seguiré con los que ya no caminan sobre la tierra, quiero agradecer en su origen, sobre todo a Bernabé (José) y a Juan, por enseñarme que la derrota jamás es una opción y que hay que estar siempre, siempre, de pie. A mi abuelo Feliciano por haber sido mi primer fan poético, por haber sido una memoria a perpetuidad de todas las historias, chistes y vidas de los montes y de las minas, por enseñarme todas las ronchas de gurumelos y a resistir frente a todo. A mi abuela Aurora por enseñarme que en este mundo también hay lugar para la dulzura y el cariño incondicionales. A la chacha Elena por haber sido historia viva y palpitante, y también alegría, al igual que lo era siempre Margarita.

Quiero agradecer el pilar que representa mi abuela Tomasa, porque si la memoria, la vida y la capacidad de resistirlo todo tuvieran otro nombre y otra forma serían la suya. Gracias por recordarme siempre que se puede tener razón y perder, pero que jamás podemos tirar nuestra bandera, porque es lo que nos hace ser lo que somos. Gracias por tantísimo. A mis padres, Manuel y M^a Carmen, por aguantarlo todo sin echarme de casa y por enseñarme a tener voluntad y a implicarme en las cosas importantes, y a mi hermano, Israel, por su apoyo incondicional y por ser otro terremoto más y gracias también a José, por todo su cariño y apoyo. A vosotros, por hacerme aprender que el trabajo no lo es todo y que la vida es lo verdaderamente importante, por haber sido luz en los momentos de oscuridad, por soportar mi intensidad y mis tempestades. Porque me habéis enseñado a ser y no solo a estar, gracias. Para no alargar esto más, quiero dar las gracias al resto de mi gran familia, porque a vosotros y vosotras os debo todo lo que soy y todo lo que consiga, porque habéis logrado enseñarme los valores más importantes de la humanidad y que en la vida, siempre hay que tomar partido. Esta tesis doctoral es también vuestra.

Ahora al final de este viaje, de esta importante y dura etapa de mi vida, me hallo aquí, escribiendo las últimas líneas de agradecimientos que marcan la finalización de cuatro años extremadamente intensos en todos los aspectos de mi vida. En estos, he aprendido mucho profesional, vital y humanamente, aunque muchas veces ha tenido que ser por la fuerza. Así que, para terminar, de nuevo, daros las gracias a todos y todas por haber sido y ser parte de mí y de esta tesis, y de todo lo que pueda hacer en un futuro. Y como dijo Gandalf en los Puertos Grises: “No diré, no lloréis; pues no todas las lágrimas son amargas” (El Señor de los Anillos, J.R.R. Tolkien).

GRACIAS

