

00524
115

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA
POSFATASA INDUCIDA POR DEFICIENCIA DE FOSFATO
EN RAICES DE FRIJOL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LORENA MORALES SAINZ

MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

DISCONTINUA

Journal of Management Studies
Volume 45, Number 1, February 2012, 1–12

Jurado asignado:

Presidente: Profr. Jesús Fernando Montiel Aguirre.

Vocal: Profr. Elpidio García Ramírez.

Secretario: Profra. Patricia Coello Coutiño.

1er. Suplente: Profra. Adriana Camacho Villanueva.

2°. Suplente: Profra. Ma. Elena Ibarra Rubio.

**Conjunto E de la facultad de Química.
Facultad de Química.**

Asesor: Dra. Patricia Coello Coutiño

Sustentante: Lorena Morales Sainz



Handwritten signature of Patricia Coello Coutiño, dated 24/2017.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al departamento de bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la facultad de Química por permitirme llevar a cabo este proyecto en sus instalaciones.

A DGAPA en los proyectos IN201101 y IN 201502 por el financiamiento otorgado a la realización de este trabajo.

Al PAIP 6290-13 por el apoyo otorgado a este trabajo.

A la Dra. Patricia Coello Coutiño, directora de esta tesis por su guía, enseñanzas y por ser parte fundamental de mi formación. Con todo mi cariño, gracias.

A la M. en C. Ma. del Carmen Parra por su gran ayuda técnica y apoyo para la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 105 del Conjunto E de la Facultad de Química: Caty, Selene, Martín y Andrea. Por su gran ayuda y cariño.

A los profesores Patricia Coello, Felipe Cruz García, Eleazar Martínez Barajas, Estela Sánchez, Rogelio Rodríguez Sortes y Herminia Loza; con los cuales dentro del proyecto de enseñanza experimental aprendí a amar la ciencia y la investigación.

A

DEDICATORIAS

A ti mamá y papá, por todo gran amor, entrega, paciencia y esfuerzo.
¡Esto es para ustedes!

A ti Karlita, por el simple hecho de existir y ser parte de mi vida. Por enseñarme a amar sin poseer y a aprender de mis errores. Porque te amo.

A mi abuelita Aura, porque de ti hemos aprendido a no rendirnos, a ser tenaces, fuertes, amorosas, respetuosas, entregadas, felices y a ser mujeres dignas, orgullosas y valiosas.

A mis tios y primos porque siempre me han apoyado y respetado.

A mis tias Conny y Naty que con sus consejos y enseñanzas encontré el camino y el amor a la Química.

A mis amigos, los cuales han sido mi balsa ante las tempestades. Gracias por estar aquí.

A la familia Cruz Vázquez, porque siempre estarán en mi alma, no sólo en mi corazón terrenal.

INDICE

ABREVIATURAS.

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | RESUMEN. | 1 |
| II. | INTRODUCCIÓN. | 2 |
| | II.I El fósforo y su forma asimilable, el fosfato. | 3 |
| | II.II Respuestas a la inanición de Pi. | 3 |
| | II.II.I Alargamiento del sistema radical. | 6 |
| | II.II.II Pelos radicales. | 7 |
| | II.II.III Transportadores de fosfato. | 7 |
| | II.II.IV Incremento de exudados radicales y ácidos orgánicos. | 8 |
| | II.II.V Producción de fosfatasa. | 9 |
| III. | ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL TRABAJO. | 12 |
| IV. | HIPOTESIS. | 13 |
| V. | OBJETIVOS. | 13 |
| VI. | MATERIALES Y MÉTODOS. | 14 |
| | VI.I Material vegetal. | 14 |
| | VI.I.I Extracto protéico. | 14 |
| | VI.I.II Actividad de Fosfatasa. | 14 |
| | VI.I.III Análisis de las isoformas de la fosfatasa. | 15 |
| | VI.I.IV Cuantificación de la proteína. | 15 |
| | VI.II Purificación de la enzima. | 15 |
| | VI.III Caracterización de la enzima purificada. | 18 |
| | VI.III.I Punto isoeléctrico. | 18 |
| | VI.III.II Peso molecular. | 18 |
| | VI.III.III Tiempo óptimo de incubación. | 18 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| VI.III.III | Determinación del pH. | 19 |
| VI.III.IV | Estabilidad de la fosfatasa al pH. | 19 |
| VI.III.V | Temperatura óptima. | 19 |
| VI.III.VI | Estabilidad térmica de la fosfatasa. | 19 |
| VI.III.VII | Parámetros cinéticos. | 19 |
| VI.III.VIII | Afinidad a los distintos sustratos. | 19 |
| VI.III.IX | SDS-PAGE. | 20 |
| VI.III.X | Efectores. | 20 |
| VII. | RESULTADOS. | 21 |
| VII.I | Identificación de una fosfatasa inducida por deficiencia de fosfato. | 22 |
| VII.II | Purificación de la enzima. | 22 |
| VII.II.I | Peso molecular. | 26 |
| VII.II.II | Punto isoeléctrico. | 27 |
| VII.III | Caracterización de la enzima purificada. | 27 |
| VII.III.I | Tiempo óptimo de incubación. | 27 |
| VII.III.II | Determinación del pH. | 28 |
| VII.III.III | Estabilidad de la fosfatasa al pH. | 29 |
| VII.III.IV | Temperatura óptima. | 30 |
| VII.III.V | Estabilidad térmica de la fosfatasa. | 31 |
| VII.III.VI | Concentración de sustrato. | 32 |
| VII.III.VII | Especificidad de los sustratos de la fosfatasa. | 33 |
| VII.III.VIII | Propiedades cinéticas de la fosfatasa contra sustratos naturales. | 33 |
| VII.III.IX | Acción de los efectores. | 34 |
| VIII. | DISCUSIÓN. | 35 |
| IX. | CONCLUSIONES. | 39 |
| X. | REFERENCIAS. | 40 |

ABREVIATURAS

| Abreviatura | |
|--------------|---|
| Pi | Fosfato |
| P | Fósforo |
| μ M | Micromolar |
| KDa | Kilodaltones |
| g | Gravedades |
| $^{\circ}$ C | Grados centígrados |
| p-NPP | Para- nitro fenilfosfato |
| nm | Nanómetros |
| pl | Punto isoelectrico |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| DTT | Ditiotreitol |
| SDS | Dodecil-sulfato de sodio |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PPi | Pirofosfato |
| GI-2P | Glucosa 2 fosfato |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| Glu-3P | Glucosa 3 fosfato |
| P-Tyr | o-fosfo-L-tirosina |
| nd | No determinado |
| PEP | Fosfoenol piruvato |

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FOSFATASA INDUCIDA POR DEFICIENCIA DE FOSFATO EN RAÍCES DE FRIJOL.

RESUMEN

El fosfato (Pi) es uno de los nutrientes minerales más importantes para el desarrollo de las plantas; sin embargo, más del 50% se encuentra inaccesible y no es posible asimilarlo. Se sabe que cuando las plantas crecen en condiciones limitantes de este elemento, presentan estrategias para tratar de aminorar esta deficiencia. Algunas de éstas estrategias están dirigidas a la inducción de enzimas capaces de participar en la liberación de Pi de compuestos orgánicos. Las raíces de plantas frijol negro INIFAP responden a la ausencia de Pi induciendo la expresión de fosfatasas. La enzima intracelular corresponde a una fosfatasa monomérica de 34.6 kDa con un pI de 4.4. Sus parámetros cinéticos muestran una Km de 7.66 mM y una Vmax 162.3 mmoles min⁻¹ mg⁻¹. En cuanto a su caracterización bioquímica se encontró que presenta un pH óptimo de 8 y una estabilidad a altas temperaturas en presencia de su sustrato, mostrando su pico de actividad a los 70°C. Cuando se preincuba sin sustrato la temperatura óptima es de 37°C.

Adicionalmente al sustrato sintético utilizado (*p*-nitrofenil-fosfato), la enzima hidroliza eficientemente pirofosfato, polifosfato, G1P y ATP; presenta muy baja actividad hacia glucosa 5 difosfato y glucosa 6 fosfato. La actividad de la fosfatasa alcalina fué inhibida por fosfato, molibdato y vanadato.

La afinidad por el pirofosfato y las propiedades bioquímicas sugieren que la fosfatasa alcalina inducida en raíces de frijol en deficiencia de fosfato presenta actividad de pirofosfatasa y juega un papel importante en la movilización de fosfato intracelular en la planta.

INTRODUCCIÓN

El suelo es un cuerpo natural que sirve de sostén y anclaje a las plantas cultivadas y a la vegetación; es fuente de nutrimentos para el desarrollo vegetal. Dentro de los elementos esenciales para las plantas se encuentran el nitrógeno (N), el fósforo (P), el azufre (S), el potasio (K), el calcio (Ca) y el magnesio (Mg). Como es sabido todos los organismos vegetales necesitan cubrir ciertos niveles mínimos de estos nutrimentos para su supervivencia y adecuado desarrollo. La disponibilidad de los elementos dependerá en gran medida de pH del suelo, en donde se facilitará la liberación de algunos compuestos y se limitará la existencia de otros (Marschner, 1995).

El fósforo (P) y su forma utilizable, el fosfato (Pi).

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se ha postulado que después del nitrógeno (N) es el segundo elemento que limita la producción de cultivos vegetales.

El nivel de fosfato (Pi) libre en el suelo es regulado por las interacciones con superficies orgánicas e inorgánicas. Existen diferentes formas de Pi (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), pero se ha encontrado que la forma dihidrogenada del ión ortofosfato H_2PO_4^- es la especie que principalmente es captada por las raíces y transportada por las células de la planta (Raghothama, 1999). La disponibilidad de Pi en el suelo rara vez excede concentraciones de 10 μM , por lo que las plantas tienen que buscar mecanismos alternativos para solubilizar el P y aumentar los niveles de Pi (Bieliski, 1973). El Pi es uno de los sustratos clave en el metabolismo celular. Está involucrado en la biosíntesis de ácidos nucleicos, membranas, fotosíntesis y respiración. Participa también en el control de vías metabólicas a través de la fosforilación-defosforilación de proteínas.

El origen de la limitación del Pi en el suelo es su alta reactividad y a pesar de que la concentración de P puede llegar a ser grande, generalmente los iones solubilizados H_2PO_4^- reaccionan rápidamente en el suelo para formar fosfatos

insolubles con iones de calcio, con hidróxido de hierro o aluminio encontrándose precipitado o formando parte de compuestos orgánicos (Holford, 1997).

La escasez de Pi se ha tratado de aminorar en algunos sistemas agronómicos con el uso y aplicación de fertilizantes. Esta estrategia sin embargo, representa una solución parcial al problema ya que en la mayoría de los suelos, el Pi que se adiciona es capturado casi inmediatamente y la concentración libre disponible sigue siendo muy pequeña. Adicionalmente, el uso de fertilizantes es una práctica muy cara y es un recurso no renovable que muy pronto va a ser limitante. La deficiencia de Pi afecta de manera diferencial a las especies vegetales. Dentro de una misma especie existen variedades que son más tolerantes que otras. Es por ello que el conocimiento de cómo las plantas responden a condiciones de deficiencia de Pi puede resultar en el desarrollo de estrategias para optimizar el uso de éste nutrimento.

Respuestas a la inanición de fosfato.

Algunas de las respuestas a la inanición de Pi han sido bien estudiadas en microorganismos. Tanto *Escherichia coli* como *Saccharomyces cerevisiae* activan un sistema multigénico de emergencia para buscar trazas de Pi usable en el medio circundante. Ambos sistemas son conocidos como el regulón *pho* y consisten en al menos treinta genes. El regulón *pho* de *Saccharomyces cerevisiae* contiene reguladores positivos y negativos de las vías de señalización que controlan la inducción y secreción de las fosfatasa ácidas, la expresión de transportadores de proteínas de unión a Pi, etc. (Lenburg y O'Shea, 1996). La regulación de este grupo de genes incluye la participación de proteínas cinasas (con actividad de serina y treonina), así como factores de transcripción con la finalidad de aumentar la expresión de genes que ayudarán a aumentar la disponibilidad de Pi. Un ejemplo es la regulación del gene *pho 5*, que codifica para una fosfatasa ácida que se secreta y que es regulada (a nivel transcripcional) por la disponibilidad de Pi (Oshima, 1982). Con el uso de mutantes que no expresan la fosfatasa o que lo hacen de manera constitutiva, se ha llegado a identificar algunos de los componentes de la vía de transducción de señales. Una clase de mutantes que no expresan la fosfatasa presenta tres proteínas modificadas: Pho 4, Pho 2 y Pho 81, que son proteínas

que actúan como reguladores positivos. En otra clase de mutantes en donde se expresa la fosfatasa aún cuando el Pi es abundante, tres reguladores negativos se han identificado: Pho 80, Pho 85 y Pho 84.

Pho 4 y Pho 2 son factores de transcripción que se unen al promotor de *pho 5* para activarlo. Actúan de manera coordinada y al parecer tienen que interactuar para que la fosfatasa se exprese. Cuando la célula está creciendo en abundante Pi, Pho 4 se encuentra fosforilado y en este estado no se puede asociar a Pho 2 y por lo tanto no promueve la expresión de PHO 5. Pho 4 es fosforilada por un complejo cdk-ciclina (Pho 80 y Pho 85 respectivamente). Este complejo está asociado a una proteína (Pho 81) que en condiciones de deficiencia de Pi inhibe la actividad de cinasa de Pho 80- Pho 85 (Fig. 1) (Lenburg y O'Shea, 1996).

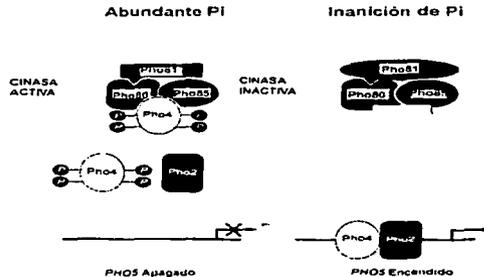


Fig 1. Activación de PHO5 bajo condiciones de inanición de Pi e inactivación de PHO5 en condiciones de suficiencia de Pi en *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el caso de *E. coli* el sistema de rescate tiene dos formas proteicas Pho R. Pho R^R, que es la forma represora y que predomina cuando el Pi está en exceso (arriba de 4 μM) y la forma activadora, Pho R^A, la cuál predomina en condiciones limitantes de Pi (debajo de 4 μM). Pho R en cualquiera de sus formas se encuentra en la membrana periplásmica. Existe un regulador de la respuesta (Pho B) que promueve cambios en la expresión de muchos genes, entre ellos *pho A* que codifica para una fosfatasa periplásmica.

El mecanismo de interconversión de Pho R^R a Pho R^A está regulado por la limitación de Pi. De acuerdo a esto, en condiciones limitantes de Pi, Pho R^A puede autofosforilarse en un residuo de histidina y transferir su grupo fosforil a un residuo de aspartato en Pho B confiriéndole la capacidad de unirse al promotor para inducir la expresión del gene *pho A* (Fig. 2) (Parkinson, 1993; Hoch y Silhavy, 1995).

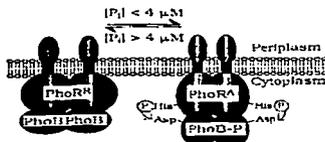


Fig 2b. Sistema de activación de PHOA en *Escherichia coli* bajo condición de deficiencia de Pi ($< 4 \mu M$) por medio de la fosforilación de residuos de aspartato.

En las plantas vasculares, la existencia de un sistema análogo multigénico se ha propuesto (Goldstein et al., 1998) y la acumulación diferencial de proteínas durante la inanición de Pi es indicativa de extensos cambios en la expresión de genes. Muchas proteínas incluidas RNAsas (Green, 1994), fosfatasas ácidas (Duff, 1994; Baldwin, 2001), fosfoenolpiruvato fosfatasa y fosfofructocinasa (Theodorou y Planxton, 1993), fosfodiesterasas (Abel et al., 2000), transportadores de Pi (Raghotama, 2000) y muchos genes que codifican para proteínas de función desconocida (Liu et al., 1998) se incrementan bajo condición de deficiencia. Sin embargo, los mecanismos sensores de Pi y los

componentes de la vía de transducción que integra la respuesta a la inanición no han sido identificados (Ticconi y de la Torre, 2001). Alrededor de 100 genes están relacionados con la adaptación de las plantas a la deficiencia de Pi, muchos de ellos tienen papeles específicos en la toma y utilización eficiente de este elemento (Raghotama, 1999).

Modificaciones morfológicas y bioquímicas.

Las plantas se enfrentan a muchas situaciones adversas para poder obtener el Pi suficiente para sus necesidades metabólicas. Entre las respuestas bioquímicas, fisiológicas y estructurales que las plantas han desarrollado se encuentran las estrategias para optimizar la adquisición de Pi, como la transformación de la arquitectura de la raíz y la secreción de exudados específicos. Alternativamente, existen estrategias para hacer más eficiente el uso de Pi que se ha asimilado, removilizándolo de los tejidos senescentes a los tejidos en crecimiento (Yan, et al., 2001) y liberándolo de metabolitos celulares por la acción de fosfatasa internas.

1. Alargamiento del sistema radical.

La estructura y forma de la raíz son características especialmente importantes para la búsqueda y captura de nutrientes y se modifican cuando la planta crece en ausencia de Pi (Lynch, 1995; Coello, 2001). En *Lupinus albus* se presentan adaptaciones muy específicas de la estructura de la raíz llamadas raíces proteoides. Este tipo de raíces, que son raíces primarias con grupos de raíces secundarias y terciarias, están especializadas en la síntesis y secreción de ácidos orgánicos y fosfatasa a la rizosfera (Raghotama et al., 1999). Bajo condiciones de deficiencia de Pi este sistema radical se vuelve altamente ramificado y más largo, incrementándose hasta en un 63 % de su tamaño original (Grotz y Guerinot, 2002). La función de esta modificación es la de incrementar la superficie de contacto de la raíz con el suelo donde está creciendo y explorar por tanto un mayor terreno (Schachtman y Reid, 1998). Muchas otras especies que no desarrollan raíces proteoides, como el caso de frijol, soya, jitomate y *Arabidopsis*, también tienen cambios morfológicos en respuesta a la deficiencia en Pi. En particular existe un mayor alargamiento y se incrementa la ramificación de la raíz (Lynch y Beebe, 1995).

2. Pelos radicales.

Los pelos radicales son extensiones subcelulares de la epidermis; tienen un diámetro muy pequeño y crecen perpendicularmente al eje de la raíz, con lo cual tienen una mayor área de exploración del suelo (Bates y Lynch, 2000). Los pelos radicales son importantes en la adquisición de recursos poco disponibles en el suelo como es el caso del Pi. Muchos estudios han mostrado evidencias indirectas del beneficio de los pelos radicales en la adquisición del Pi, pues en condiciones de deficiencia aumentan su diámetro, incrementan su elongación y su densidad (Bates y Lynch, 2000).

3. Transportadores de fosfato.

La adquisición de Pi por las plantas se realiza mediante un cotransporte que requiere energía y que es impulsado por un gradiente de protones generado por la bomba ATPasa-H⁺ de la membrana plasmática (Mutschler et al., 1996). Éste es el mayor mecanismo por el cual las plantas absorben nutrientes potencialmente limitados del suelo a la superficie de las raíces. La absorción activa promueve una elevación de la concentración de iones a lo largo de toda la planta, (Raghotama, 2000). La toma de Pi muestra una fuerte dependencia con el pH y los gradientes de membrana; los transportadores tienen un pH óptimo de 4.5 a 5.0, en el cual se moviliza preferentemente H₂PO₄⁻ sobre HPO₄⁻² (Raghotama, 1999).

Dos tipos de transportadores se han caracterizado, uno de alta afinidad operando a bajas concentraciones de Pi (μM) y otro de baja afinidad funcionando a altas concentraciones de Pi (mM). Los transportadores de alta afinidad llevan el Pi de un medio externo que contiene concentraciones muy bajas al citoplasma en donde generalmente existen concentraciones altas de Pi. Los transportadores de Pi de baja afinidad son transportadores constitutivos cuya expresión no se afecta por la disponibilidad de Pi, mientras que el sistema de alta afinidad es regulado muy finamente por la cantidad de Pi presente (Raghotama, 2000).

El número de genes identificados que codifican para transportadores de Pi se está incrementando rápidamente. En *Arabidopsis thaliana* existen 9 genes con alta similitud a aquellos que codifican para transportadores de alta afinidad y

todos los transportadores de membrana clonados hasta la fecha son proteínas integrales de membrana. La expresión de la mayoría de estos transportadores ocurre en los pelos radicales y la epidermis de la raíz, aunque se ha visto que en plantas expuestas a deficiencia de Pi la distribución a lo largo de todo el sistema radical se generaliza. Algunos transportadores de alta afinidad en jitomate (LePT1) y en papa (StPT1) están presentes en otros órganos además de las raíces como tallo, tubérculo y flores (Raghotama,1999).

4. Incremento de los exudados radicales y ácidos orgánicos.

Los exudados de la raíz contienen solutos de alto y bajo peso molecular, como las ectoenzimas, ácidos orgánicos, azúcares y compuestos fenólicos. La capacidad para secretar ácidos orgánicos se correlaciona con la eficiencia de las plantas para solubilizar cantidades significativas de P de fuentes que no son utilizables, por ejemplo Ca-P, Al-P y Fe-P (López-Bucio et al., 2000), presentes principalmente en suelos ácidos y alcalinos.

Al parecer el mecanismo de excreción de ácidos orgánicos es una estrategia generalizada que muchas especies utilizan para aumentar la disponibilidad de Pi; sin embargo, el tipo de respuesta y la magnitud de ésta es diferente entre especies (Tabla 1).

| Exudados(nmol/g peso fresco de raíz/12h) | | | | | |
|--|-------|----------|----------|--------|---------|
| Especies | Total | Malónico | Fumárico | Málico | Cítrico |
| Soya | 2.83 | — | 1.03 | 0.78 | 1.02 |
| Chicharo | 66.54 | 7.04 | 6.87 | 12.67 | 35.63 |
| Cacahuate | 47.21 | — | 24.44 | 12.84 | 9.17 |
| Garbanzo | 6.17 | 0.34 | 0.73 | 4.31 | 0.79 |

Tabla1. Cantidad de ácidos orgánicos exudados de raíces de diferentes especies de leguminosas que han estado en deficiencia de fosfato (tomado de Marschner,1995)

El mecanismo por el cuál se lleva a cabo la liberación de Pi por los ácidos orgánicos es mediante la solubilización de los compuestos que mantienen inaccesible al Pi como Ca-P, Al-P y Fe-P , liberando así al Pi (Marschner,1995) (Fig 3).

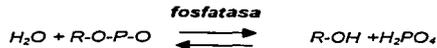


Fig 3. Representación esquemática de la solubilización y liberación de Pi de los compuestos inorgánicos por medio de los ácidos orgánicos exudados de raíces (tomado de Marschner,1995)

A pesar de que la secreción de ácidos orgánicos proporciona una ventaja en la adquisición de Pi, no todo el P que se encuentra en el suelo está en forma de Pi-mineral. Una alta proporción se encuentra formando parte de compuestos orgánicos y para la liberación del Pi de estos compuestos es necesaria la presencia y activación de las fosfatasas.

5. Producción de fosfatasas.

La inducción de fosfatasas intracelulares y extracelulares en condiciones de deficiencia de Pi es una respuesta universal de las plantas. Las fosfatasas (monoéster ortofosfórico fosfohidrolasas 3.1.3.2) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de grupos monoéster de fosfato incrementando la disponibilidad de ortofosfato (Miller, 2001) en el medio.



Se sabe que las fosfatasas pueden ser intracelulares o secretadas. Las secretadas se relacionan con la recaptura de Pi presentes en compuestos orgánicos de matrices extracelulares (Coello, 2002) y las intracelulares con la recirculación del Pi que se encuentra en el interior de la célula (del Pozo et al., 1999).

La primera clasificación hecha a estas enzimas es en base a su pH óptimo de reacción, de esta forma las encontramos como fosfatasa alcalinas (por arriba de 7.0) y como fosfatasa ácidas (por debajo de 7.0) (Gilbert, 1999).

- 1) Las fosfatasa alcalinas en plantas, generalmente muestran especificidad por un sustrato y muchas de las estudiadas presentan termoestabilidad. Los cationes bivalentes como zinc, manganeso, magnesio o cobalto, deben hallarse presentes como activadores (Joner y Van Aarle, 2000).
- 2) Las fosfatasa ácidas normalmente no exhiben especificidad por un solo sustrato y presentan una gran diversidad en propiedades físicas, por ello se relacionan con distintas funciones metabólicas, la 3- fosfoglicerato fosfatasa o la fosfoenolpiruvato fosfatasa de *Brassica nigra*, muestran una clara especificidad pero no absoluta hacia el sustrato.

Ensayos inmunológicos hacia fosfatasa ácidas de citoplasma muestran que tanto las fosfatasa ácidas como las alcalinas poseen determinantes antigénicos comunes por lo que estos estudios llevan a pensar que existe un gene ancestral común para las fosfatasa. Algunas características de las fosfatasa más estudiadas se resumen en el cuadro I.

El incremento en la actividad de las fosfatasa puede deberse a la expresión *de novo* de genes o a la activación de proteínas preexistentes.

| Origen Vegetal | Propiedades Cinéticas | | | | Propiedades Físicas | | pl y posible función | Referencias |
|--|---------------------------|---------|-----------------------------|---------|---------------------|-------------|----------------------|---|
| | PNPP | | Mejor sustrato no sintético | | Nativo | Subunidades | | |
| | Vmax (Umg ⁻¹) | Km (mM) | Vmax (Umg ⁻¹) | Km (mM) | M (kDa) | M (kDa) | | |
| Fosfatasa intracelulares | | | | | | | | |
| Cotiledón de soya (1) | 153 | 0.07 | PPi | 83 | 0.08 | 55 | 53 | 6.7, mov-P (Gibson y Ullah.1989) |
| Cotiledón de soya (1) | 2.4 | 0.07 | Gl-2-P | 1.6 | 0.30 | 50 | 50 | 5.5, fitasa (Duff et al. 1989) |
| Raíz de cebada | 9.1 | 0.6 | ATP | 6.9 | nd | 78 | 38 | 6.0, nd (Panara et al. 1990) |
| Hipocotiledón VSP de soya | Nd | nd | Tetra Poli-P | 2 | 0.04 | 60 | 31.25 | 4.7, polifosfatasa (Dewald et al. 1991) |
| Fosfatasa extracelulares (secretadas) | | | | | | | | |
| Suspensión de células de soya | 512 | 0.3 | ATP | 5.8 | nd | 144 | 76.68 | Nd, nd (LeBransky et al. 1992) |
| Suspensión de células de maiz | 2.6 | 0.35 | Gl-3-P | nd | 0.26 | 31.5 | 29 | nd (Myernick 1992) |
| Suspensión de células de tomate | 24 | nd | F6P | 14 | nd | 51 | 51 | Nd, nd (Paul y Williamson 1987) |
| Tubérculos de papa | 1250 | 1.1 | P-Tyr | 1917 | 0.99 | 110 | 57.55 | Nd, p-Tyr proteína fosfatasa (Gellatly et al. 1993) |
| Suspensión células de raíz de Arabidopsis | 11.08 | 2.32 | Poly-P | 115.94 | 0.378 | 63 | 52 | 5.9, nd (Coello 2002) |

Cuadro 1. Propiedades físicas, cinéticas y función propuesta de algunas fosfatasa ácidas de plantas purificadas. Abreviaciones: Ppi, pirofosfato inorgánico; F6P, fructosa 6 fosfato; Gl-3-P, glucosa 3 fosfato; P-Tyr, O-fosfo-L-tirosina; VSP, vegetative storage protein; nd, no determinado; Gl-2-P, glucosa 2 fosfato y U, unidades (1 mmol de Pi producido por minuto).

ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL TRABAJO.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) es una de las leguminosas comestibles más importante en el mundo, es cultivada en muchos países, especialmente en América Latina y África (Posada et al., 1995) y junto con el maíz es la principal fuente de proteína. Este importante grano se produce mayormente en regiones con condiciones donde predominan factores limitantes de suelo, clima y enfermedades de plagas que afectan el desarrollo de la planta y los rendimientos (Rosas et al., 1995). Debido a ello se han implementado programas para seleccionar variedades tolerantes a condiciones desfavorables. En cuanto a la deficiencia de Pi se han identificado variedades en las que no se afectan en gran medida su crecimiento y su productividad (tolerantes) cuando son crecidas en condiciones de deficiencia de Pi y variedades cuyo crecimiento y productividad se ve muy afectado (susceptibles).

En nuestro laboratorio se han evaluado las diferencias que existen entre variedades de frijol tolerantes y susceptibles a la deficiencia en Pi. Los datos indican que mientras no existen diferencias importantes en las características morfológicas y los exudados de la raíz, las variedades más tolerantes si las presentan en el patrón de fosfatasa intracelulares, sugiriendo un papel muy importante de éstas enzimas en la tolerancia a la deficiencia de Pi.

Con base en lo anterior, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPOTESIS

Si las plantas de frijol negro INIFAP crecen en condiciones de deficiencia de Pi, entonces la planta expresará fosfatasas específicas en respuesta a ésta condición.

OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar una fosfatasa de raíces de frijol que incremente su actividad por deficiencia de Pi.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar una fosfatasa que aumente su actividad en condiciones de deficiencia de Pi.

Purificar la fosfatasa elegida .

Caracterizar la enzima bioquímicamente y fisicoquímicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad negro INIFAP se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5%, se lavaron con abundante agua destilada y se germinaron en papel absorbente húmedo. Las plántulas se transplantaron a agrolita y fueron regadas cada tercer día con medio Hoagland II, que contiene 3 mM KNO₃, 2 mM Ca (NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0.004 mM MnCl₂ 4H₂O, 0.023 mM H₃BO₃, 0.0004 mM ZnSO₄, 0.00015 mM CuSO₄, 0.00005 mM H₂MoO₄, 1gr/200 ml Fe (III) EDTA y 0.5 mM fosfato de amonio. Para el tratamiento de deficiencia, el fosfato de amonio fué sustituido por 0.5 M de sulfato de amonio. A las tres semanas de tratamiento, las plantas fueron cosechadas.

Cada semana se sembraron nuevas plantas para contar con material suficiente durante los experimentos.

Extracto Protéico.

Las raíces crecidas por tres semanas (1gr) fueron homogenadas en un mortero con 1 vol. de amortiguador que contenía 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mM de leupeptina y 1 mM benzamidina. El homogenado se centrifugó a 20000 x g por 10 min. y el sobrenadante se utilizó como fuente protéica. Todas las manipulaciones se hicieron a 4 °C

Actividad de fosfatasa.

La cuantificación de la actividad se realizó utilizando *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) como sustrato (Basha, 1984). La enzima (5-50 μ l) fué incubada con 20

mM de *p*-NPP en amortiguador de acetatos (0.1 M acetato de sodio pH 4.8, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA y 10% glicerol) en un volúmen final de 0.4 ml por 10 min. a 37°C. La reacción fué detenida adicionando 1 ml de 1M NaOH. La concentración de *p*-nitrofenol se determinó midiendo la absorción a 410 nm. La cantidad de *p*-nitrofenol producido fué calculado utilizando un coeficiente de extinción molar de 20 000 M⁻¹ cm¹. Una unidad de actividad de fosfatasa se define como la producción de 1 mmol de Pi por minuto.

Análisis de las isoformas de la fosfatasa.

El análisis de isoformas de fosfatasa se realizó por medio de geles nativos de actividad en donde las proteínas son separadas en un gel de poliacrilamida no desnaturizante como lo describe Laemmli (1970). Cuando finaliza la electroforesis, los geles son lavados con buffer de acetatos (pH 4.7). La actividad se visualizó utilizando 1 mM α - naftil fosfato como sustrato y 1 mM fast garnet como colorante. Al final de la reacción el color oscuro en el gel indica la actividad de la fosfatasa.

Cuantificación de proteína.

Para la cuantificación de la proteína se utilizó el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) con albúmina sérica bovina para la realización de la curva patrón. Se pusieron a reaccionar 20 μ l de la enzima con 1 ml de reactivo de bradford por 10 min. y se cuantificó espectofométricamente a 595nm, la cantidad de proteína fué calculada interpolando el valor obtenido a la curva patrón construída.

Purificación de la enzima

El extracto protéico, obtenido como se describió anteriormente, fué usado como fuente de proteína para la purificación de la enzima. Todas las manipulaciones

se realizaron a 4°C.

a) Columna de intercambio iónico (DEAE-Sefacel). El extracto crudo obtenido de las raíces de frijol en deficiencia de Pi, se cargó en una columna de DEAE-Sefacel (30cm x 2cm), previamente equilibrada con 20 mM de Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 3 mM MgCl₂ y 10% glicerol. La columna se lavó extensamente con el mismo amortiguador. La elución de las proteínas se realizó con un gradiente de NaCl de 0-0.5 M. Las fracciones con actividad fueron evaluadas tanto espectrofotométricamente como en geles de actividad.

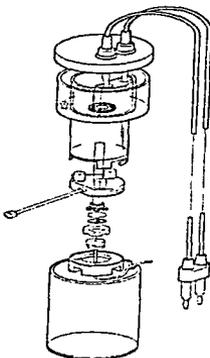
b) Precipitación con sulfato de amonio. La precipitación se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente relación según el volumen obtenido de extracto.

| Porcentaje de precipitación | Cantidad de (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) |
|-----------------------------|---|
| 0-20 | 114 |
| 20-40 | 123 |
| 40-60 | 132 |
| 60-80 | 143 |
| Saturación | Saturación |

Es importante que la incorporación de la sal se realice lentamente, en agitación suave y constante y en frío para evitar desnaturalizaciones. Después de cada precipitación se mantiene la agitación por 30 min. y se centrifuga a 22,000 x g durante 15 min., el sobrenadante se separa y se prosigue con la segunda precipitación.

Las pastillas se resuspendieron en 2 ml de amortiguador de acetatos y fueron sometidos a diálisis para poder continuar con el protocolo. Las membranas se dejan en frío y en agitación por toda la noche en un volumen de 500 ml del mismo amortiguador para poder asegurar una diálisis completa.

c) Mini Prep Cell. El equipo (Fig. 2) consta de un tubo de vidrio en el que se preparó un gel de poliacrilamida no desnaturalizante como lo describe Laemmli (1970). La muestra se separó en un campo eléctrico a 1 watt constante utilizando 25 mM Tris-HCl pH 8 y 0.192 M glicina. En la parte inferior del tubo existe un orificio en donde se coloca una membrana y unida a ella una manguera por la cual se eluye la muestra para ser separada de acuerdo al peso molecular y carga. Conectada a la manguera hay una bomba peristáltica prendida con un flujo constante de 100 μ l/min y las fracciones son colectadas en un colector. Todas las fracciones que presentaron actividad se monitorearon en un gel nativo de poliacrilamida revelado por actividad .



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Mini Prep Cell

Fig 2. Esquema detallado del Mini Prep cell de Bio Rad utilizado en la purificación de la fosfatasa expresada preferentemente en raíces de frijol sometidas a inanición de Pi

Punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico (pI) se determinó utilizando un gel nativo de acrilamida al 5% con 10% glycerol y 0.8% anfolinas (pH 3.5-10 Bio-Lyte BIO RAD). El gel se pre-corrió por 15 min a 200V, 300V y 500V. La muestra se corrió a 200 V por 1.5 h y 400 V por 1.5 h. La actividad de la fosfatasa se visualizó por incubación con α -nail-fosfato y Fast Garnet como se describió anteriormente. Para la determinación del gradiente de pH, un carril sin muestra del gel fué cortado cada 0.5 cm y eluido con 0.5 ml de agua desionizada. El valor del pH se cuantificó con un potenciómetro.

Masa molecular

La masa molecular fué estimada en una columna de Superdex-200 HR 10/30 (Farmacia Upsala, Sweden). La columna fué equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador que contenía 20 mM Tris-HCl pH 8, 3mM MgCl₂, 1mM EDTA y 10% de glicerol. Las proteínas fueron eluidas con el mismo amortiguador a un flujo de 0.5 ml/min.

La masa se calculó calibrando la columna con los siguientes marcadores. 1) tiroglobulina (670 kDa); 2) IgG bovina (158 kDa); 3) Ovoalbúmina (44 kDa); 4) Mioglobina (17 kDa); 5) Vitamina B12 (1.35 kDa).

Caracterización de la enzima purificada.

Tiempo óptimo de incubación. En el caso de la determinación del tiempo óptimo de incubación, se utilizó *p*-NPP como sustrato y se manejó el rango de 5 a 30 minutos de incubación. La reacción se detiene al tiempo indicado con 1M NaOH y se cuantifica a 410 nm. La cantidad de enzima utilizada fué de 1.7 μ g.

Determinación de pH. Para determinar el pH óptimo se utilizaron distintos amortiguadores. Amortiguador de acetatos (0.1M) en el rango de pH de 3 a 6; amortiguador Mes-NaOH (0.1M) en el rango de 5 a 7 y Tris-HCl (0.1M) en el rango de 7 a 9. Después de incubar la enzima y el sustrato en estos pH's, la actividad se determinó como se indicó anteriormente.

Estabilidad de la fosfatasa al pH. La enzima se preincubó por 15 min. en los amortiguadores con distintos pH's. Una alícuota de la enzima fué incubada con el sustrato a pH 8 a 37°C durante 10 min. La actividad de la enzima fué evaluada midiendo la absorbencia a 410 nm.

Temperatura óptima. Para la determinación de la temperatura óptima la enzima se incubó con el sustrato en un rango entre 20°C y 90°C durante 10 min. La actividad fué cuantificada por la liberación de *p*-nitrofenol a 410nm.

Estabilidad térmica de la fosfatasa. La enzima se preincubó por 15 min. en Tris-HCl pH 8 en un rango entre 20°C y 50°C. Su actividad fué cuantificada utilizando *p*-NPP a 37°C por 10 min.

Parámetros cinéticos. Para la determinación de los parámetros cinéticos, se evaluó la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de *p*-NPP (0.8 a 60 mM) a temperatura de 37°C e incubando la mezcla por 10 min. Los valores de K_m y V_{max} fueron determinados por medio de un programa que ajusta la curva a una hipérbola instalado en origen 5.0.

Afinidad a los distintos sustratos. La actividad fué ensayada con diferentes sustratos tomando en cuenta la cantidad de fosfato liberado según el método de Ames (1996). Después de 10 min a 37°C con 5 mM (adenosina 5 difosfato, glucosa 6 fosfato, fosfoenol piruvato y ácido fítico), 2 mM (adenosina trifosfato y glucosa 1 fosfato) y 1 mM (pirofosfato y polifosfato) la reacción fué terminada por la adición de 0.7 ml de reactivo A (1.4% ácido ascórbico, 36% de molibdato de amonio en 1 N H₂SO₄), seguido por una incubación de 20 min. a 45°C. La

absorbencia fué medida a 820nm. La curva estandar fué construída en el rango de 0.01 mM a 0.1 mM de $K_2H_2PO_4$.

SDS-PAGE

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida se realizaron de acuerdo a lo establecido por Laemmli (1970) incorporando 20 mM DTT y calentando las muestras por 10 min. a 100°C antes de cargarlas al gel. Se utilizó amortiguador de corrida 60 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8, 10% glicina y 2% SDS. Una vez terminado de correr el gel, se tiñó con solución de plata, en donde después de varios lavados del gel con agua y metanol al 50% se le adiciona el reactivo C que es una mezcla de solución A (0.4 g de nitrato de plata en 2ml de agua mezclados perfectamente) y de solución B (11ml de NaOH al 0.36% y 0.7 ml de NH_4OH). Para revelar el gel se lava extensamente con agua deionizada y se pone en la solución D (2.5 ml de 1% ácido cítrico, 0.125 ml de 38% formaldehído en un volúmen final de 125 ml) hasta la aparición de las bandas.

Efectores

La enzima (5-50 μ l) fué incubada con *p*-NPP por 10 min a 37°C y 10mM de cada efector (molibdato, nitrato, sulfato, fosfato, fluoruro, vanadato, tartrato y calcio) la reacción fué detenida adicionando 1 ml de 1 M NaOH y se cuantificó a 410 nm. La cantidad de *p*-NPP hidrolizada por la enzima sin la presencia de ningún efector se tomó como el 100% de actividad.

RESULTADOS

Plantas de frijol sometidas a inanición de Pi presentaron características físicas claras de la deficiencia, como son raíces más grandes y ramificadas, presencia de manchas cloróticas y antocianinas en las hojas, además de una reducción en el crecimiento del tallo y parte aérea (Fig 1).



Fig 1. Características morfológicas de las plantas crecidas en suficiencia +Pi y deficiencia -Pi de fósforo a las 3 semanas de tratamiento. A la izquierda se observan diferencias en las raíces y a la derecha en los tamaños de los tallos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Identificación de una fosfatasa inducida por deficiencia de Pi

La actividad de la fosfatasa se determinó en raíces de plantas crecidas en suficiencia de fosfato (+Pi) para el caso del control y en deficiencia de fosfato (-Pi) para las plantas en tratamiento. Utilizando geles nativos teñidos por actividad, se detectó un incremento en la actividad de la fosfatasa de más rápida migración de plantas sometidas a deficiencia en Pi con respecto al control (Fig. 2). Una vez identificada la actividad de fosfatasa inducida por deficiencia de Pi, se planteó un esquema tentativo de purificación.

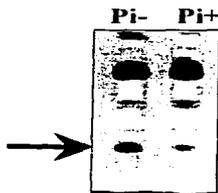


Fig 2. Actividad de isoformas específicas de fosfatasas en plantas de tres semanas en condiciones de deficiencia (Pi-) y suficiencia de fosfato (Pi+).

Purificación

Para el proceso de purificación se eligió inicialmente una columna cromatográfica de intercambio aniónico, como la de DEAE-Sefacel. El extracto crudo, procedente de plantas crecidas en deficiencia de Pi, fué cargado en esta columna. La Fig. 3 muestra el perfil de elución de la actividad de fosfatasa. A pesar de ser un buen paso de purificación, ya que las fosfatasas se separan muy bien de otras proteínas, las distintas isoformas no se separaron y eluyeron en la misma concentración de sales. Esto se corroboró con un gel de actividad de las distintas fracciones (datos no mostrados).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

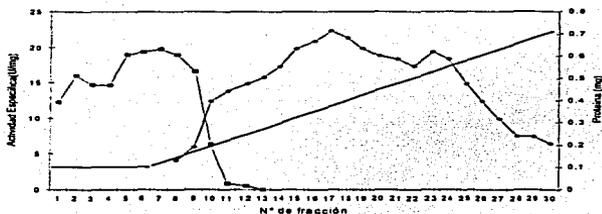


Fig 3. Actividad de fosfatasa Inducida por deficiencia de Pi (■) elución de todas las fosfatasas presentes del extracto crudo; y pico de proteína determinado a 595nm (●) en las diferentes fracciones obtenidas de la columna de DEAE-sefacel.

Otra estrategia de purificación utilizada fué el método de precipitación con sulfato de amonio. En esta técnica cada una de las fracciones precipitadas contiene a alguna de las proteínas presentes en el extracto crudo, lo importante es saber si las distintas isoformas de la fosfatasa pueden precipitarse con concentraciones diferentes de sulfato de amonio. Monitoreando cada fracción con ensayos y con geles de actividad se observó que en la fracción de 40-60% de precipitación con sulfato de amonio había ya un poco de la fosfatasa de rápida migración, pero aún contenía una alta cantidad de las otras isoformas. En la fracción de 60-80% de precipitación con sulfato de amonio se encontró casi limpia del resto de las enzimas, por lo que se decidió iniciar la caracterización con ésta fracción (Fig. 4).

A pesar de la presencia mayoritaria de la enzima deseada en la fracción de 60-80%, existía también una pequeña proporción de una de las formas de baja migración y esa mezcla de proteínas hacía que los datos no fueran muy reproducibles entre las diferentes purificaciones.

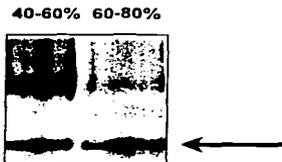


Fig 4. Gel nativo de actividad que muestra las diferentes fracciones de la precipitación con sulfato de amonio.

Para purificar la enzima que nos interesaba, se decidió utilizar el equipo mini-prep cell, pensando en que la distancia entre las dos fosfatasa facilitaría la elución del gel de la forma de rápida migración y retrasaría la de lenta migración. La proteína, proveniente del extracto crudo se separó bajo las condiciones indicadas en material y métodos. Después de aproximadamente 3 horas de que el frente comenzó a salir, las fracciones fueron colectadas y la actividad de la fosfatasa evaluada. La fig. 5 muestra un gel nativo teñido por actividad con distintas fracciones de la purificación. Se observó que en la fracción proveniente del mini-prep cell existe solamente la forma de rápida migración mientras que en el extracto crudo y en el precipitado con sulfato de amonio aparecen otras isoformas. La fracción purificada se corrió también en un gel desnaturizante de SDS para conocer su composición polipeptídica (Fig. 6). En un gel teñido con plata, la fracción proveniente del mini-prep cell presenta un polipéptido mayoritario de aproximadamente 35 kDa de masa molecular y dos polipéptidos minoritarios con masas molecular entre 65 y 45 kDa respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

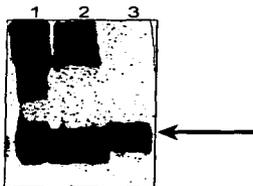


Fig 5. Gel nativo de actividad al 10%. En el carril 1 extracto crudo, en el 2 fracción después de la precipitación con sulfato de amonio y en carril 3 fracción purificada proveniente del mini prep cell.

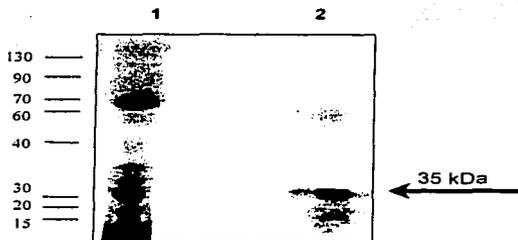


Fig 6. SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras con DTT y calentando la muestra. En el carril 1 el extracto crudo y en el carril 2 la fracción purificada después del miniprep cell. La proteína se visualizó por tinción con plata.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Peso molecular.

Para calcular la masa molecular de la proteína nativa y la composición de subunidades, la fosfatasa proveniente del mini-prep cell se pasó por una columna de filtración molecular. Interpolando el tiempo que tarda la fosfatasa en eluir con respecto a los marcadores, se obtuvo que el peso de la enzima nativa era de 34.67 kDa (Fig. 7). Estos resultados sugieren que el polipéptido de 35 kDa proveniente de la fracción del mini-prep cell es la isoforma de la fosfatasa y los otros dos polipéptidos minoritarios son polipéptidos contaminantes. Adicionalmente, éstos datos indican que en su estado nativo esta fosfatasa es un monómero.

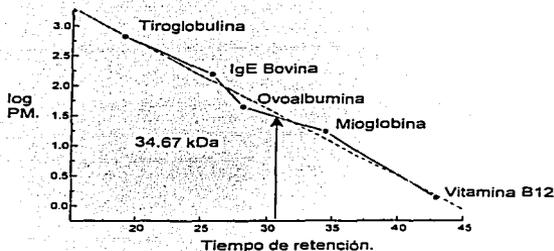


Fig 7. Gráfica de los estándares corridos en la columna de filtración molecular, en la cual por interpolación se calculó la masa molecular de la fosfatasa estudiada.

Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico (pI) es un parámetro fisicoquímico muy importante de una proteína y en particular de una enzima. Utilizando un gel de actividad con anfólinas para lograr un gradiente de pH, se observó que la isoforma de rápida migración presentó un pI de 4.4 (Fig. 8). Las otras isoformas con actividad de fosfatasa presentaron un pI muy cercano a 4.4 (datos no mostrados) razón por la cuál fue imposible separarlas en columnas de intercambio iónico.

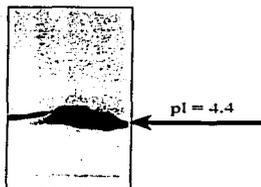


Fig 8. Determinación del punto isoeléctrico de la fosfatasa inducida por deficiencia de Pi en un gel nativo y teñido por actividad.

Caracterización

Tiempo óptimo de incubación.

Para conocer las condiciones iniciales de trabajo se estableció como el primer parámetro a determinar el tiempo óptimo de incubación de la enzima (Fig. 9). En éste experimento se observó que la actividad incrementa proporcionalmente al tiempo de incubación ($r^2 = 0.998$) utilizando 1.7 μg de proteína, por lo que se decidió hacer el estudio a los 10 min de incubación en todas las determinaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

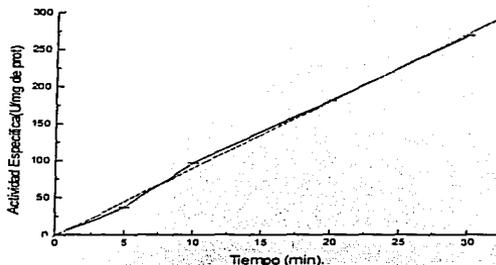


Fig 9. Efecto del tiempo de incubación en la actividad de la fosfatasa. La determinación fue realizada con *p*-NPP como sustrato midiendo la actividad a 410 nm. Una unidad equivale a 1mmol de Pi por min.

pH óptimo

Para trabajar en las condiciones óptimas de la enzima y conocer sus características estructurales básicas, es necesario la determinación de su pH óptimo. Se sabe que en condiciones de inanición de Pi las fosfatasas que principalmente se inducen en las raíces de frijol Pi son las de carácter ácido. Incubando la enzima en amortiguadores con diferentes pH's durante 10 min. a 37°C, se observó que existe un pico de actividad a un pH de 8 (Fig.10), podemos decir que una de las fosfatasas que se inducen por deficiencia a Pi en raíces de frijol es una fosfatasa alcalina.

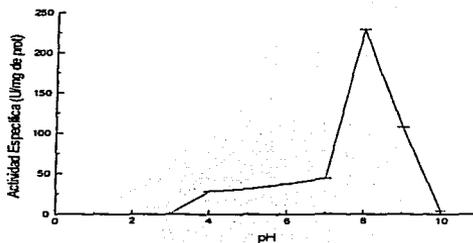


Fig 10. Efecto del pH sobre la actividad específica. Se utilizaron amortiguadores (0.1 M) de distintos valores de pH (pH 3-5 acetatos; pH 6-7 Mes-NaOH; pH 8-9 Tris-HCl). U= producción de 1mmol de Pi por min.

Estabilidad de la enzima al pH.

Para determinar si la influencia del pH es sobre la actividad de la enzima o sobre su estabilidad, se realizó un experimento en donde la fosfatasa fué preincubada durante 15 min. a los diferentes pH's. Su actividad fué evaluada durante 10 min. a 37°C y pH 8. La Fig. 11 muestra el perfil de actividad de la fosfatasa. Se puede observar que a un pH entre 7-8 la enzima presenta la máxima actividad. Por debajo de éstos valores, la estabilidad de la enzima se ve muy afectada y lo mismo sucede en pH's por arriba de 8.

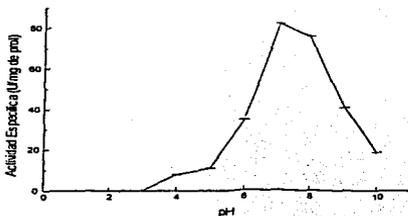


Fig 11. Determinación de la estabilidad de la enzima por efecto del pH. El estudio se realizó preincubando la enzima por 10 min. U= producción de 1mmol de Pi por min.

Temperatura óptima.

Conociendo ya el pH de trabajo, el siguiente parámetro a determinar fué la temperatura óptima de reacción (Fig. 12). Como se puede observar, la temperatura óptima de la fosfatasa es 70°C.

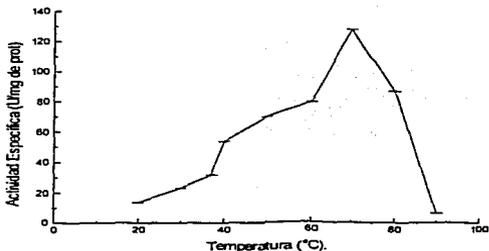


Fig 12. Influencia de la temperatura sobre la actividad específica de la enzima. La fosfatasa presenta una temperatura óptima de 70°C. El estudio se realizó incubando a la enzima por 10 min. a las diferentes temperaturas. Una unidad es 1mmol de Pi por min.

Estabilidad térmica de la enzima.

La temperatura óptima encontrada no corresponde a una temperatura fisiológica por lo era necesario realizar un ensayo de estabilidad térmica (Fig. 13). Para ello, la enzima se preincubó durante 15 min. a las diferentes temperaturas en presencia de su sustrato y su actividad fué evaluada durante 10 min. a 37°C y pH 8. El perfil de actividad indica que la enzima es estable en rangos de temperatura entre 20°C y 37°C. Por arriba o por debajo de éstos valores, la estabilidad de la enzima se pierde muy probablemente por desnaturalización. En los estudios anteriores de temperatura óptima se obtuvo un valor de 70°C, cuando la enzima era incubada con su sustrato. Estos datos sugerían que el sustrato generaba algún tipo de conformación en la enzima que la hacía estable a altas temperaturas. Para corroborar lo anterior se realizó un experimento en el que se preincubó a la enzima con *p*-NPP por 15 minutos a diferentes temperaturas y después de ese tiempo se cuantificó la actividad de la enzima incubándola por 10 minutos a 37°C (Fig.14). Los resultados obtenidos muestran que el sustrato protege a la enzima contra temperaturas altas ya que la temperatura óptima es de 70°C.

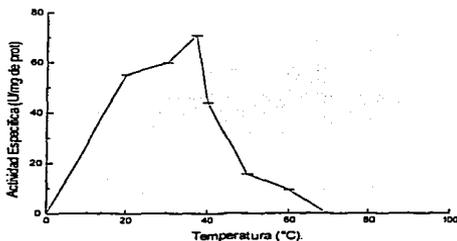


Fig 13. Determinación de la estabilidad de la enzima medida por el efecto de la temperatura en la actividad específica. La proteína se sometió a preincubación sin sustrato por 15 minutos a las diferentes temperaturas y posteriormente se agregó (*p*-NPP) durante 10 min a 37°C. Una unidad equivale a 1mmol de PI por min.

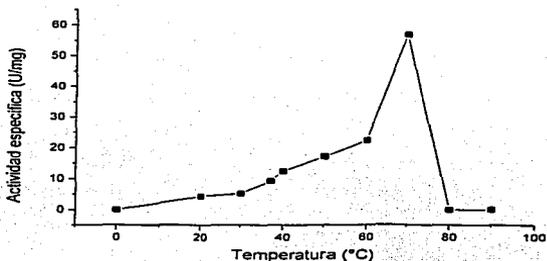


Fig 14. Determinación de la estabilidad de la fosfatasa. La fosfatasa presenta una temperatura óptima a los 70°C. El estudio se realizó preincubando por 15 min la enzima a las diferentes temperaturas con *p*-NPP y después incubando 10 minutos con nuevo sustrato. Una unidad equivale a 1mmol de Pi por min.

Concentración de sustrato.

Para conocer los parámetros cinéticos de la enzima se determinó su actividad enzimática a diferentes concentraciones de *p*-NPP (Fig.15). La relación entre la velocidad de la reacción y la concentración de sustrato es hiperbólica indicando que la enzima presenta un comportamiento Michaeliano. Los parámetros

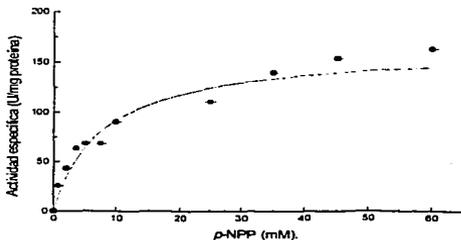


Fig 15. La enzima presenta un comportamiento Michaeliano ($K_m = 7,684$ y su $V_{max} = 162,29$) utilizando PNPP como sustrato. Una unidad es 1mmol de Pi por min.

obtenidos mediante un programa de computación indican un valor de $K_m = 7.684 \text{ mM}$ y una $V_{max} = 162.29 \text{ mmoles Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$.

Especificidad de sustratos de la fosfatasa .

El *p*-NPP es un sustrato sintético que es utilizado por las fosfatasas; sin embargo, no se encuentra naturalmente en los seres vivos, por lo que se realizaron ensayos con un grupo de sustratos naturales para determinar la especificidad de la enzima.

La mayor actividad fué observada con pirofosfato, polifosfato, glucosa 1-fosfato y ATP respectivamente (Tabla 1). Otros sustratos fueron defosforilados por la enzima a una velocidad muy baja como es el caso de la glucosa 6 fosfato.

| Sustratos | % de actividad respecto al control |
|----------------------|------------------------------------|
| Adenosina trifosfato | 74.71 ± 0.005 |
| Pirofosfato | 659.32 ± 0.040 |
| Adenosina difosfato | 68.67 ± 0.025 |
| Glucosa 6 fosfato | 4.39 ± 0.002 |
| Fosfoenolpiruvato | 142.82 ± 0.025 |
| Glucosa 1 fosfato | 406.03 ± 0.103 |
| Ácido Fítico | 109.88 ± 0.015 |
| Polifosfato | 448.89 ± 0.064 |

Tabla 1. Especificidad de sustrato de la fosfatasa. La cuantificación de hidrólisis es dada con relación a la cantidad de *p*-NPP tomada como el 100%. La velocidad con *p*-NPP fué de $91.73 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$ para 5 mM de sustrato.

Propiedades cinéticas de la fosfatasa contra sustratos naturales

Los parámetros cinéticos de los cuatro mejores sustratos fueron calculados determinando la velocidad de la reacción a diferentes concentraciones. Mediante un programa de computación los valores de K_m y V_{max} fueron obtenidos (Tabla 2). La especificidad más alta medida como V_{max}/K_m fué obtenida para pirofosfato.

| Sustrato | K_m (mM) | V_{max} (Umg ⁻¹ prot) | V_{max}/K_m Umg ⁻¹ mM ⁻¹ |
|----------------------|---------------|---------------------------------------|---|
| Polifosfato | 1.44 | 120.6 | 83.75 |
| Pirofosfato | 1.20 | 121.4 | 109.5 |
| Glucosa1 fosfato | 1.78 | 66.6 | 37.41 |
| Adenosina trifosfato | 1.57 | 40.14 | 25.29 |
| p-NPP | 7.684 | 162.29 | 21.81 |

Tabla 2. Propiedades cinéticas de la fosfatasa Inducida por deficiencia de Pi y purificada.

Acción de los efectores.

El efecto de algunos compuestos sobre la actividad de la fosfatasa fué evaluado (Tabla 3). Los datos indicaron que la enzima es fuertemente inhibida por molibdato, fosfato y vanadato, mientras que el nitrato, sulfato, fluoruro y tartrato presentan una inhibición parcial.

| Efectores | Actividad (% control) |
|-----------|-----------------------|
| Molibdato | 2.96 ± 0.089 |
| Nitrato | 45.84 ± 0.002 |
| Sulfato | 21.93 ± 0.003 |
| Fosfato | 0 |
| Fluoruro | 60.27 ± 0.005 |
| Vanadato | 0 |
| Tartrato | 74.53 ± 0.012 |
| Calcio | 67.32 ± 0.009 |

Tabla 3. Efecto de algunos efectores sobre la actividad de. Cada anion y ión metálico fué usado a una concentración de 10 mM. Solo fueron usadas sales de sodio para los aniones y cloruros para los cationes. La actividad fué calculada usando p-NPP como control del 100% de actividad.

DISCUSIÓN

Las respuestas que presentan las plantas que crecen en condiciones de deficiencia de Pi son claras y específicas; desde el alargamiento del sistema radical, la formación de pelos radicales y raíces laterales, hasta la exudación de ácidos orgánicos y fosfatasa (Lynch y Beebe, 1995). En el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad negro INIFAP, las respuestas tanto morfológicas como bioquímicas fueron similares a las reportadas para otras especies (Narang et al., 2000). Esta variedad mostró un sistema radical más desarrollado, incremento en exudados radicales, aumento en la actividad de fosfatasa y un acortamiento importante en el crecimiento del vástago. Comparando dos variedades de frijol que difieren en su tolerancia a la deficiencia en Pi, se observó que existían cambios importantes en la composición de isoformas con actividad de fosfatasa presentes en la raíz (datos no mostrados). En este sentido, el objetivo del trabajo fue identificar una fosfatasa que se estimulara por la deficiencia en Pi y conocer algunas de sus propiedades.

En extractos de raíz sometidos a deficiencia de Pi se encontraron presentes varias isoformas con actividad de fosfatasa. Una en particular, la isoforma de más rápida migración, fue elegida para ser purificada y caracterizada. En el esquema inicial de purificación para esta fosfatasa, se utilizaron columnas de intercambio iónico. A pesar de que estas columnas daban un buen rendimiento y separaban a las fosfatasas de otras proteínas, las diferentes isoformas elulan conjuntamente. Ahora se sabe que al menos la forma de rápida migración y una forma de lenta migración tienen pI muy cercano (alrededor de 4.5), razón por la cual la separación fue difícil en este tipo de columnas.

La utilización del mini-prep cell permitió obtener una preparación muy purificada de la fosfatasa de rápida migración y sobre todo separada del resto de las isoformas. El SDS-PAGE mostró en la fracción purificada tres bandas, una mucho más intensa de 35 kDa y otras dos de aproximadamente 45 kDa y 65 kDa. Los experimentos en la columna de filtración molecular confirmaron que la banda de 35 kDa corresponde a la fosfatasa, mientras que los otros dos polipéptidos son formas contaminantes acarreadas a lo largo del proceso de

purificación. Adicionalmente, éstos resultados indican que en su forma nativa la enzima se encuentra como monómero. Las masas moleculares de algunas fosfatasa alcalinas de plantas han sido determinadas. Para el caso de amaranto la proteína tiene una masa molecular de 33 kDa (Mukherjee y Pal., 1983), la de maíz de 36 kDa (Bennett et al., 1973), la de sorgo de 43 kDa (Krishnan y Gnanam., 1988) y en el caso de hojas de espinaca de 53 kDa (Jiang et al., 1997). En contraste, las fosfatasa ácidas normalmente se encuentran en monómeros o dímeros pero de masas moleculares nativas más altas (Duff, et al., 1994).

El pH óptimo de la fosfatasa inducida en raíces de frijol fué de 8 y de acuerdo a las clasificaciones establecidas corresponde a una fosfatasa alcalina. Los resultados de estabilidad indican que lo que principalmente se afecta por el pH es la estructura de la fosfatasa y no la actividad, pues ambas gráficas muestran un comportamiento similar.

La fosfatasa alcalina purificada en éste trabajo presenta una marcada estabilidad a altas temperaturas, alcanzando niveles de temperatura óptima para su catálisis de 70°C en presencia de su sustrato; en ausencia del sustrato, la enzima tiene una temperatura óptima de alrededor de 37°C. Dentro de las fosfatasa alcalinas más estudiadas, se encuentran las de camote y soya (Penheiter et al., 1997; Durmus et al., 1999). Son proteínas comprendidas dentro del grupo de las metaloenzimas, las cuáles contienen un ión metálico en su centro catalítico. Se sabe que algunas fosfatasa alcalinas como la de cotiledón de ajonjolí también requieren de un ión para su actividad óptima, en este caso es el Mg^{2+} . Este cofactor, además de ser requerido para la actividad catalítica, también le confiere una protección con respecto a la desnaturalización por efecto de la temperatura llevándola a soportar temperaturas de hasta 50 °C (Hemalata y Prasad, 2002). Otro tipo de fosfatasa alcalinas son las de hongos asociados a plantas, éstas enzimas presentan características de termoestabilidad de hasta 115°C (Zappa et al., 2001). Se ha postulado que la interacción entre el sustrato y la enzima le confiere cambios en su estructura que les permite tolerar ésas condiciones extremas.

Los valores de K_m determinados para algunas de las fosfatasa estudiadas en plantas indican rangos entre 0.07 a 3.5 mM utilizando *p*-NPP como sustrato (Duff, et al., 1994). El valor determinado para la fosfatasa alcalina purificada en este trabajo es de 7.6 mM, valor un poco arriba del obtenido para las otras enzimas. Es probable que no todas las enzimas estén en el mismo grado de pureza y eso afecte la interacción con su sustrato. Utilizando sustratos naturales, observamos que la fosfatasa alcalina de frijol presenta una actividad diferencial. Los valores de K_m para los compuestos que fueron hidrolizados a una velocidad mayor como PPI, pólifosfato, glucosa-1 fosfato y ATP se encontraron en un rango entre 1.2 y 1.7 mM. Existe muy poca información en la literatura sobre parámetros cinéticos utilizando sustratos naturales, por lo que es muy difícil comparar éstos parámetros con enzimas de otras especies.

Tomando en cuenta la constante de especificidad V_{max}/K_m , el pirofosfato y el polifosfato fueron los sustratos hidrolizados más eficientemente con valores específicos de 109.5 y 83.75 U mg^{-1} prot mM^{-1} . El hecho de que esta fosfatasa pueda desfosforilar metabolitos celulares específicos como el pirofosfato, podría sugerir un papel importante en la recirculación del Pi intracelular. Algunos reportes han mostrado la importancia de PEP fosfatasa en la deficiencia de Pi y su utilización intracelular, en particular en la glicólisis (Duff et al., 1989). Esta enzima funciona como un puente que se activa cuando la cantidad de Pi es limitante y la concentración de ADP y ATP se encuentra reducida 8 y 16 veces respectivamente. En esta situación, la piruvato cinasa que requiere de ATP para la conversión de fosfoenopiruvato a ácido piruvico se inactiva por la deficiencia de su sustrato y la PEP fosfatasa provee del Pi necesario para la continuación de la vía sin necesidad de la utilización del ADP y ATP libres en el citosol, liberando además cantidades de Pi (Lefevre et al. 1990).

Hasta ahora no se sabe de ninguna pirofosfatasa que se active en condiciones de deficiencia de Pi, pero la especificidad hacia el pirofosfato y algunas características compartidas con otras pirofosfatasas como con la de hojas de espinaca (Jiang et al., 1997) que presenta pH alcalino (8.5 - 9) y que es un monómero y con la pirofosfatasa de cotiledón de amaranto (Hemalatha y Siva,

2002) que muestra además de un pH alcalino, una importante estabilidad a la temperatura y una masa molecular de 20.8 kDa en forma de monómero, nos llevan a pensar que la enzima purificada se trata de una pirofosfatasa alcalina que puede estar presente en el citosol. Un factor importante para la definición de pirofosfatasas es su gran dependencia de iones Mg^{2+} para llevar a cabo su actividad. Las condiciones que utilizamos siempre contaban con presencia de Mg^{2+} y es necesario realizar un control en donde se evalúe el efecto de la ausencia del ion sobre la actividad.

Estudios de inhibición muestran al fluoruro, fosfato, molibdato y vanadato como típicos inhibidores de las fosfatasas. Las fosfatasas ácidas púrpura son las únicas que presentan resistencia a la inhibición por tartrato (Duff, et al., 1994). Las fosfatasas alcalinas en plantas han sido poco estudiadas y reportes de inhibidores son raros. En hongos, se han presentado reportes en los que se observa una inhibición con molibdato y vanadato (Zappa et al., 2001). En el caso de la fosfatasa alcalina de frijol, se observó que el fosfato y vanadato ejercen una inhibición total. Ningún compuesto de los evaluados presentó un efecto activador.

Las características de la enzima purificada deben de estudiarse en conjunto con las demás fosfatasas presentes en raíz de frijol sometidas a inanición de Pi. Algunos estudios (no mostrados en este trabajo) parecen indicar que la enzima de más lenta migración puede tener características de fosfatasa ácida y no básica como la de rápida migración. Esto es importante pues de esta forma la planta contará con la facilidad obtener Pi de diversos sustratos y así suplir más rápidamente su deficiencia, pues cada una de las enzimas presentará características cinéticas y bioquímicas específicas.

El trabajo muestra perspectivas muy importantes con respecto a las enzimas inducidas en raíces de frijol crecidas en deficiencia de Pi ya que para poder tener un conocimiento completo es necesario estudiar todas las posibilidades de cambios y modificaciones que esta condición genera en la planta. Sería importante establecer en un futuro condiciones que nos indiquen si éstas enzimas intracelulares son en realidad una opción para la adaptación de las plantas a la deficiencia en Pi.

CONCLUSIONES

- 1) Las raíces de plantas de frijol negro INIFAP crecidas en deficiencia de Pi inducen el aumento en actividad de una fosfatasa de 35 kDa de masa molecular.
- 2) El pH óptimo de la fosfatasa fué de 8 lo cuál la clasifica dentro de las fosfatasas alcalinas.
- 3) La fosfatasa alcalina de raíces de frijol presenta una alta estabilidad térmica cuando es incubada con su sustrato.
- 4) La fosfatasa alcalina de frijol presenta una especificidad mayor para desfosforilar sustratos naturales como pirofosfato, lo cuál podría clasificarla como una pirofosfatasa.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

Abel S, Nurnberger T, Ahnert V, Krauss G-J, Glund K (2000) Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of culture tomato cells. *Plant Physiol.* 122: 543-552.

Ames BN (1996) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Meth Enzymol* 8: 115-118

Baldwin JC, Karthikeyan AS, Raghothama KG (2001): *LEPS2*, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology.* 125:728-737.

Basha SM (1984) Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed. *Can J Bot* 62: 385-391

Bates TR y Lynch JP (2000) The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *Am. J Botany.* 87(7): 964-970

Bennett, VL, Ristrophe, DL, Hamming, JJ and Butler, LG (1973) Maize leaf inorganic pyrophosphatase: isozymes, specificity for substrates, inhibitors, and divalent metal ions, and pH optima. *Biochim. Biophys. Acta.* 293: 232-241

Bieliski RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:225-252.

Bradford MM (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.

Coello P (2001) Respuesta de plantas a la deficiencia en fosfato. En avances de bioquímica y biología molecular de plantas. Irma Bernal Lugo, Herminia Loza eds.p.p 43-54

Coello P (2002) Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 116: 293-298

del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, de la Peña A, Aragoncillo C, Paz-Ares J (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J* 19: 579-589.

Dewald DB, Manson HS y Mullet JE (1991)The soybean vegetative storage proteinsVSG and VSPB are acid phosphatases active on polyphosphate. *J. Biol. Chem.* 267: 15958-15964

Duff SMG, Lefevre y Plaxton WC (1989) Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* 90: 734-741

Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plantarum* 90: 791-800.

Durmus A, Eicken C, Sift Bh, Kratel A, Kappl R, Hutternann J, Krebs B (1999) the active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). *Eur J Biochem.* 260:709-716

Gellatly K, Moorhead Duff SMG, Lefevre y Plaxton WC (1993) Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosin phosphatase. *Plant Physiol.* 90, 754-741

Gibson D.M. y Ullah A.H. (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Arch. Biochem Biophys. 260: 503-513

Gilbert GA (1999) Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient White Lupin roots. Plant cell and environment 22: 801-810

Green OJ (1994) The ribonucleases of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 45: 421-445.

Goldstein A, Danon A, Baertlein D, McDaniel R (1998) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon sculentum* II. Characterization of the phosphate starvation inducible excreted acid phosphatase. Plant Physiol. 87: 716-720.

Grotz N y Guerinot ML (2002) Limiting nutrients an old problem With new solutions?. Plant Biology. 5: 158-163

Hemalatha KPJ y Siva Prasat (2002) Purification, physicochemical properties, and subcellular location of alkaline inorganic pyrophosphatase from sesame (*Sesamum indicum* L.) cotyledons. Biochem. Cell Biol. 80:215-224.

Hoch y Silhavy (1995) Two component signal transduction. Asm Press. p.p 203-210

Holford ICR (1997) Soil phosphorus: its measurements and its uptake by plants. Aust. J Soil Res. 35: 227-239

James A Hoch and Thomas J. Silhavy. Two-component signal transduction; ASM press Unites States of america,1995. p.p 203-210

Jiang SS, Fan LL, Yang SJ, and Pan RL (1997) Purification and characterization of tylokoid membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Spinacia oleracia* L. Arch. Biochem. Biophys. 346: 105-112.

Joner EM y Van Aarle MI (2000) Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: a review. *Plant and Soil*. 226: 199-210.

Krishnan VA y Gnanam A (1998) Properties and regulation of Mg²⁺ dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase from *Sorghum vulgare* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 277-248

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227:680-685

Lebransky BR, Mcknight y Lawrence (1992) Purification and characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures. *Plant Physiol.* 99: 391-395

Lefevre DD, Duff SMG, Fife C, Julien-Inalsingh C, Plaxton WC (1990) Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi- absorption rate. *Plant Physiol.* 93: 504-511.

Lenburg ME and O'Shea EK (1996) Signaling phosphate starvation. *Science*. 21: 383-387.

Liu C, Munchhal US, Uthappa M, Kononowich AK, Raghothama KG (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol.* 116: 91-91.

López Bucio J, Martínez De la Vega O, Guevara García A and Herrera-Estrella L (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plant that overproduce citrate. *Nature Biotechnology*. 18:450-453

Lynch JP y Beebe SE (1995) Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *Hort Science*. 30:1165-1171.

Marshner (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2^{ed} Academic Press, Cambridge, London p.p.605-626, 641-657, 457-458, 549, 554, 350

Miernyck JA (1992) Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme secreted by maize endosperm cultures. *Phytochemistry*, 31: 2613-2616

Miller SS (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed. *Plant Physiol.* 127: 594-606

Mukherjee JJ y Pal RR (1983) Multiple forms of inorganic pyrophosphatase from the leaf of *Amarantus Blitum* L. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2973-2975

Muchna US, Pardo JM, Raghothama KG (1996) Phosphate transporters from the *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*: 93: 10519-10523

Narang RA, Bruen A y Altman T (2000) Analysis of phosphate Acquisition efficiency in different *Arabidopsis* Accessions. *Plant Physiol.* 124: 1786-1799

Oshima Y (1982) Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate. En: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: metabolism and gene expression*. Strathern J, Jones TW, Broach JR (ed) CSHL Press p.p. 159-180

Panara F, Pasqualini S y Antonielli M (1987) Multiple forms of barley root acid phosphatase: Purification and some characteristics of the major cytoplasmic isozyme. *BiochemBiophys. Acta*: 1037: 73-80

Parkinson JS (1993) Signal Transduction Schemes of bacteria, *Cell*. 73: 857-871

Paul AM y Williamson (1987). Purification and properties of acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato cultivar. *Plant Physiol.* 84: 399-403

Penheiter AR, Duff SMG, Sarath G (1997) Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiol.* 114: 597-604

Posadas E y Manriquez LR (1995) Congreso anual de frijol CIAT. Colombia

Ragothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 50:665-693.

Ragothama KG (2000) Phosphate transport and signaling. *Plant Biology.* 3: 182-187.

Rosas MA, Lopez F y Martinez JL (1995) Congreso anual de frijol CIAT. Colombia

Schatman DP y Reid RJ (1998) Phosphorus uptake by plants from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453

Shinano T y Yonetani R (2001). Characteristics of phosphoenolpyruvate phosphatase purified from *Allium cepa*. *Plant Science.* 161: 861-869

Scopes RK. *Protein Purification Principles and Practis.* 3° ed. Australia 1993 p.p 29, 31, 37, 46, 50-51, 76-85, 81-83, 338

So JY y Shawn M. Kaeppler (2001) Induction of maize phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant and Soil.* 237: 109-115

Theodorou ME y Planxton WC (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101: 339-344

Ticconi Ca y de la Torre CA (2001) Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 127: 963-972

Yan X, Liao H, Trull MC, Beebe SM y Lynch JP (2001) Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. *Plant Physiol.* 1901-1911.

Zappa S, Rolland JL, Fament D, Gueguen Y, Boudrant J and Dietric J (2001) Characterization of a highly thermostable alkaline phosphatase from the Euryarcaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(10): 4504-4511