

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“RESPUESTA DE SOYA A LA DEFICIENCIA DE  
FOSFATO Y SOBREEXPRESIÓN DE FITASA EN  
PLANTAS TRANSGÉNICAS”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**SELENE FRAGOSO IÑIGUEZ**

Tutora: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

México, D. F.

Febrero 2004

FRAGOSO IÑIGUEZ SELENE 2004





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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

*A mi familia:*

*Marcos, Ana María, Israel, Marisol, Ahui y Juanjo*

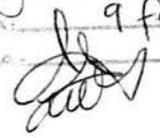
*quienes siempre han estado conmigo y creen que soy capaz de  
hacer todo lo que me proponga*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Selene Fragoso

Iniguez

FECHA: 9 febrero 2004

FIRMA: 

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Coello porque siempre he contado con su asesoría, paciencia y comprensión.

A los miembros del comité tutorial por su asesoría y orientación

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo

A los doctores Felipe Cruz y Eleazar Martínez por el tiempo que dedicaron a escuchar mi proyecto

A mis amigos y compañeros de Laboratorio por todo su apoyo, en especial a Lore Caty, Andre, Carina y Martín

A Lilia por sus buenos consejos

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, en el laboratorio 105 del edificio E del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Dra. Alejandra Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotrés	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Sonia Vázquez Santana, del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, para la tinción y observación microscópica de raíces.

Este trabajo fue apoyado por PAIP 6290-13 y DGAPA IN201 501, IN201 101

Para la realización de la presente tesis, durante los estudios de maestría gocé de las becas otorgadas por CONACYT y DEGEP-UNAM

Esta tesis fue defendida oralmente ante un Jurado de Examen de Maestría constituido por:

Presidente	Dra. Estela Sánchez de Jiménez	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Alejandra Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. María Amánda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. María Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

## RESUMEN

El fósforo (P) es uno de los elementos indispensable para la nutrición. Su importancia radica en que es componente esencial de biomoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y nucleosidos fosfato. En las plantas, su deficiencia causa graves problemas e incluso la muerte en etapas tempranas del desarrollo.

Las plantas adquieren el P en forma de ortofosfato( $P_i$ ), el cual es muy reactivo y forma complejos en el suelo muy estables prácticamente insolubles, por lo que el  $P_i$  se encuentra inaccesible para las plantas, colocándolas en condiciones permanentes de baja disponibilidad de este nutrimento.

Para contrarrestar los efectos negativos de la deficiencia de  $P_i$ , las plantas han desarrollado estrategias que les permiten adquirir y utilizar el  $P_i$  de una manera más eficiente. El conocimiento de las respuestas ante la deficiencia de  $P_i$  que presentan algunos cultivos de interés comercial como la soya, puede ser de utilidad para implementar estrategias que ayuden a obtener cultivos resistentes a este estrés. Es por ello que uno de los objetivos de este trabajo es conocer la respuesta de soya a la deficiencia de  $P_i$ .

Los resultados mostraron que la soya var. Tapachula 86, presenta modificaciones en el sistema radical durante la deficiencia de  $P_i$ , como son la elongación de la raíz y el aumento en la densidad y longitud de los pelos radicales. Además, aumenta la velocidad de toma de  $P_i$  y se secretan fosfatasas ácidas al medio extraradical, sin embargo entre estas últimas no se detectó actividad de fitasa.

Al igual que la soya, *Arabidopsis thaliana* tampoco presenta actividad de fitasa en el medio extra-radical y por eso se evaluó en esta especie si la sobreexpresión de la fitasa de *Escherichia coli* le confería alguna ventaja al crecer en un medio con ácido fítico. Los resultados indicaron que una de las líneas transgénicas con expresión de fitasa, incrementó su capacidad de crecimiento en ácido fítico, mientras que otra línea con mayor capacidad de secreción, mostró un crecimiento igual al control, por lo que no es posible concluir si el secretar fitasa es benéfico o no para las plantas y se hace necesaria la realización de otros experimentos que determinen de manera cuantitativa el efecto de secretar fitasa.

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Nutrición vegetal	1
1.2 Fósforo	1
1.3. Respuestas a la deficiencia de Pi	3
1.3.1 Modificaciones a nivel radical	4
1.3.1.1 Micorrizas Arbusculares	4
1.3.1.2 Crecimiento y arquitectura radical	5
1.3.2 Acidos orgánicos y acidificación del medio extraradical	9
1.3.3 Fosfatasas ácidas	11
1.3.4 Toma de Pi	13
1.4 Soluciones Biotecnológicas	15
1.5 Justificación	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS GENERALES	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	19
II.1. Caracterización de la respuesta de soya a la deficiencia de fosfato	19
II.2 Obtención de las construcciones para transformar <i>Arabidopsis thaliana</i> .	22
II.3. Caracterización de las plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
III. RESULTADOS	28
III.1. Caracterización de la respuesta de soya a la deficiencia de Pi	28
III.1.1. Diferencias morfológicas	28
III.1.2. Altura y peso	31
III.1.3. Contenido de Pi	33
III.1.4. Secreción de Fosfatasas ácidas.	35
III.1.4.1. Fosfatasa ácida	35
III.1.4.1.2 Fitasa	39
III.1.4.1.3. Actividad de fosfatasa <i>in vivo</i>	40
III.1.5. Acidificación del medio extracelular	41
III.1.6. Toma de Pi	42
III.2. Obtención de las plantas Transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
III.2.1. Aislamiento del péptido señal de <i>Arabidopsis thaliana</i> y clonación en fase de con la fitasa <i>Escherichia coli</i> .	43

III.2.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
III.2.3. Transformación de <i>Arabidopsis Thaliana</i>	46
III.3. Caracterización de las plantas transgénicas	48
III.3.1. Actividad de fitasa	48
III.3.2. Crecimiento en ácido Fítico	49
IV. DISCUSIÓN	51
V. CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57

# I. INTRODUCCIÓN.

## I.1 Nutrición vegetal.

Las plantas necesitan de ciertos nutrimentos esenciales para mantener un crecimiento y desarrollo óptimo. Estos elementos son divididos entre los que se requieren en mayor cantidad o macronutrimentos como el nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, y los que sólo se utilizan en cantidades traza o micronutrimentos como boro, zinc y selenio, entre otros. Tanto los macro como los micronutrimentos se encuentran en el suelo en forma de sales disueltas y asociadas con partículas como arcillas y arenas, conformando lo que se conoce como la solución del suelo. Estas sales se encuentran dispersas en la solución por lo que las plantas tienen que explorar una gran superficie para poder acceder a ellas. Los suelos no siempre contienen todos los elementos necesarios para la nutrición vegetal y generalmente se presentan deficiencias por la carencia de alguno o varios de estos elementos. Debido a que los macronutrimentos se necesitan en mayor escala, las deficiencias de éstos resultan generalmente más drásticas, que las de los micronutrimentos.

## I.2 Fósforo

Después del nitrógeno, el fósforo (P) es el nutrimento que limita más el crecimiento y desarrollo de las plantas. En los seres vivos mucho del fósforo presente se encuentra en forma de fosfato ( $P_i$ ), el cual es un componente esencial de biomoléculas como ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos. Los enlaces que forma el  $P_i$  con otras moléculas son generalmente de alta energía y pueden ser utilizados para mantener la maquinaria metabólica de las células. Además, el  $P_i$ , al ser tanto sustrato como producto final de muchas reacciones enzimáticas, participa en la regulación de vías metabólicas y en la transducción de señales.

La deficiencia de  $P_i$  durante el desarrollo de las plantas puede hacer que el crecimiento de éstas se vea afectado a diferentes niveles. Dependiendo de la severidad de la deficiencia, la planta puede presentar un color verde oscuro con manchas purpúreas o cloróticas y si consigue florecer o fructificar, el rendimiento estará muy por debajo de los estándares de una planta sana. Si la deficiencia es mayor, la planta puede detener el desarrollo y dejar de reproducirse, muriendo en etapas tempranas.

Las principales causas de deficiencia de  $P$  se deben a que las plantas son incapaces de tomarlo en otra forma que no sean iones ortofosfato ( $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$ ). En el suelo se encuentran estos aniones, pero dada su alta reactividad, es más fácil encontrarlos en forma de sales de  $P_i$  precipitadas, ésteres de  $P_i$ , como fitato, y más raramente como fosfonatos, de manera que a pesar de ser un elemento abundante en el suelo, no se encuentra disponible para las plantas (Grossman y Takahashi, 2001).

La mayoría de los suelos, cultivables o no, tienen una concentración muy limitada de  $P_i$  ( $<10\mu m$ ). Es por ello que se ha tenido que suplir a través del uso de fertilizantes comerciales. Esto acarrea dos grandes problemas, el primero es el alto costo de estos fertilizantes y el segundo la contaminación de agua, debido a que sólo el 20% del fertilizante que se aplica a los suelos se aprovecha por los cultivos y el resto es arrastrado hasta los depósitos subterráneos de agua, lagos y ríos, causando su eutroficación (Grotz y Guerinot, 2002).

Lo anterior hace evidente la necesidad de encontrar alternativas que solucionen el problema de la deficiencia de  $P_i$  sin alterar el ecosistema y una aproximación importante es conocer como a través de la evolución las plantas han logrado crecer y desarrollarse en suelos deficientes de  $P_i$ .

### 1.3 Respuestas a la deficiencia de $P_i$ .

Las plantas deben mantener una concentración constante de  $P_i$  en el citoplasma que les permita realizar sus funciones óptimamente. Para lograrlo liberan el  $P_i$  desde los sitios de reserva (vacuola) hacia los sitios de demanda como son el cloroplasto y el citoplasma. Durante la deficiencia de  $P_i$ , las reservas se agotan rápidamente y es necesario recurrir a otros mecanismos para aminorar los efectos dañinos. Estos pueden agruparse dentro de dos grandes estrategias generales; unas orientadas a mejorar la adquisición del  $P_i$  (PAE, por sus siglas en inglés: Phosphate Acquisition Efficiency) y otras a mejorar la utilización del  $P_i$  interno (PUE, Phosphate Utilization Efficiency) (Yan *et al.*, 2001).

La utilización eficiente del  $P_i$  incluye adaptaciones bioquímicas que permiten reducir los requerimientos del  $P_i$  en los tejidos. Un ejemplo es el que se presenta en la glicólisis. Durante la deficiencia de  $P_i$  las pozas intracelulares de ATP y ADP se encuentran disminuidas 16 y 8 veces respectivamente, por lo tanto la piruvato cinasa, que requiere de ADP como sustrato fosforilable, se inactiva; la célula utiliza una ruta alterna en la que la PEP fosfatasa, que es inducible por deficiencia de  $P_i$ , puede hidrolizar el fosfoenol-piruvato (PEP) para convertirlo a piruvato sin necesidad de utilizar ADP y liberando  $P_i$  que puede ser utilizado en otras vías metabólicas (Duff *et al.*, 1989; Lefevre *et al.*, 1990).

Por otro lado, dentro de las modificaciones para aumentar la absorción de  $P_i$  se encuentra el establecimiento de micorrizas arbusculares (Marshner, 1992), modificaciones en la arquitectura radical (Lynch, 1995), aumento en la secreción de ácidos orgánicos y fosfatasa ácida, acidificación de la rizosfera, (del Pozo *et al.*, 1999), activación de los transportadores de  $P_i$  de alta afinidad (Muchhal *et al.*, 1996) y un incremento en la velocidad de la toma de  $P_i$  (Schachtman *et al.*, 1998).

### 1.3.1 Modificaciones a nivel radical.

#### 1.3.1.1 Micorrizas Arbusculares

Una de las asociaciones más conspicua entre microorganismos y plantas es la de las micorrizas arbusculares (MA), ya que pueden asociarse con la mayoría de las plantas terrestres (West, 1996).

Los hongos que forman MA producen hifas, vesículas y arbuscúlos en el parénquima radical, y una extensa red de micelio unida al sistema radical de las plantas hospederas. Las hifas y arbuscúlos (fig I.1) son las estructuras del hongo más importantes para el aporte de elementos nutrimentales desde la solución del suelo y para el transporte de los mismos a la raíz (Guzmán-Plazola y Ferrera-Cerrato, 1990)



Fig. I.1. Arbuscúlos de MA penetrando células corticales de *Erythronium americanum*. (Brundett, 1999), las hifas se indican por medio de flechas y la A se encuentra sobre un arbuscúlo.

La adquisición de  $P_i$  puede incrementarse de acuerdo con la geometría y morfología de la raíz y es aquí donde las micorrizas parecen tomar importancia para el hospedero ya que estas se desarrollan bajo condiciones nutrimentales limitantes, especialmente de  $P$  (Chiariello, 1982).

Se ha comprobado que las raíces micorrizadas adquieren varias veces más  $P_i$  que las no-micorrizadas (Jasper y Dacy, 1993). Harrison y van Buuren (1995) demostraron la existencia de un transportador de  $P_i$  en la membrana fúngica, lo que lleva a pensar que el transporte de  $P_i$  puede favorecerse en las hifas lo que, a su vez, beneficia al hospedero. Si bien es cierto que los hongos micorrícicos ayudan a la adquisición de  $P_i$ , no participan en su mineralización, de manera que su efecto benéfico se limita a la disponibilidad natural del  $P_i$ .

### 1.3.1.2 Crecimiento y arquitectura radical

El conjunto de características que determinan el crecimiento y configuración del sistema radical en el tiempo y el espacio se denomina arquitectura radical. Durante la deficiencia de  $P_i$ , ésta se ve modificada. Las plantas presentan un incremento en la relación raíz-vástago, lo que se traduce en el aumento del área total de exploración y adquisición de nutrimentos (Raghothama, 1999).

En su revisión de arquitectura radical, Lynch y Brown (2001) presentan resultados sobre la modificación de la raíz de frijol con respecto a la deficiencia de  $P_i$ , haciendo hincapié en que sus observaciones pueden ampliarse a otros sistemas radicales.

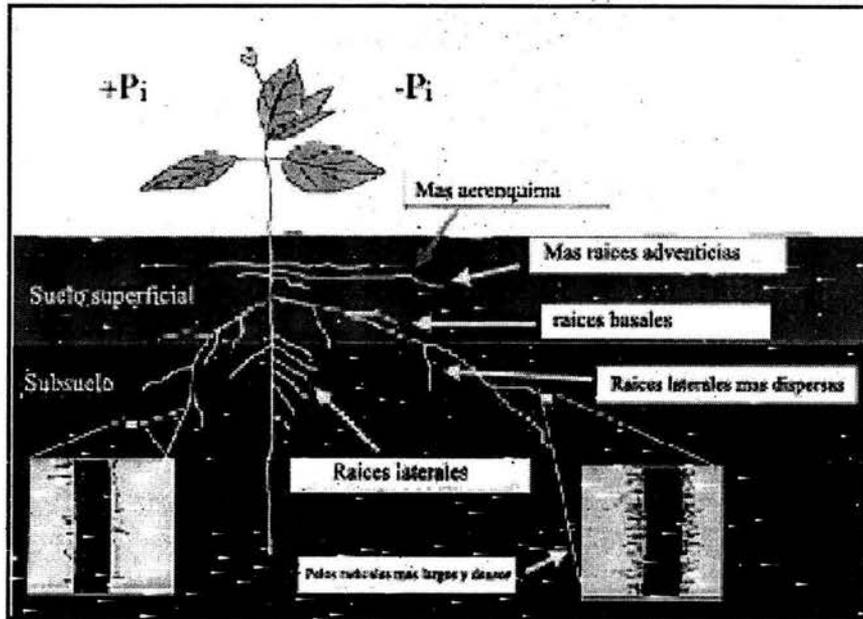


Fig 1.2 Regulación de la arquitectura radical por la disponibilidad de fósforo.  
(Lynch y Brown 2001).

Estos investigadores reportan que en plantas de frijol tolerantes a la deficiencia de  $P_i$ , se producen raíces basales más superficiales, se incrementa el número de raíces adventicias, disminuye la ramificación de raíces laterales y aumenta la densidad y el tamaño de los pelos radicuales. Estos últimos son extensiones subcelulares de la epidermis de la raíz que facilitan la adquisición de nutrientes en la solución del suelo, y cuyo desarrollo está regulado positivamente por etileno (Tanimoto *et al.*, 1995). En conjunto, estas modificaciones favorecen la exploración de las capas superiores del suelo (Fig. 1.2).

Las modificaciones a nivel de arquitectura radical en *A. thaliana* son un tanto diferentes de las que se presentan en frijol, ya que en estas plantas ocurre una inhibición del crecimiento de la raíz principal y proliferación de raíces laterales y de pelos radicuales.

Las ventajas de los pelos radicales se hicieron evidentes en un experimento realizado por Bates y Lynch (2000), en el que compararon el crecimiento de plantas silvestres de *A. thaliana* (WT) con dos mutantes deficientes en el desarrollo de pelos radicales. Cuando las plantas se crecían prácticamente en ausencia de  $P_i$  ( $0.4\mu M$ ) todas las plantas eran pequeñas y mostraban síntomas de deficiencia. A  $1.5\mu M$  las plantas WT tenían más biomasa en el vástago, un mayor contenido de  $P_i$  y presentaban una mayor toma de  $P_i$  que los dos mutantes, mientras que a concentraciones de  $54mM$ , no había diferencia en el crecimiento entre plantas mutantes y silvestres. Concluyeron que el producir pelos radicales puede incrementar la adquisición de  $P_i$  durante la deficiencia.

Los efectos de la baja disponibilidad de  $P_i$  sobre los pelos radicales en *A. thaliana* se pueden resumir en el incremento de la longitud y la densidad de éstos, un aumento en el número de células que los originan y un acortamiento de la distancia desde donde se comienzan a formar y el meristemo apical. Todas estas características contribuyen a una mayor adquisición de  $P_i$  de manera individual, sin embargo al actuar sinérgicamente aumentan su rango de adquisición de 30 a 400% (Ma *et al.*, 2001)

Otra adaptación que se presenta ante la deficiencia de  $P_i$  en la raíz, es la formación de raíces proteoides. Estas son raíces laterales terciarias, densamente agrupadas descritas originalmente en miembros de la familia *Proteaceae*. Ahora se sabe que se encuentran en una gran variedad de especies de diversas familias. Entre las leguminosas que pueden formar raíces proteoides sobresale una especie de interés comercial, *Lupinus albus*, que puede adquirir  $P_i$  desde fuentes inaccesibles para otras plantas (McCully, 1999). La morfología de las raíces proteoides puede contribuir a los altos niveles de movilización del  $P_i$  debido a un incremento en el área de superficie de raíz que secreta exudados (ácidos orgánicos y fosfatasas ácidas) y no tanto por el volumen de suelo que se explora (Neuman y Martinoia, 2002).

Estas modificaciones radicales surgen de una manera coordinada lo que sugiere un mecanismo común de regulación que pudiera estar mediado por acción hormonal (López-Bucio *et al.*, 2002).

Se ha demostrado la importancia de hormonas vegetales en la regulación de algunas respuestas, por ejemplo en *Lupinus albus* y *A. thaliana*, la aplicación de inhibidores del transporte de auxinas (TIBA y NPA) inhibe la formación de raíces proteoides o de raíces laterales durante condiciones deficientes de Pi (Gilbert *et al.*, 2000) por lo que podrían ser necesarias para la formación de estas estructuras.

Las auxinas y el etileno se requieren para el alargamiento de los pelos radicales (Tanimoto *et al.*, 1995). Además el etileno, parece estar relacionado directamente con la arquitectura radical, ya que se ha demostrado que plantas de frijol que se someten a deficiencia producen más etileno, que aquellas creciendo en condiciones de suficiencia nutrimental lo que parece tener repercusiones en la formación de aerénquima y de raíces más superficiales (Lynch y Brown, 1997).

Finalmente, las citocininas suprimen la iniciación de las raíces laterales en plantas creciendo en bajo Pi (López-Bucio *et al.*, 2002). El incremento en el tamaño de la raíz en respuesta a la deficiencia de Pi, se relaciona con una disminución en el contenido de citocininas. Además, la aplicación exógena de estas últimas reprime la expresión de genes regulados por la baja disponibilidad de Pi, haciendo evidente el antagonismo que existe entre ambas respuestas (Martín *et al.*, 2000)

Se ha postulado que las modificaciones morfológicas en las plantas que están sometidas a deficiencia de Pi, son una característica determinante para su supervivencia, ya que parecen estar seleccionadas evolutivamente para facilitar la adquisición de Pi.

Además de las modificaciones morfológicas, existen otras a nivel bioquímico que también promueven la adquisición del Pi, como son la secreción de exudados y la modificación en la toma de Pi.

### 1.3.2 Ácidos orgánicos y acidificación del medio extra-radical.

La secreción de ácidos orgánicos a través de las raíces es un fenómeno que se asocia a diversos estímulos, entre ellos a la deficiencia de  $P_i$  (cuadro I.1).

Cuadro I.1. Especies en que se ha reportado el aumento en la exudación de aniones orgánicos durante los diferentes estímulos. (Ryan et al., 2001)

Especie	Principal anion orgánico exudado	Estimulo	Comentarios
Trigo	Malato	+Al	Ápices radicales
Maíz	Citrato	+Al	Ápices radicales
Tabaco	Citrato	+Al	Ápices radicales
<i>Cassia tora</i>	Citrato	+Al	Toda la raíz
Triticale	Citrato	+Al	Toda la raíz
Centeno	Citrato	+Al	Toda la raíz
Soya	Citrato	+Al	Toda la raíz
Girasol	Citrato	+Al	Toda la raíz
Avena	Citrato	+Al	Toda la raíz
Rábano	Citrato	+Al	Toda la raíz
<i>Brassica napus</i>	Citrato, malato	+Al, $P_i$	Toda la raíz
<i>Parasaccharis falcata</i>	Citrato	+Al	Toda la raíz
<i>A. thaliana</i>	Citrato	+Cu	Toda la raíz
Arroz	Citrato	- $P_i$	Rizosfera
Lupinus albus	Citrato, malato	- $P_i$	Raíces proteoides
Alfalfa	Citrato	- $P_i$	
Garbanzo	Malonato, tartrato, citrato, fumarato	-Fe	
Maíz	Malato, citrato	ND	Toda la raíz

La exudación de estos compuestos resulta importante para las plantas en deficiencia de  $P_i$  ya que pueden contribuir a la liberación de  $P_i$  desde fosfatos de  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{2+}$ . El mecanismo por el cual se libera  $P_i$  de los compuestos fosfatados de aluminio y  $Fe$  por medio de ácidos orgánicos es a través de la sustitución del  $P_i$  por el anión orgánico, como se esquematiza en la figura 1.3. (Marschner, 1995).

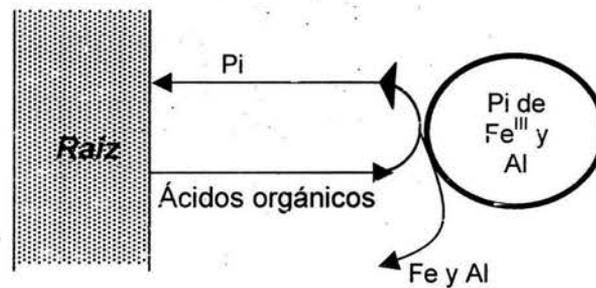


Fig. 1.3. Esquema del mecanismo de liberación de  $P_i$  mediado por ácidos orgánicos

Debido a que la secreción de ácidos orgánicos se da en plantas creciendo en suelos ácidos, donde existe un alto contenido de aluminio y una baja concentración de  $P_i$  disponible, es difícil determinar si se exudan en respuesta a la deficiencia de  $P_i$  o a la toxicidad por aluminio. Sin embargo, existen datos experimentales demuestran que en respuesta a ambos estímulos existe secreción de ácidos orgánicos (Zhang *et al.*, 1997; Sas *et al.*, 2000).

Durante la deficiencia de  $P_i$  los niveles de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos orgánicos se incrementan; tal es el caso de la PEP carboxilasa en chícharo, jitomate y *Brassica nigra* y la citrato sintasa en lupinus y colza. Este incremento, correlaciona con

el aumento en la secreción de ácidos orgánicos que presentan varias especies en respuesta a la deficiencia de  $P_i$  (López-Bucio *et al.*, 2000).

### 1.3.3 Fosfatasas ácidas

Un número muy grande de plantas responde a la deficiencia de  $P_i$  con el incremento en la producción de fosfatasas, enzimas capaces de hidrolizar ésteres fosfatados (Vincent *et al.*, 1992). Considerando que el contenido de P orgánico puede alcanzar hasta el 80% en algunos suelos, se piensa que las fosfatasas extracelulares pueden tener un papel muy importante en la liberación de  $P_i$  desde fuentes orgánicas. De la misma forma, las fosfatasas intracelulares pueden estar regulando el suplemento de  $P_i$  desde fuentes orgánicas internas (Grossman y Takahashi, 2001).

Las fosfatasas se han clasificado tradicionalmente como ácidas o alcalinas dependiendo de su pH óptimo para catálisis (Duff, *et al.*, 1994). Las alcalinas en plantas presentan una especificidad por sustratos muy estricta y juegan papeles específicos en el metabolismo. En raíces de frijol se identificó una fosfatasa alcalina que estimula su actividad por deficiencia de  $P_i$ ; esta enzima presenta una masa molecular de 35 kDa y está constituida por un solo polipéptido. Tiene una preferencia muy marcada en la defosforilación de  $PP_i$ , pero no es una pirofosfatasa estricta porque no depende de  $Mg^{2+}$  (Morales y Coello, 2003). Se sabe que la poza de  $PP_i$  aumenta durante la deficiencia de  $P_i$  (Poirier y Bucher, 2002) por lo que esta enzima podría jugar un papel importante en la obtención de  $P_i$ .

En contraste, las fosfatasas ácidas son inespecíficas, con excepción de la fosfatasa del fosfoenol piruvato (Duff *et al.*, 1989). En extractos proteicos de plantas de *A. thaliana* se ha encontrado actividad de fosfatasa ácida en proteínas con rangos de masa molecular desde 30 hasta 120 kDa, que se incrementan durante la deficiencia de  $P_i$  (Trull y Deikman, 1998). La purificación de una fosfatasa ácida de 34 kDa, permitió el aislamiento de su gen (del Pozo *et al.*, 1999). La porción N-terminal de esta

proteína, denominada (AtACP5), tiene características de un péptico señal, lo que indicaría que esta enzima es extracelular. El análisis de su expresión indica que es estimulada por deficiencia de  $P_i$ , así como por estrés salino, peróxido de hidrógeno, ácido abscísico (ABA) y que se localiza particularmente en raíces vástagos y tejidos senescentes. Esta fosfatasa puede estar involucrada en la movilización de  $P_i$  y en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno en partes de la planta senescentes o sujetas a estrés (del Pozo *et al.*, 1999).

La regulación de la exudación de fosfatasa ácida no ha sido claramente establecida. Actualmente se sabe que en plantas de *A. thaliana*, el promotor de una fosfatasa ácida que es secretada se activa específicamente por los bajos niveles de  $P_i$  (Haran *et al.*, 2000). La caracterización bioquímica de una enzima que podría ser la codificada por este gen, demostró que puede hidrolizar compuestos fosfatados naturales como  $PP_i$ , polifosfato, ATP y PEP, a un pH óptimo de entre 4 y 5 (Coello, 2002).

En el suelo las fosfatasa secretadas por plantas y microorganismos juegan un papel muy importante al liberar  $P_i$  desde fuentes orgánicas. Estas enzimas no están libres en solución, sino se asocian con partículas del suelo lo que les provee mayor resistencia a la degradación (Rao *et al.*, 2000). Mientras que la mayoría de las enzimas se desnaturalizan rápidamente en el suelo, las fosfatasa son activas; además las fosfatasa ácida tienen generalmente un pH óptimo en el mismo rango que el pH que las rodea y pueden mantener su actividad en intervalos muy amplios tanto de pH (4-7.6) como de temperatura (22-48°C) (Rojo *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1997).

Las fosfatasa ácida extracelulares pueden degradar una gran variedad de compuestos orgánicos fosfatados como ácido fítico, glucosa-6-fosfato, glicerol fosfato y nucleosido mono-fosfato (Pant *et al.*, 1999). Las fosfatasa que degradan ácido fítico, llamadas fitasa tienen un valor muy especial ya que se considera que este compuesto es el fosfato orgánico más abundante en el suelo (Hayes *et al.*, 2000)

Las fitasas se han encontrado en una gran variedad de organismos. La mayoría de los microorganismos producen solamente fitasas intracelulares, mientras que las extracelulares han sido observadas casi exclusivamente en hongos filamentosos, en donde *Aspergillus niger* ha sido identificada como la especie que más produce esta enzima (Konietzny y Greineer, 2002). En el caso de bacterias, las fitasas se han detectado y caracterizado en diferentes especies, entre ellas *Escherichia coli* (Dassa *et al.*, 1999)

En plantas, las enzimas que degradan fitato, se han reportado en diferentes órganos, especialmente en las semillas, el polen, y en menor proporción en raíces. La actividad en semillas y polen es la responsable de la degradación del fitato durante la germinación para proveer de  $P_i$ , mio-inositol y minerales a la plántula en crecimiento. Por otro lado, se ha sugerido que las fitasas en la raíz pueden ser un mecanismo para incrementar la disponibilidad de  $P_i$  pero, en muchos estudios, se ha demostrado que el fitato es pobremente utilizado por las plantas (Hayes *et al.*, 2000) y que muy poca de esta actividad es secretada (Cocillo, 2002).

En plantas donde se ha encontrado secreción de fitasas, se ha observado una inducción en respuesta a condiciones deficientes de  $P_i$  (Li *et al.*, 1997).

### 1.3.4 Toma de $P_i$

La adquisición de aniones como los de  $P_i$  es un proceso que requiere energía. Los iones de  $P_i$  ( $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$ ) deben moverse a través de un gradiente eléctrico, ya que el interior de la célula está cargado negativamente ( $\sim -100mV$ ) y un gradiente de concentración debido a que las concentraciones intracelulares de  $P_i$  son entre 1000 y 10,000 veces mayores que la concentración extracelular. La energía requerida para mover el  $P_i$  hacia las células es mediada por una  $H^+$ -ATPasa, la cual bombea los

protones fuera de la célula creando un gradiente a lo largo de la membrana plasmática. El movimiento de los protones de regreso a las células esta acoplado al influjo de  $P_i$  a través de un cotransporte  $H^+-P_i$  (Hamburguer *et al.*, 2002).

La velocidad de la toma de  $P_i$  se incrementa en raíces de plantas sometidas a deficiencia de  $P_i$ , debido parcialmente a un aumento en la síntesis de proteínas transportadoras. Se sabe de la existencia de dos sistemas de transporte de  $P_i$ , uno de alta afinidad con  $K_m$ 's entre  $3-7 \mu M$  y uno de baja afinidad con  $K_m$ 's entre  $50$  y  $330 \mu M$  (Furihata *et al.*, 1992). Se ha observado que el transportador de baja afinidad es constitutivo mientras que el de alta es inducible por la deficiencia de  $P_i$  (Mimura, 1995; Mukatira *et al.*, 2001). La mayoría de los transportadores de alta afinidad se expresan preferentemente en la raíz (Muchhal y Raghothama, 1999).

Cada transportador de fosfato consta de 12 dominios intermembranales separados en dos grupos de seis por una asa central hidrofílica, (Fig 1.3). Los análisis computacionales, predicen que el extremo C-terminal, el N terminal y el asa central, se encuentran orientados hacia la superficie interna de la membrana, esta configuración es compartida por otros transportadores de solutos formando una superfamilia de proteínas transportadoras (Smith *et al.*, 2000).

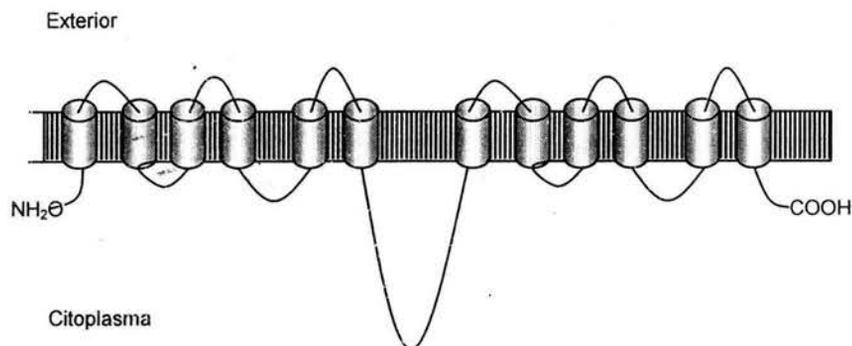


Fig. 1.3. Esquema propuesto para los transportadores de  $P_i$ .

El conocimiento de las proteínas involucradas en el transporte de  $P_i$  se ha extendido con la clonación de varios genes que codifican para cotransportadores  $H^+$ - $P_i$ . *AtPT1* fue el primer transportador de alta afinidad identificado por complementación de mutantes de levadura, con cDNAs de *A. thaliana* (Muchhal et al., 1996). A partir de ahí se han descrito nueve genes en *A. thaliana* con similitud a éste transportador, *ARATH;Pht1;1*, *ARATH;Pht1;2*, *ARATH;Pht1;3*, *ARATH;Pht1;4*, *ARATH;Pht1;5*, *ARATH;Pht1;6*, *ARATH;Pht1;7*, *ARATH;Pht1;8*, *ARATH;Pht1;9*, a excepción del 1;5 y el 1;6, todos se expresan en raíces (Raghothama, 2000; Poirier y Bucher, 2002).

Ortólogos de *AtPT1* se han identificado en otras plantas como papa (*StPT1* y *StPT2*) (Leggiewie et al., 1997), jitomate (*LePT1* y *LePT2*, Liu et al 1998), *Catharantus roseus* (*CrPT1*), *Medicago truncatula* (*MtPT1* y *MtPT2*), tabaco (*NtPT1*) y trigo (*TaPT1*) (Raghothama, 2000).

#### 1.4 Soluciones biotecnológicas

El avance en el conocimiento de las respuestas que se presentan en las plantas durante la deficiencia de  $P_i$  ha permitido el desarrollo de estrategias dirigidas a aminorar los estragos producidos por este estrés.

Una de las primeras aproximaciones fue sobreexpresar un transportador de alta afinidad de *A. thaliana* en células de tabaco (Mitsukawa et al., 1997). Estos cultivos celulares presentaron un incremento en biomasa y un mayor contenido de  $P_i$  cuando crecían en medio deficiente de este nutrimento, en comparación con las células que no sobreexpresaban el transportador. Sin embargo, no se ha analizado el efecto que esto pudiera tener en la planta completa.

La exudación de ácidos orgánicos es otra respuesta que se ha intentado manipular genéticamente, tratando de aumentar su secreción al medio. De la Fuente *et al.*, 1997, diseñaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen bacteriano de la citrato sintasa. El análisis de las plantas transgénicas demostró que existía más citrato secretado al medio lo que les suministró ventajas cuando se cultivaban en presencia de fosfato de calcio (López-Bucio *et al.*, 2000). A pesar del impacto que produjo este reporte, Delhaize *et al.*, (2001) trataron de reproducirlo y aunque obtuvieron plantas con 100 veces más expresión de la citrato sintasa, éstas no incrementaban los niveles de citrato en raíces ni aumentaban el eflujo del mismo a través de la raíz en respuesta a aluminio y deficiencia de  $P_i$ , por lo que concluyeron que esta estrategia no es suficiente para incrementar los niveles de ácidos orgánicos y que posiblemente el transporte pudiera ser limitante.

Todas estas estrategias se han planteado luego de la observación de las respuestas de las plantas a la baja disponibilidad de  $P_i$ , aunque es evidente que no se ha encontrado una solución al problema.

### 1.5. Justificación

Los antecedentes ponen de manifiesto que la deficiencia de  $P_i$  es un problema universal al que se ven sujetas las plantas, el desarrollo de cultivos que sean más eficientes en la absorción del  $P_i$  del suelo, será particularmente benéfico para la agricultura al reducir el consumo de los fertilizantes fosfatados, ya que se predice que las reservas de roca fosfato, del cual se obtienen los fertilizantes, se agotarán en los siguientes 60-80 años (Vance *et al.*, 2003), además de reducir los efectos negativos que conlleva la fertilización fosfatada.

Para implementar nuevas estrategias que permitan aminorar los efectos negativos de la escasez de  $P_i$  resulta evidente la importancia de conocer las respuestas que las plantas presentan de manera natural ante este estrés.

El cultivo de soya se ve afectado por la baja concentración de  $P_i$  en los suelos agrícolas, pero a pesar de ser uno de los más importantes mundialmente por su amplia variedad de usos (Hymowitz, 1970), no es una especie donde se hayan realizado estudios para conocer a fondo los problemas que tiene al hacer frente a la deficiencia de  $P_i$ . Esto debe de considerarse ya que, a pesar de que aparentemente la mayoría de las plantas presentan estrategias semejantes para contrarrestar la deficiencia de  $P_i$ , existen otros aspectos intrínsecos a cada especie, o incluso a cada variedad, que pueden introducir variaciones en las respuestas.

Por otro lado se ha especulado mucho acerca de si las respuestas a la deficiencia de  $P_i$  representan una ventaja adaptativa para las plantas, es decir las ayudan a tolerar mejor la deficiencia o sólo son consecuencia de crecer en estas condiciones, una posibilidad para estudiar el efecto benéfico para las plantas sería a través del uso de plantas transgénicas que modifiquen una de estas respuestas, y debido a la facilidad con la que se transforma *Arabidopsis thaliana*, se considera la mejor opción para trabajar

Con estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

### Hipótesis.

Al incrementar una de las respuestas para movilizar el fosfato orgánico, se repercutirá favorablemente en el crecimiento de las plantas cuando son cultivadas en medios con un alto contenido de fósforo orgánico y baja disponibilidad de  $P_i$ .

## Objetivo General

- Analizar las respuestas que presentan las plantas de soya durante la deficiencia de  $P_i$  e introducir una fitasa de secreción para mejorar el desarrollo de plantas creciendo en medios con un alto contenido de ácido fítico.

## Objetivos particulares

- Caracterizar a nivel morfológico la respuesta a la deficiencia de  $P_i$  en plantas de soya (Tapachula 86)
- Caracterizar la secreción de exudados radicales de soya durante la deficiencia de  $P_i$ .
- Evaluar la toma de  $P_i$  durante la suficiencia y deficiencia de  $P_i$
- Aislar un péptido señal de secreción y clonarlo en fase con el gen de fitasa de *E. coli*
- Transformar plantas de *A. thaliana* con las construcciones que contengan al vector y al gen de la fitasa y sólo con el vector
- Caracterizar el crecimiento de las plantas transgénicas de *A. thaliana* en medios con alto contenido de ácido fítico.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Caracterización de la respuesta de soya a la deficiencia de fosfato

#### Material biológico.

Semillas de soya variedad Tapachula 86 se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 15%, se lavaron con agua estéril y se germinaron en agrolita húmeda hasta la emergencia de la radícula. Se transfirieron a un cultivo hidropónico compuesto de solución Hoagland (3 mM  $KNO_3$ , 2 mM  $Ca(NO_3)_2$ , 1 mM  $MgSO_4$ , 0.004 mM  $MnCl_2$ , 0.023 mM  $H_3BO_3$ , 0.0004 mM  $ZnSO_4$ , 0.00015 mM  $CuSO_4$ , 0.00005 mM  $H_2MoO_4$ , 1 gr/200 ml Fe (III) EDTA y 500  $\mu M$   $(NH_4)_2PO_4$ ). Las plantas permanecieron dos semanas en este medio, se trasladaron a cultivos hidropónicos con soluciones +Pi, -Pi, Acido fítico o  $AlPO_4$ . En los tres últimos medios se sustituyó el fosfato de amonio por sulfato de amonio 500  $\mu M$ , ácido fítico 500  $\mu M$  y fosfato de aluminio 50  $\mu M$ , respectivamente.

#### Evaluaciones realizadas

Se evaluaron los siguientes parámetros en tres plantas de soya que eran removidas cada dos días de tratamiento, es decir los días 2,4,6,8,10, 12, 14 y 16.

*Altura.* Largo de la planta desde la base del tallo hasta el último nodo

*Largo raíz.* Promedio del largo de las tres raíces más largas

*Peso.* Peso fresco tanto del vástago como de la raíz.

*Pelos radicales.* Se cortaron raíces que estuvieron en deficiencia y en suficiencia de Pi durante tres semanas y se fijaron en alcohol al 70%. Para observarlas al microscopio se disectaron, de los ápices hacia arriba, en secciones de ~1.5cm y se tiñeron con azul de toluidina al 0.05% en agua. Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss a 8.25X, 33X y 66X siendo fotografiadas inmediatamente.

*Cuantificación de fosfato.* Para determinar la cantidad de  $P_i$ , se hicieron modificaciones a los métodos descritos por Pieters, *et al.*, (2001) y Aono *et al.*, (2001). Para la obtención del extracto, la raíz y el vástago se molieron por separado en nitrógeno líquido. A 0.01 y 0.003 g de tejido de raíz o vástago respectivamente, se agregaron 2 ml de agua y calentaron a ebullición durante 5 minutos dejando enfriar hasta 72°C y manteniendo esta temperatura toda la noche.

Para determinar el  $P_i$  se siguió el método de Ames (1966) en el que se tomaron 300  $\mu$ l del extracto anterior y se completó a 1 ml con el reactivo ascórbico-molibdato (ácido ascórbico al 10% y molibdato de amonio al 0.42% en ácido sulfúrico 5N, en una relación 1:6), se incubó durante 20 minutos a 45°C y se midió a 820 nm para determinar el contenido de  $P_i$ . Una curva patrón se construyó con fosfato de potasio.

*Obtención de exudados.* Se colocaron las plantas en aproximadamente 20 ml de agua para permitir la exudación de las raíces durante tres horas, esta solución se liofilizó y se congeló a -70°C hasta su utilización.

*Obtención de extractos.* Las raíces (0.01 g) se molieron en mortero con nitrógeno líquido y las proteínas se extrajeron con un buffer que contenía, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% Glicerol, 0.1 M Benzamidina, 0.5 mg/ml de Leupeptina y 1 mM PMSF.

*Cuantificación de proteína.* Para la cuantificación proteínas se siguió el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Se colocaron 5  $\mu$ l de exudados o extractos, según el caso y se adicionó 1 ml de solución Bradford, se dejó reaccionar durante 10 minutos y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm. La curva patrón se construyó utilizando concentraciones conocidas de albúmina.

*Actividad de Fosfatasa Ácida.* Para esta determinación, se incubó una solución 5 mM de p-nitrofenil fosfato en buffer de acetatos (100 mM Acetato de sodio pH 4.8, 3 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA y glicerol al 10%) con 5-15  $\mu$ l de enzima (exudados o extractos) en un volumen final de 400  $\mu$ l, durante 10 minutos a 37°C. Al término de este

tiempo, se añadió a la mezcla de reacción. 1 ml de NaOH 1 M, para estabilizarla y cuantificar el p-nitrofenol formado, el cual es colorido pudiéndose detectar a 410 nm. Para calcular la cantidad de Pi liberado se utilizó el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenil fosfato que es de 20 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Con la cantidad de Pi liberado y la de proteína que se adicionó se calculó la actividad específica, reportada como μmoles de p-nitrofenol liberadas por minuto por mg de proteína.

*Actividad de Fitasa.* Las proteínas obtenidas en la exudación (10 μg) se incubaron con una solución 5 mM de ácido fítico en el mismo buffer de acetatos utilizado para la determinación de fosfatasas, en un volumen final de 300 μl, durante 10 minutos a 37°C. Para detener la reacción, se agregaron 700 μl del reactivo ascorbico-molibdato. La cuantificación del Pi liberado se realizó como se describió anteriormente. La actividad específica de fitasa se reportó como μmoles de Pi liberado por minuto por mg de proteína.

*Geles de actividad.* Los extractos y exudados obtenidos se corrieron en geles de acrilamida no desnaturizantes como se describe en Laemmli (1970). Una vez completada la electroforesis, los geles se lavaron en buffer de acetatos. La actividad se visualizó utilizando α-naftil fosfato (1 mM) como el sustrato, en el mismo buffer de acetatos y Fast Garnet (1 mM) como colorante. Las bandas con actividad de fosfatasa eran evidentes por el color oscuro que presentaban.

*Gel de actividad in vivo.* Se seleccionaron raíces que estuvieron en deficiencia o en suficiencia de Pi durante tres semanas, se colocaron en agarosa al 1% conteniendo α-naftil fosfato (1 mM) y Fast Garnet (1 mM). Se fotografiaron los geles a los 15 minutos y a las seis horas después de la gelificación.

*Acidificación del medio extrarradical.* Se prepararon las raíces como para el gel de actividad *in vivo* y se vació sobre ellas un gel al 1% de agarosa pH 6.5 conteniendo

0.01% de púrpura de bromocresol, se esperó la gelificación y se fotografió el gel ocho horas después.

*Toma de fosfato.* Se cortaron ápices radicales (~1.cm) de plantas de tres semanas en  $-P_i$  y se preincubaron por 10 minutos en una solución amortiguadora de 25mM HEPES pH 5.5. La absorción de  $P_i$  se inició al adicionar  $5\mu\text{Ci}$  ( $^{32}\text{P}$ )-ortofosfato en 1ml del amortiguador anterior con  $10\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Después de incubarse a temperatura ambiente por 5, 10, 15 y 20 minutos, los ápices se lavaron exhaustivamente con solución Hoagland que contenía  $500\mu\text{M}$  de  $P_i$  no radiactivo, durante 3 horas. Las raíces se secaron toda la noche y se midieron las cuentas por minuto por el método de Cerenkov, en un contador de centelleo.

## II.2. Obtención de las construcciones para transformar *Arabidopsis thaliana*.

Aislamiento y clonación del Péptido Señal de la fosfatasa ácida de Arabidopsis

Se eligió el péptido señal de una fosfatasa ácida de Arabidopsis para dirigir la fitasa de *E.coli* hacia la vía de excreción extracelular. Para amplificarlo se diseñaron oligonucleotidos específicos a partir de la secuencia de fosfatasa ácida reportada por Patel (1996).

$P_{\text{senbam}}$  :

5'-cc gga tcc cag aga aac taa tga aga-3', con sitio de corte para *Bam*HI

$P_{\text{senpst}}$ :

5'-ccc cct gct gca tct ggt aaa tca ctt cct ctg-3' con un sitio de corte para *Pst*I

Después de verificar que dentro de la secuencia del péptido señal no existen intrones, se extrajo DNA genómico de plantas de *A. thaliana* y se amplificó la secuencia codificadora del péptido señal mediante una reacción de PCR que contenía:

Buffer para PCR 10X, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM mezcla de dNTPs, 0.2μM Psenbam, 0.2μM Psenpst, ~ 500ng DNA genómico de *Arabidopsis*, y una unidad de TAQ polimerasa en 50μl de volumen de reacción. Se dejó 40 ciclos cada uno de 30 segundos de desnaturalización a 94°C; un minuto de alineamiento a 62°C y 1 min de extensión a 72°C. El producto de la reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (1μg/ml), se cortó la banda correspondiente a 120 pares de bases y se purificó el DNA del gel.

Una vez purificada la banda, se digirió con *Bam*HI y *Pst* I, después de inactivar las enzimas, se ligó el inserto en pBluescript (SK) digerido con las mismas enzimas y defosforilado. Con el producto de la ligación, se transformaron células competentes DH5α y se extrajo el plásmido que contenía el péptido señal, mediante lisis alcalina

*Aislamiento y clonación de la fitasa de Escherichia coli.* Para aislar la fitasa de *E. coli* y clonarla en fase con el péptido señal, se diseñaron oligonucleotidos específicos a partir de la secuencia de fitasa reportada por Dassa *et al.*, (1990).

Fitapst: 5'-ggg gct gca gcc cag agt gag ccg gag ctg-3', con sitio de corte para *Pst*I

Fitahin: 5'-ggg aag ctt tta caa act gca cgc cgg-3', con sitio de corte para *Hind*III

Con estos oligonucleotidos se amplificó el gen de la fitasa de *E. coli* que se encontraba clonado en p-Bluescript. Se amplificó utilizando las mismas condiciones de PCR que se utilizaron para amplificar el péptido señal.

La reacción de PCR fue separada electroforéticamente y se purificó la banda correspondiente a 1000pb (peso del gen de fitasa). Se subclonó en fase con el péptido señal y se transformaron células competentes con esta construcción.

Después de secuenciar la construcción para verificar que los insertos estuvieran en fase, este plásmido se digirió para obtener ambos fragmentos de DNA en un sólo inserto ahora llamado PS-Fitasa; este fragmento se clonó en los sitios *Kpn*I y *Bam*HI del vector binario pBin19, de tal manera que el gen de fitasa quedó bajo el control del promotor del virus de mosaico de la coliflor (CaMV35S) un promotor fuerte de expresión casi constitutiva preferentemente en raíz (Benfey et al., 1989).

Con el vector binario se transformaron células DH5 $\alpha$  y se seleccionaron las células resistentes a kanamicina, ya que el vector confiere resistencia a este antibiótico, tanto en bacteria como en planta. Se extrajo el plásmido pBin19-PSFitasa (conteniendo al péptido señal de la fosfatasa ácida de *A. thaliana* y a la fitasa de *E. coli*) por medio de lisis alcalina.

### Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

*Obtención de células competentes de Agrobacterium tumefaciens.* Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* C44, en 3ml de medio YEP (Peptona 10g/l, NaCl 5g/l, extracto de levadura 5g/l) y se incubó toda la noche a 28°C con agitación constante. Se adicionó 1ml del cultivo anterior a 75ml de YEP en un matraz de 500ml, y se agitó a 250 rpm a 28°C hasta que la OD<sub>600</sub> alcanzó 0.5-0.75. Se colocó el cultivo en hielo durante 5 min y se centrifugó a 3000 g por 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en 1.5 ml de una solución que contenía 20m M CaCl<sub>2</sub> y glicerol al 15%, mantenida a 4°C. Las células se alicuotaron en volúmenes de 0.1 ml y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Estas células competentes se almacenaron a -70°C.

*Transformación de las células competentes de A. tumefaciens.* Se agregaron 5 $\mu$ g del plásmido, pBin19-PSFitasa (fitasa), pBin19(control), a una alicuota de células competentes de *A. tumefaciens*, la cual se descongeló en un baño a 37°C, y congeló nuevamente en nitrógeno líquido. Los pasos de congelado y descongelado se repitieron

una vez y se adicionó 1ml de YEP; se incubó a 28°C por 4 horas, las células se centrifugaron a 10000 rpm y se resuspendieron en 0.1ml de YEP. Se plaquearon en cajas de petri con YEP-agar (1%) y 100µg/ml de kanamicina y se incubaron a 28°C hasta la aparición de las colonias (2 días).

Las células de *A. tumefaciens* que contenían el plásmido fueron conservadas en YEP-15%glicerol a -70°C.

#### Transformación *Arabidopsis thaliana*.

Se transformó *Arabidopsis thaliana* por el método de infiltración de primordios florales (Clough y Bent, 1998). Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* en un fotoperíodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad durante tres semanas y de 24 horas continuas hasta que empezaron a aparecer las inflorescencias, éstas fueron cortadas para evitar el efecto de la dominancia apical y favorecer su ramificación. Una vez que se obtuvieron plantas con una gran cantidad de primordios florales, se preparó un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo la construcción de interés (control o fitasa). El cultivo se centrifugó y se resuspendió en una solución al 5% de sacarosa con 0.01% de silwet L-77. Las rosetas se sumergieron completamente en la solución de *A. tumefaciens* durante 2-3 segundos y se dejaron bajo una cubierta por 16-24 horas para mantener una alta humedad. Se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de luz continua y se regaron con agua diariamente. Para seleccionar las transformantes, las semillas se esterilizaron sumergiéndolas unos segundos en etanol al 70%, 5 minutos en 15% de hipoclorito de sodio y 0.01% de Tween20, se enjuagaron repetidamente con agua estéril. Las semillas se sembraron en medio B5 con agar al 1% y 50µg/ml de kanamicina, se dejaron en oscuridad a 4°C durante tres días y se trasladaron a una cámara de crecimiento a 22°C con un fotoperíodo 8h de luz por 16 de oscuridad. Sólo aquellas plántulas que crecieron verdes, signo de su resistencia al

antibiótico, fueron transplantadas a suelo. Una vez que fructificaron, se colectaron las semillas (F1), se esterilizaron y sembraron en presencia de kanamicina. Este procedimiento se repitió hasta la obtención de plantas homocigas, es decir, aquellas plantas donde toda su descendencia es resistente a kanamicina.

#### *Transferencia tipo Southern*

Se extrajo DNA de plantas transgénicas por medio del método descrito por Dellaporta *et al.*, (1983) con ligeras modificaciones. Para esto se congeló 1g de tejido de cada planta con nitrógeno líquido y se molió en mortero hasta obtener un polvo fino, el cual se transfirió a un tubo y se le agregó 15 ml de buffer de extracción (100mM Tris pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl y 0.2μM β-mercaptoetanol) más 1ml de SDS al 20%, esta mezcla se incubó a 65°C por 10 minutos y se le agregó 5ml de Acetato de potasio 5M, se agitó e incubó a 0°C durante 20 minutos. Se centrifugó a 25,000Xg durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una gasa estéril colocada sobre un tubo que contenía 10ml de isopropanol, se mezcló y se dejó 30 minutos a -20°C, la mezcla se centrifugó a 20,000Xg durante 15 minutos, la pastilla se secó y se disolvió en 0.7ml de 50mM Tris y 10mM EDTA pH8 y transferido a un tubo eppendorf. Para eliminar el RNA, se agregó 1ml de RNAsa A (10mg/ml) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se centrifugó nuevamente a 20,000Xg por 10 minutos para eliminar los contaminantes insolubles y se hizo una extracción con PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamilico, 25:24:1). La fase acuosa se precipitó con 1/10 de volumen de 3M acetato de sodio y 0.5ml de isopropanol. El DNA se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 0.1ml de 10mM Tris y 1mM EDTA pH8. Se digirieron 10μg de DNA de cada planta resistente a kanamicina con *EcoR* I y se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio usando DNA del fago λ digerido con *Hind* III como marcador de peso molecular.

El gel se desnaturalizó durante 45 minutos en una solución 1.5M NaCl y 0.5N NaOH y neutralizado en dos cambios uno de 30 y otro de 15 minutos con una solución

de 1.5M NaCl y 1M Tris pH 7.4. Se transfirió a una membrana de Nylon (Hybond-N+) siguiendo el protocolo de transferencia por capilaridad (Sambrook, 1989).

La membrana se prehibridó por dos horas en un baño a 65°C con buffer de hibridación (0.33M buffer de fosfatos, pH 7.2, 1mM EDTA y 7%SDS). La hibridación se realizó a 65°C toda la noche. Después de ese tiempo se lavó la membrana con 2X SSC y 0.2%SDS durante 15 minutos a temperatura ambiente, y un lavado de 15 minutos a 65°C con 0.2X SSC y 0.2% SDS.

La membrana se expuso a una película de rayos X en una pantalla X-omatic de Kodak toda la noche a -70°C.

### II.3. Caracterización de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

*Obtención de exudados.* Se esterilizaron semillas obtenidas de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* y se pusieron a germinar en medio B5 en frascos de vidrio con tapa de plástico estériles (se sembraron aproximadamente 20 semillas por frasco y fueron tres frascos por línea transgénica). Después de dos semanas se transfirieron a medio Hoagland sin Pi y se dejaron una semana más, al término de este tiempo, se recolectó el medio y se utilizó para los ensayos de actividad.

*Crecimiento en ácido fítico.* Se esterilizaron y sembraron semillas de Fi1, Fi4, Co1 y Columbia en las condiciones descritas anteriormente, y se transplantaron a agrolita, después de tres semanas se empezó a fertilizar el agrolita de tres plantas por línea con una de las tres soluciones siguientes, Ácido Fítico, -Pi y +Pi, en las concentraciones descritas anteriormente. Cuando las plantas creciendo en el medio -Pi empezaron a presentar síntomas de deficiencia, se compararon las diferencias en el crecimiento.

### III. RESULTADOS

#### III.1. Caracterización de la respuesta de Soya a la deficiencia de $P_i$

##### III.1.1. Diferencias morfológicas

Para determinar los efectos que tiene la deficiencia de  $P_i$  sobre soya, las plantas se crecieron en suficiencia de  $P_i$  (+ $P_i$ ) o deficiencia de  $P_i$  (- $P_i$ ), hasta que se observaron diferencias morfológicas tanto en vástagos como en raíces. En los vástagos los síntomas de deficiencia de  $P_i$  comienzan a notarse en las hojas desde el día 14; a este tiempo las plantas en - $P_i$  lucen más pequeñas en comparación con las que crecen en + $P_i$ . Estas diferencias se hicieron más evidentes después de los 20 días de tratamiento (Fig. III.1). Para el día 23 las plantas en - $P_i$  presentaron los síntomas característicos de la deficiencia, como son clorosis y puntos cafés-morados por acumulación de antocianinas alrededor del margen de las hojas (datos no mostrados).

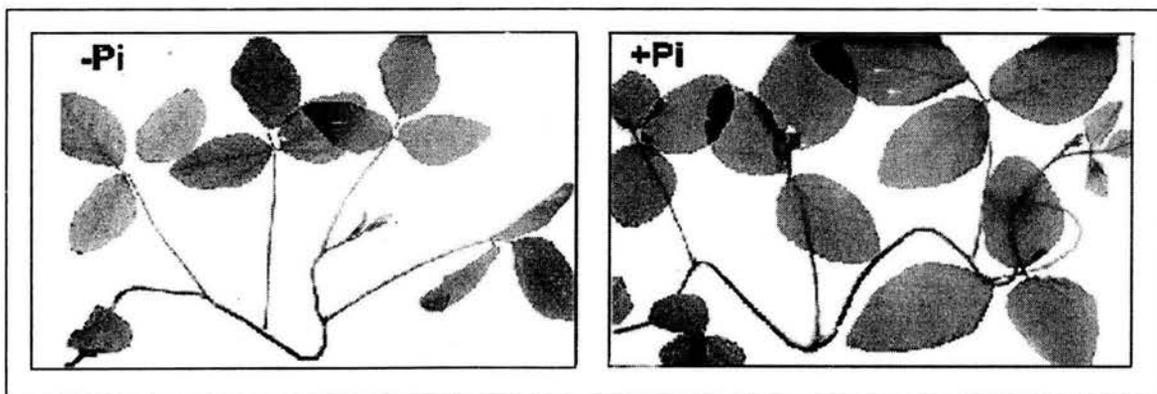


Fig. III.1. Diferencias morfológicas en vástagos sometidos a deficiencia de  $P_i$  en comparación con aquellos creciendo en suficiencia de  $P_i$ . Plantas de soya de dos semanas de edad se transplantaron a medios con (+ $P_i$ ) o sin  $P_i$  (- $P_i$ ) durante 23 días y se compararon morfológicamente.

Las raíces también presentaron diferencias durante el tratamiento. Aquellas plantas que estuvieron en deficiencia de Pi tenían raíces más largas y más ramificadas (Fig. III.2).

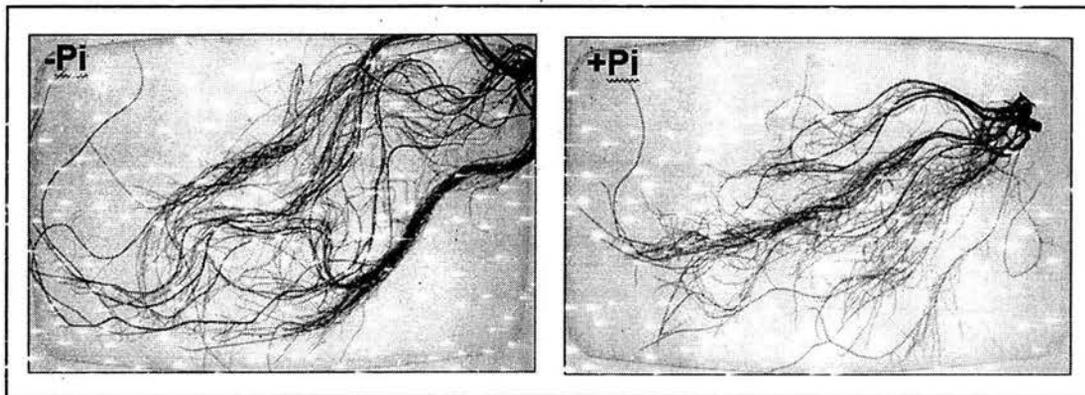


Fig III.2. Diferencias a nivel morfológico entre raíces de soya creciendo en deficiencia o suficiencia de Pi. Plantas de soya de dos semanas de edad se transplantaron a medios con (+Pi) o sin Pi (-Pi) durante 23 días y se compararon morfológicamente.

Se observó que las plantas creciendo en  $-Pi$  presentan raíces con un mayor número de pelos radicales y éstos eran de mayor tamaño que los que se presentaban en raíces de plantas creciendo en  $+Pi$ , (Fig. III.3). Al estudiar las raíces detenidamente al microscopio se observó que la parte de la raíz que corresponde a la zona de elongación, es decir aquella en la que no se presentan primordios de raíces laterales, era más largo en las raíces creciendo en deficiencia (datos no mostrados).

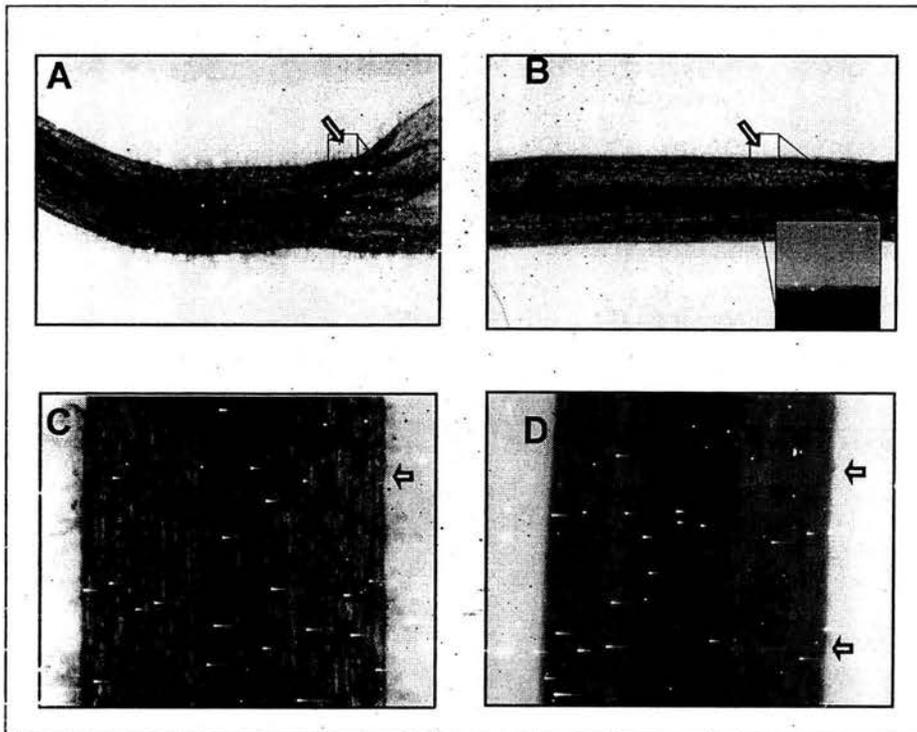


Fig.III.3. Diferencias a nivel de pelos radicales en plantas de soya creciendo en deficiencia o suficiencia de Pi. A y C, -Pi; B y D, +Pi; La presencia de pelos radicales se indica con flechas. A y B 8.25X, C y D 33X.

En la naturaleza, la deficiencia de Pi no se da por una carencia total de éste nutrimento, sino porque gran parte del Pi que se encuentra en los suelos esta formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos, limitando su disponibilidad. Es por esto que en los experimentos posteriores se incluyeron dos nuevos tratamientos, uno con una fuente orgánica de Pi, el ácido fítico, y otro con una fuente inorgánica, el fosfato de aluminio, ambos son sustratos naturales que pueden ser encontrados en suelos cultivables.

Con el fin de facilitar la descripción de los resultados, se agrupó a los tratamientos de inanición (-Pi, 0mM de Pi), Pi de aluminio y ácido fítico como deficiencia de Pi, mientras que se hace referencia a +Pi como suficiencia.

### III.1.2. Altura y peso

Las observaciones morfológicas indicaban claramente que el desarrollo de las plantas es modificado durante la deficiencia de  $P_i$ , sin embargo, era necesario medir esas diferencias y para ello se tomaron la altura y el peso de la planta.

En cuanto a la altura, los vástagos de plantas creciendo en los diferentes tratamientos, no presentaron diferencias entre ellos a través del tiempo (Fig. III.4). Sin embargo se distingue una tendencia hacia un menor peso de los vástagos en deficiencia con respecto a los que crecieron en suficiencia; esta disminución es más notable en los días catorce y dieciséis. (Fig. III.5). Es importante hacer notar que las plantas creciendo en  $-P_i$ , ácido fítico y fosfato de aluminio, alcanzan prácticamente el mismo peso al final del experimento, por debajo del control  $+P_i$ .

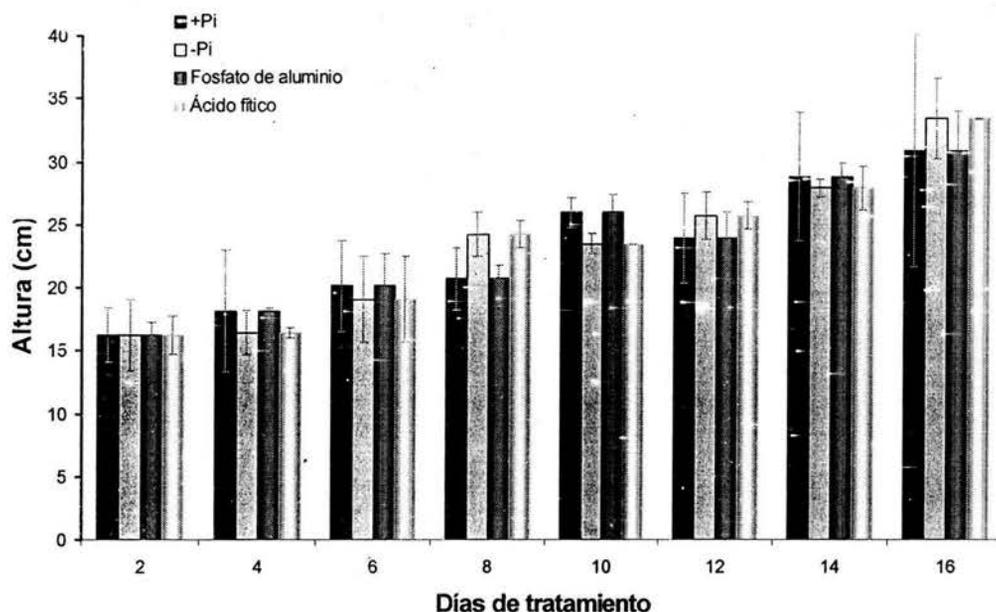


Fig. III.4. Longitud de vástagos de soja sometidos a los distintos tratamientos de deficiencia o a suficiencia. Se midió el largo de plántulas de soja sometidos a los distintos tratamientos, tomando en cuenta desde la base del tallo hasta el último nodo.  $n=6$ .

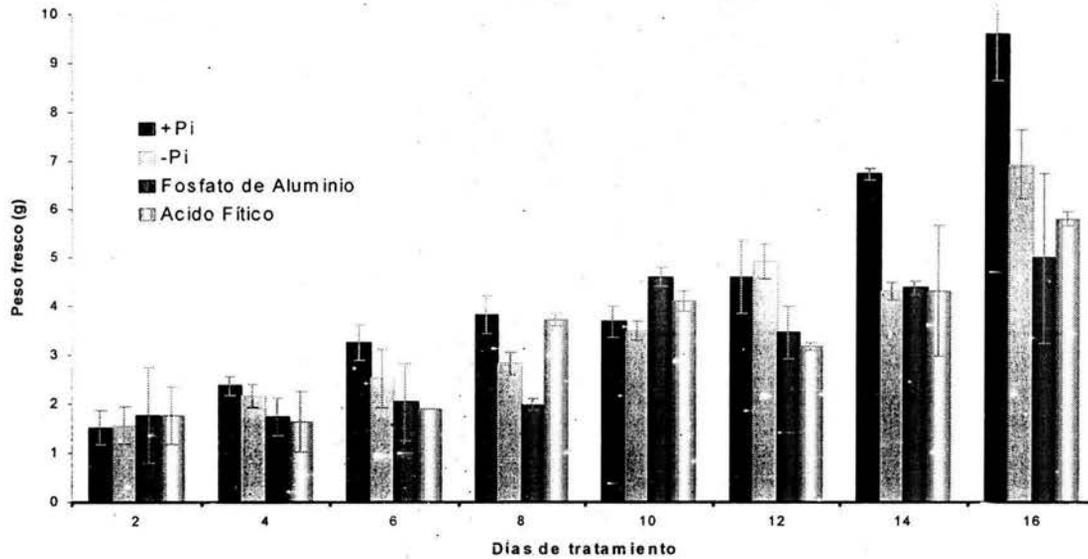


Fig.III.5. Peso fresco de vástagos de soya sometidos a los distintos tratamientos de deficiencia o a suficiencia. n=6.

Tanto el largo como el peso fresco de las raíces es muy similar entre los tratamientos durante todo el experimento (Fig. III.6 y III.7).

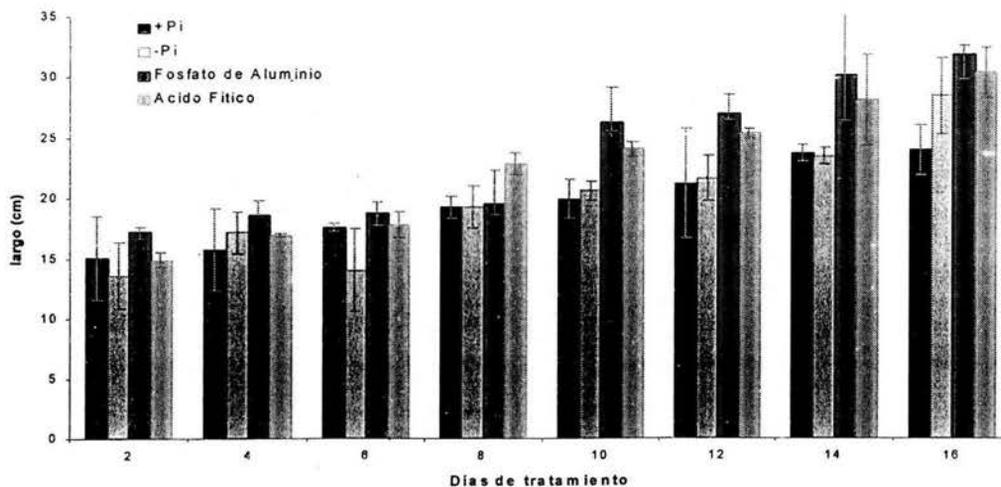


Fig. III.6. Longitud raíces de soya sometidas a los distintos tratamientos de deficiencia o a suficiencia. Se promedió el largo de las tres raíces más largas de plantas de soya sometidas a los distintos tratamientos; n=6

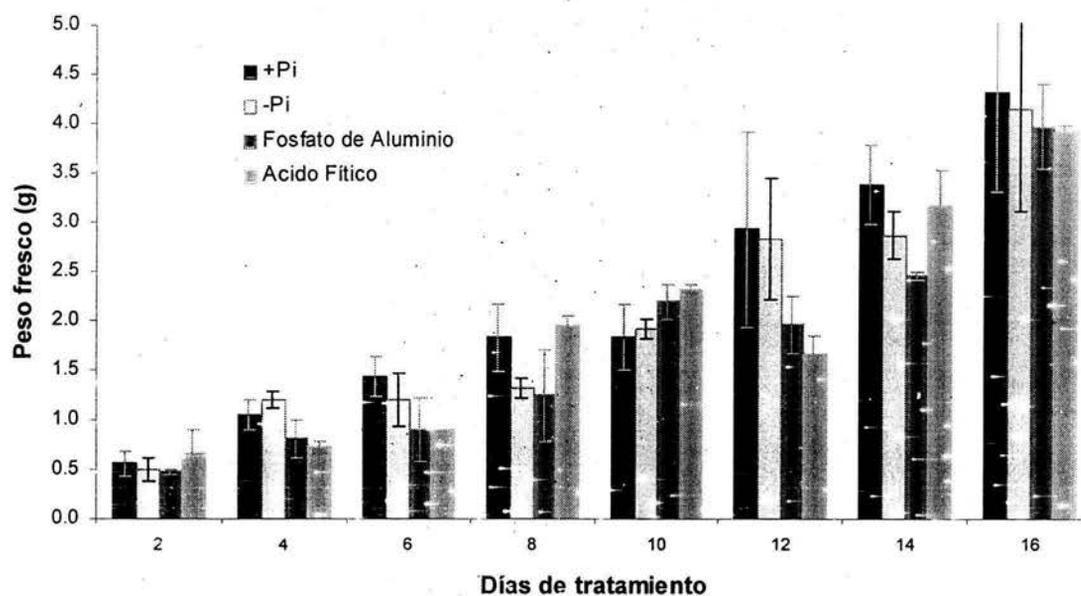


Fig. III.7. Peso fresco raíces de soya sometidas a los distintos tratamientos de deficiencia o a suficiencia. n=6

### III.3 Contenido de Pi

Para conocer si las diferencias que se presentaban durante la deficiencia de Pi con respecto a la suficiencia, eran atribuidas no sólo a la disponibilidad de Pi en el medio hidropónico, sino que también se relacionaban con cambios en la concentración intracelular de Pi, se evaluó la cantidad de Pi soluble presente en las plantas sometidas a los distintos tratamientos.

El contenido de Pi en los vástagos de plantas creciendo en +Pi mantiene un nivel constante, mientras que en las plantas con tratamientos de deficiencia, el contenido es menor (Fig. III.8). A pesar de que la deficiencia mantiene niveles bajos de Pi en los vástagos, los tratamientos con ácido fítico y fosfato de aluminio, alcanzan valores ligeramente más altos.

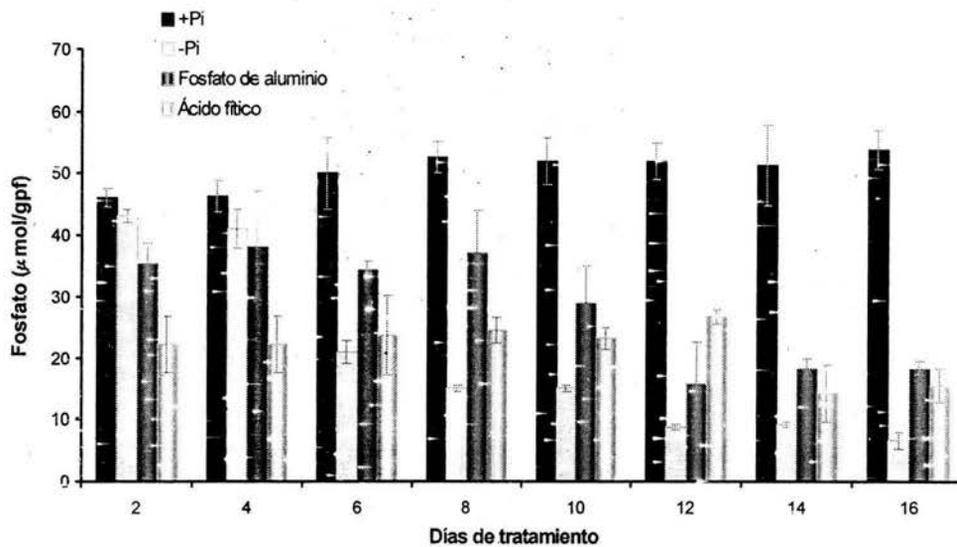


Fig. III.8. Contenido de Pi en vástagos de plantas de soya creciendo en los diferentes tratamientos. Los vástagos fueron cosechados en los tiempos indicados y se les determinó el Pi soluble por el método de Ames (1966). n=6

En las raíces, el contenido de Pi fluctúa dentro de un cierto rango, lo que permite que el desarrollo de la planta sea normal. En contraste, los tratamientos de deficiencia disminuyen hasta un nivel muy similar entre ellos (Fig. III.9).

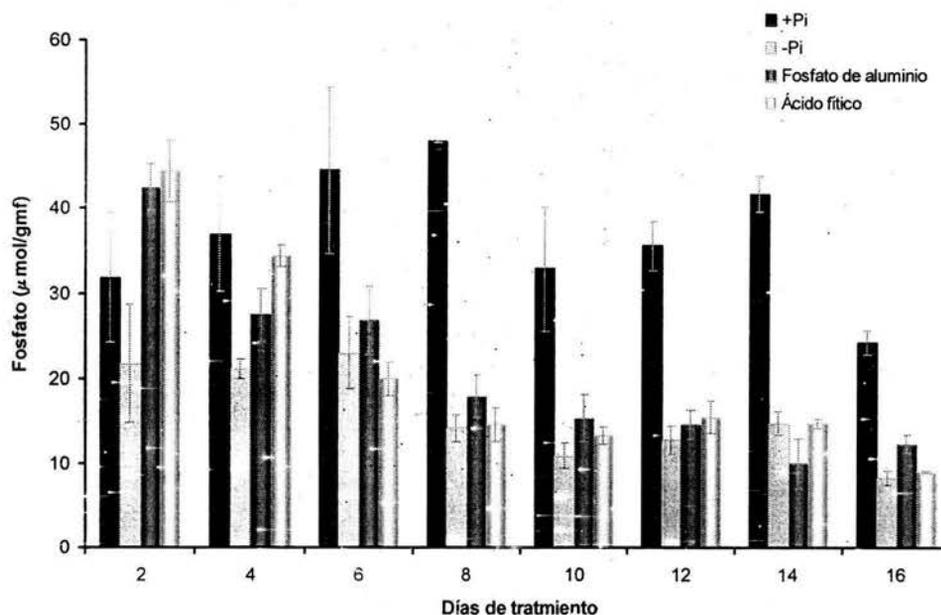


Fig. III.9. Contenido de Pi en raíces de soya sometidas a deficiencia o suficiencia de Pi. Las plantas de soya creciendo en los diferentes tratamientos fueron cosechadas en los tiempos indicados y se determinó en las raíces el Pi soluble por el método de Ames (1966).n=6

### III.1.4 Secreción de fosfatasa ácidas.

#### III.1.4.1 Fosfatasa ácida

Se ha reportado que una de las respuestas de las plantas a la deficiencia de Pi es la secreción de fosfatasa ácidas al medio extracelular. Para evaluar este parámetro se midió la actividad de fosfatasa ácida en exudados obtenidos de las raíces de plantas de soya sometidas a los distintos tratamientos. Los resultados mostraron un incremento en la actividad de éstas enzimas en los tratamientos de deficiencia (Fig. III.10).

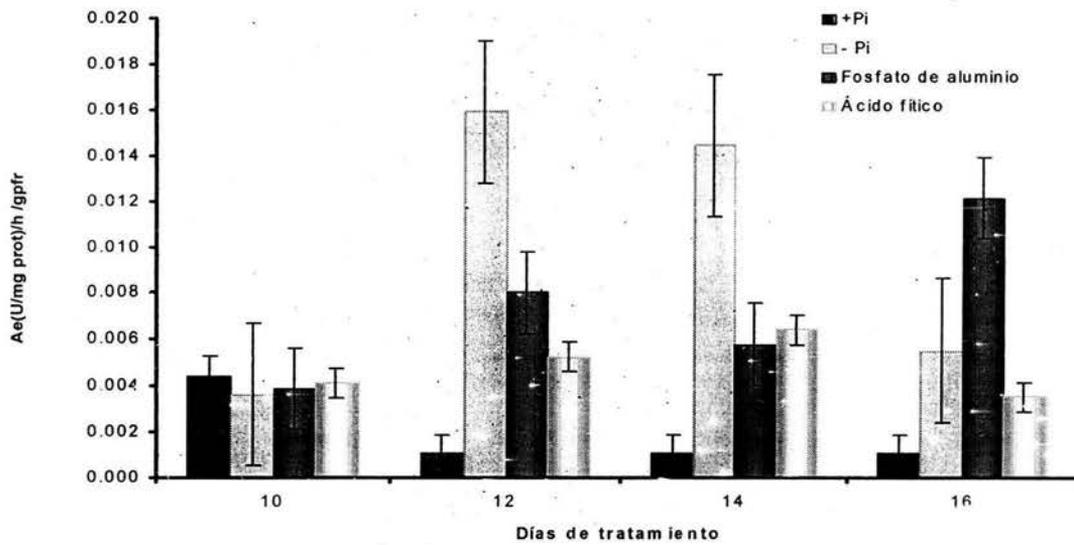


Fig.III. 10. Actividad específica de fosfatasa ácida en exudados radicales. Se evaluó la actividad de fosfatasa ácida de plantas de soja sometidas a los diferentes tratamientos, para homogenizar los resultados se expresaron en función de las horas de exudación y los gramos de peso fresco de raíz.

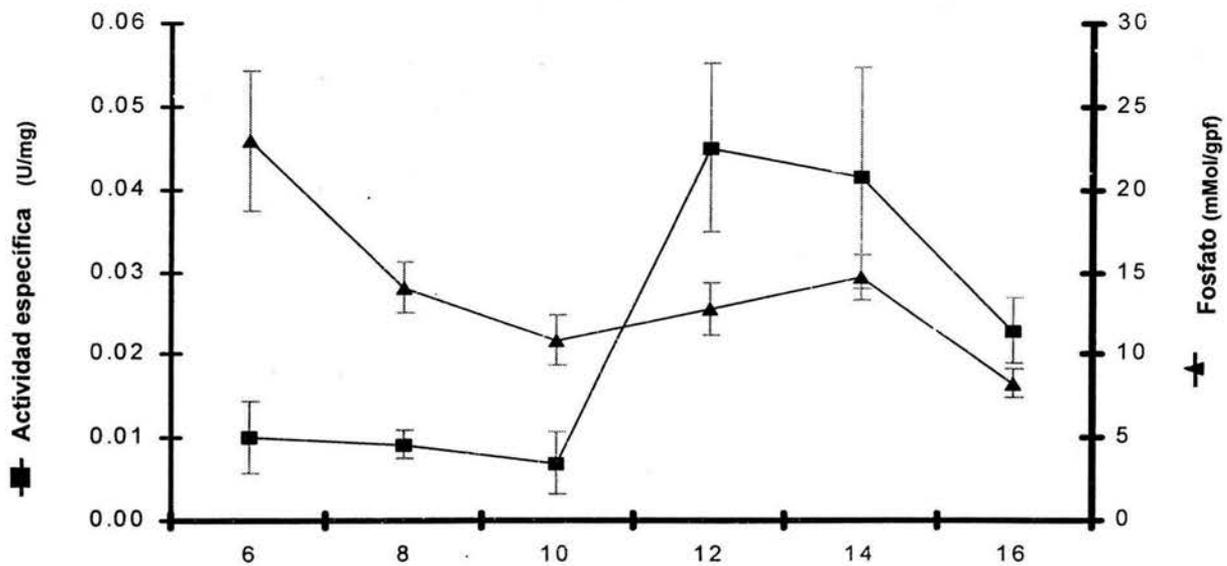


Fig.III.11. Actividad de fosfatasa ácida en exudados radicales relacionada con el contenido de Pi en raíces sometidas a -Pi.

Este aumento es claro a partir de los 12 días de tratamiento y es transitorio por lo menos en el caso de inanición en  $P_i$ . Al analizar la relación que existe entre el contenido de  $P_i$  y la inducción de la actividad de fosfatasa, se observó que la actividad de esta enzima se incrementa cuando se presenta una caída importante en el contenido de  $P_i$  (Fig. III.11).

Al igual que lo observado para las enzimas extracelulares, en las intracelulares, el incremento en actividad se obtiene a partir del día 12 de tratamiento, aunque en este caso sólo se evaluó la condición de inanición de  $P_i$  (Fig. III.12).

Los resultados indican que las fosfatasas ácidas responden a la deficiencia de  $P_i$  con un aumento en actividad, sin embargo estos experimentos no aportan datos sobre el comportamiento de las distintas isoformas de fosfatasa ante este estrés. Para conocerlo, se observó la actividad de las distintas isoformas de fosfatasa en geles nativos, de exudados (Fig. III.13, A y C) y extractos radicales (Fig. III.13, B y D).

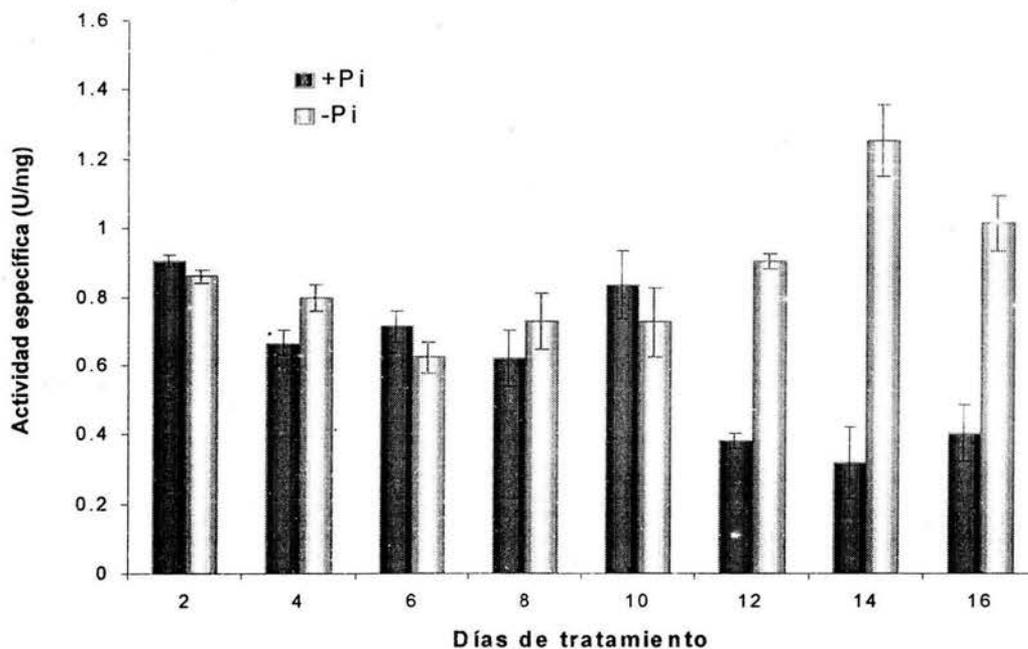


Fig. III.12. Actividad de fosfatasa ácida en extractos proteicos de raíces crecidas en deficiencia o suficiencia de  $P_i$ . Se evaluó la actividad en extractos proteicos de raíces de plantas de soya sometidas a  $-P_i$  y  $+P_i$ , n=6.

Se encontró un aumento en la actividad de varias isoformas en respuesta a la deficiencia. Una isoforma de alta movilidad en particular, aumenta su actividad tanto en extractos como en exudados radicales y tiene un corrimiento electroforético muy semejante en ambos casos, lo que sugiere que podría ser la misma enzima. El grupo de isoformas de baja movilidad también se observa tanto en extractos como en exudados, sin embargo la separación no fue tan buena como para poder determinar cuantas isoformas existen realmente y si es una o varias las que incrementan su actividad durante la deficiencia de fosfato en ambos casos. Adicionalmente, se observa que en la raíz existen otras isoformas que estimulan su actividad en estas condiciones. El gel de exudados muestra que la secreción de fosfatasas ácidas es una respuesta temporal.

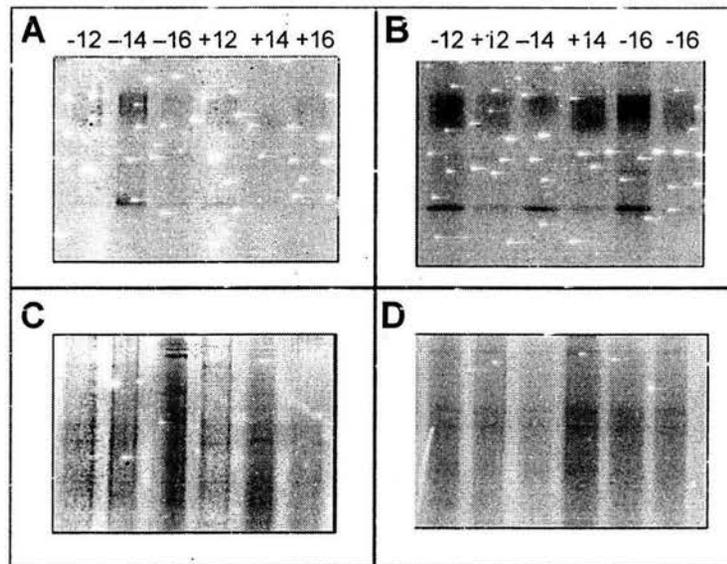


Fig. III.13. Geles de extractos y exudados proteicos de raíces teñidos por actividad de fosfatasa. (A) gel de exudados radicales teñidos por actividad, (C) control de carga teñido por plata. (B) gel de extractos radicales teñidos por actividad, (D) control de carga teñido por plata. Se antepone un signo + para indicar suficiencia de  $P_i$  y - para indicar la deficiencia de  $P_i$ . Se puede observar tanto en exudados como en extractos radicales un aumento en la actividad de varias isoformas de fosfatasa ácida estimulada por deficiencia de  $P_i$

### III.1.4.2 Fitasa

Una clase de fosfatasa ácida, que resultó de gran interés para este trabajo es la fitasa, ya que es una enzima capaz de degradar el ácido fítico. Al evaluar la actividad de fitasa en exudados de  $-P_i$  y  $+P_i$ , se encontró que a pesar de que se incrementa en respuesta a la deficiencia de  $P_i$  entre los días 8 y 12, la actividad es baja, ya que se encuentra en valores muy cercanos a cero (Fig. III.14).

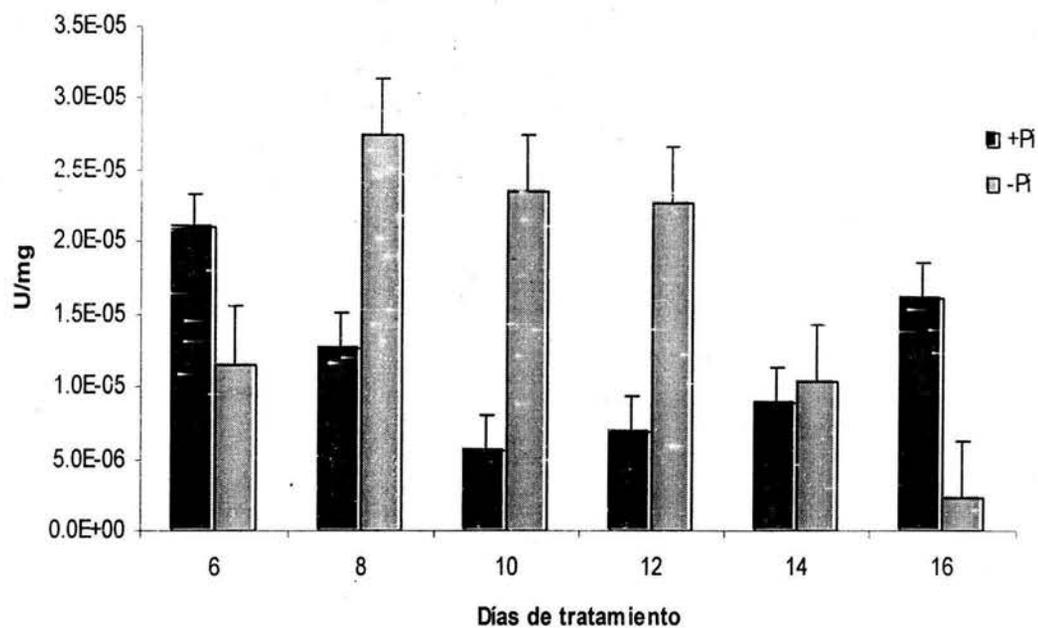


Fig. III.14. Actividad específica de fitasa en exudados de raíces de soya en  $+P_i$  o  $-P_i$ . Se lavaron las raíces de plantas de soya de tres semanas de edad sometidas a deficiencia o suficiencia de fosfato durante los días de tratamiento que se indican; se pusieron a exudar durante 2 horas y se evaluó la actividad utilizando como sustrato ácido fítico.

### III.1.4.3 Actividad de fosfatasa *in vivo*

Para complementar los resultados obtenidos acerca de las fosfatasas ácidas se diseñó un experimento en el que se pudiera observar como se presentaba la actividad de fosfatasa ácida en las raíces de plantas creciendo en +Pi y en -Pi. Este experimento utiliza el principio de los geles de actividad para fosfatasa ácida, la única variación consistió en dejar que la raíz entera permaneciera en contacto con el gel, de ahí que se nombraron *in vivo*.

Se encontró que las raíces de plantas que crecieron durante tres semanas en deficiencia de Pi manifiestan actividad de fosfatasa a tiempos muy cortos de exposición al gel, 15 minutos (Fig. III.15, C y D). Al realizar un gel con raíces secundarias y dejándolo exponer durante seis horas, se observó que la actividad de fosfatasa en raíces en suficiencia de Pi aumenta más evidentemente en los ápices radicales, mientras que la actividad de fosfatasa en raíces en deficiencia de Pi se incrementa prácticamente en toda la raíz (Fig. III.15, A y B).

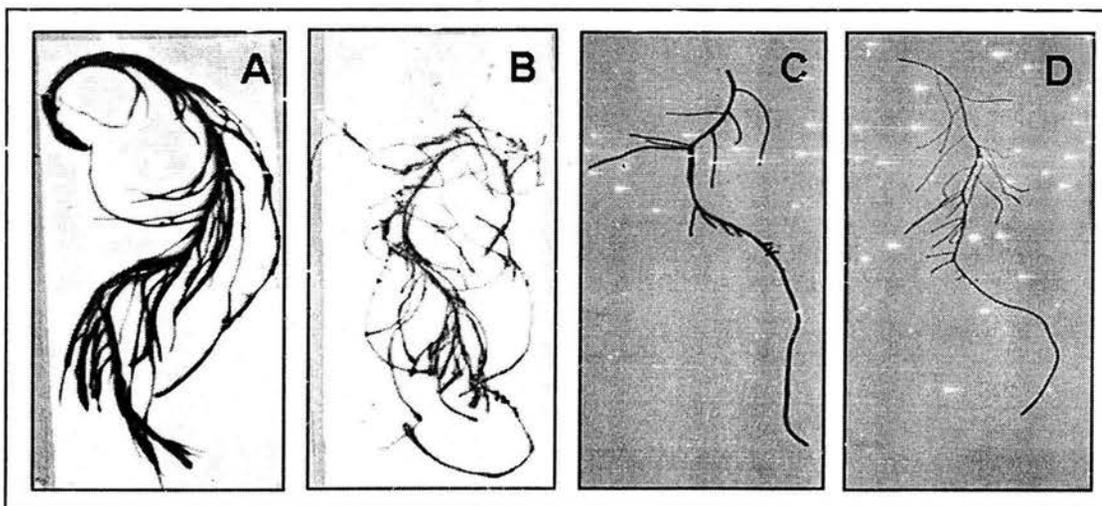


Fig. III.15. Geles teñidos por actividad de fosfatasa. Se colocaron raíces de plantas de soya sometidas a inanición (-Pi) o suficiencia (+Pi) de fósforo por tres semanas en un soporte de acrílico y se pusieron en contacto con un gel de agarosa al 1% conteniendo 1mM de  $\alpha$ -naftilfosfato y 1mM de Fast-Garnet. A, raíces secundarias -Pi, exposición de 6 horas al gel. B, raíces secundarias +Pi, exposición de 6 horas al gel. C, raíces laterales a 15 min de exposición (-Pi), D, raíces laterales a 15 min de exposición (+Pi).

### III.5 Acidificación del medio extracelular.

La acidificación del medio extracelular durante la deficiencia de  $P_i$  se presenta por la salida de protones al medio. En soya se evaluó si las raíces eran capaces de acidificar su medio cuando crecen en  $-P_i$ . Para hacer ésto, se colocaron raíces seleccionadas en un gel con indicador de pH y se observó si el color del indicador viraba del púrpura (pH neutro) al amarillo (pH ácido).

Se observó acidificación del medio en raíces sometidas a deficiencia de  $P_i$  (Fig. III.16. inferior, en coloración amarilla), mientras que las raíces en suficiencia mostraron pH tendiendo a la neutralidad.

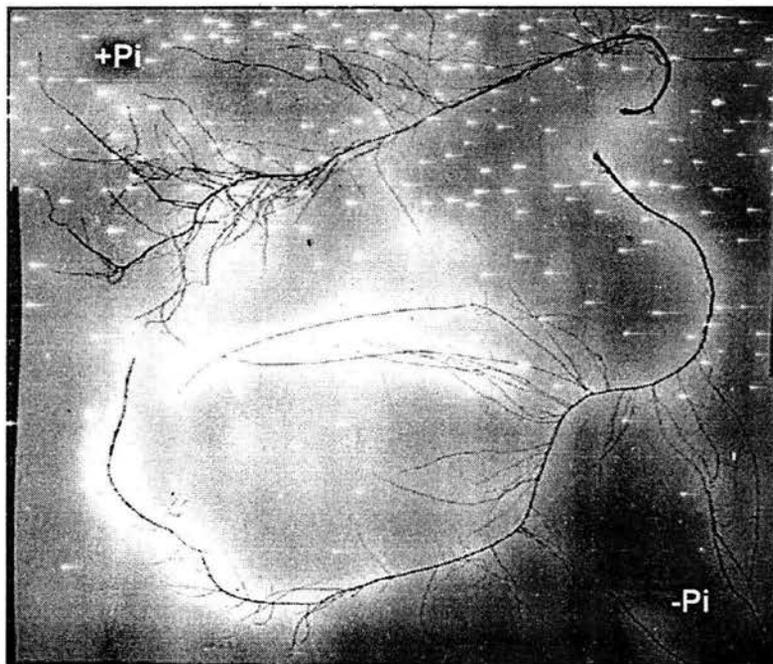


Fig. III.16. Acidificación del medio extra-radical. Gel de agarosa con púrpura de bromocresol como indicador de pH (amarillo  $\sim 5$ , púrpura  $\sim 7$ ). Después de 8 hrs. se fotografiaron las raíces laterales de plantas crecidas en suficiencia (arriba) o en deficiencia (abajo) de  $P_i$ .

### III.6 Toma de Pi

Para evaluar si la toma de Pi aumentaba durante la deficiencia de éste en plantas de soya, se diseñó un experimento en donde ápices radicales se incubaron en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato. Los resultados indican que existe un incremento notable en la incorporación de marca en las raíces crecidas en  $-\text{Pi}$ , en comparación con la que se presenta en raíces crecidas en  $+\text{Pi}$ . La cinética de incorporación es lineal en raíces de  $-\text{Pi}$  hasta los 15 minutos y en las de  $+\text{Pi}$  hasta los 20 minutos (Fig. III.17).

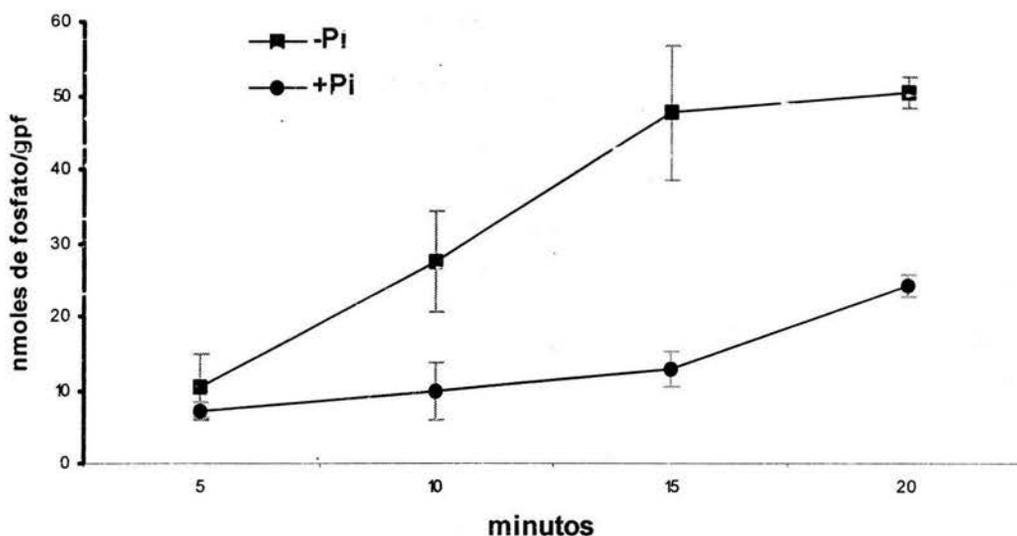


Fig. III.17. Toma de Pi en raíces de soya. Se evaluó la toma de Pi en ápices radicales de plantas de soya sometidas a  $+\text{Pi}$  o  $-\text{Pi}$  durante tres semanas mediante la incorporación de  $(^{32}\text{P})$ -ortofosfato a los ápices, se reportan los resultados como nmol de Pi incorporada por gramo de peso fresco

Algunas de las respuestas a la deficiencia de Pi presentes en soya, se han descrito en otras especies, constituyendo estrategias generales debidas a este estrés nutricional. Mucho se ha especulado sobre el valor adaptativo de estas modificaciones, pero solamente en unos cuantos casos se ha demostrado experimentalmente que ayudan a tolerar mejor la deficiencia de Pi.

En el caso de las enzimas extracelulares hidrolíticas se asume que su acción permite aumentar el Pi disponible, particularmente las fitasas parecen ser importantes para la solubilización del Pi presente en el ácido fítico. Soya al igual que *Arabidopsis*, no secreta fitasa al medio extracelular, lo que nos permitió modificar esta característica en *Arabidopsis* a través de la expresión de un gen de otro organismo (*E. coli*) y evaluar su beneficio cuando las plantas crecen en un medio de fósforo orgánico (P-org) como ácido fítico.

### III.2 Obtención de las plantas Transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

#### III.2.1 Aislamiento del Péptido señal de *Arabidopsis thaliana* y clonación en fase con la fitasa de *Escherichia coli*.

Patel (1996) describió la secuencia de un gen que codifica para una fosfatasa ácida de *A. thaliana*. La estructura del gen indicaba la presencia de un péptido señal que dirige esa proteína al medio extracelular. Haran *et al.*, (2000), usaron ese péptido señal para dirigir proteínas de fusión a la vía de secreción radical. Con base en esta secuencia, se diseñaron oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el péptido señal a partir de DNA genómico de *A. thaliana* (dado que esta secuencia carece de intrones) (Fig.III.18).

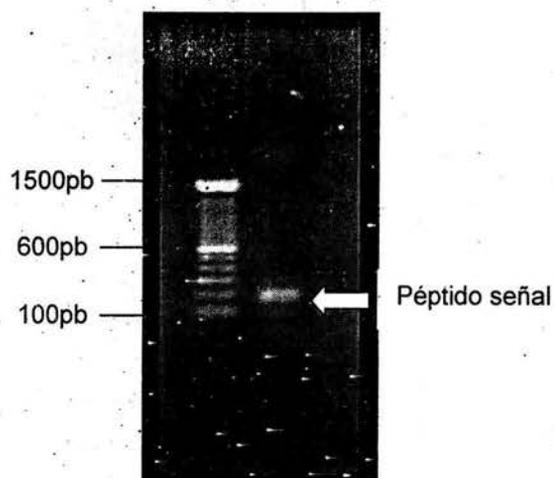


Fig. III.18. Amplificación por PCR del péptido señal para fosfatasa ácida. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el péptido señal desde DNA genómico de *A. thaliana*.

El fragmento amplificado se clonó en pBluescript SK. El gen de la fitasa utilizado en este trabajo proviene de *Escherichia coli* y codifica para una enzima que se ha expresado de manera exitosa en *A. thaliana* (Coello et al., 2001). A partir de la secuencia para este gen descrita por Dassa, et al., (1990), se diseñaron oligonucleótidos para amplificarlo desde un vector en el que se encontraba clonado para posteriormente subclonarlo en fase con el péptido señal. Una vez que ambos fragmentos estuvieron en el mismo plásmido (Fig. III.19), se mandó secuenciar y se verificó que la construcción Psen-fitasa (PSFitasa) se encontraba en fase.

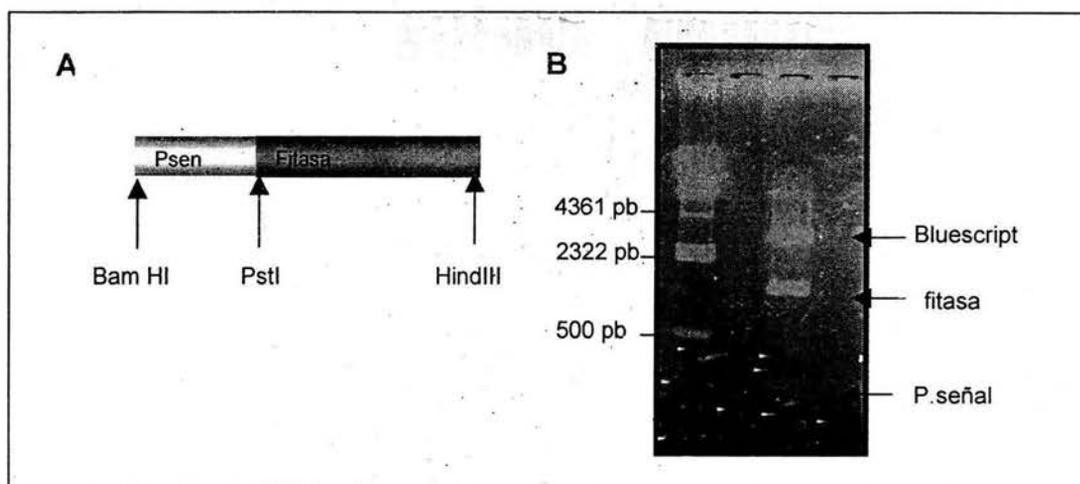


Fig. III.19. Construcción con el gen de la fitasa y el péptido señal (PSFitasa). A, esquema de la localización en la construcción del inserto fitasa-péptido señal de los sitios de restricción utilizados para su clonación. B, gel de agarosa donde se muestran los dos fragmentos en el mismo vector.

### III.2.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

El Psen-fitasa, se clonó en un vector binario, pBin-19 bajo el control del promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor y con el terminador NOS de la nopalina sintetasa (Fig. III.20).

La cepa C44 de *A. tumefaciens* se transformó con el vector binario (control) y con el vector conteniendo PSFitasa, por medio de diferentes metodologías. De todas ellas solamente el método de congelado-descongelado tuvo éxito.

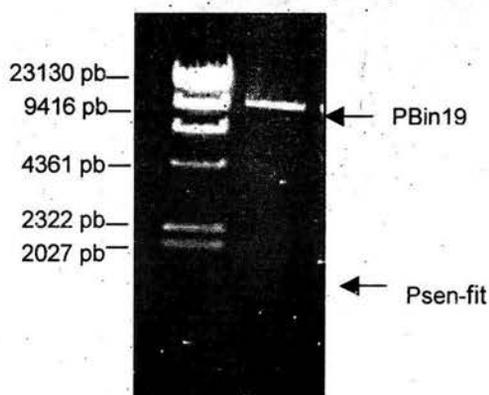


Fig III. 20. Plásmido extraído de células competentes de *A. tumefaciens* C44 que contiene el vector binario junto con el gen PSFitasa.

### III.2.3 Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez obtenidas las células transformantes de *A. tumefaciens* con pBin19-PSFitasa y con pBin19, se transformaron plantas de *A. thaliana* con el método de inmersión de los primordios florales descrito en Material y métodos.

Durante la selección de semillas transformantes se pudieron recuperar varias plantas que fueron capaces de germinar en presencia de kanamicina (Fig. III.21)

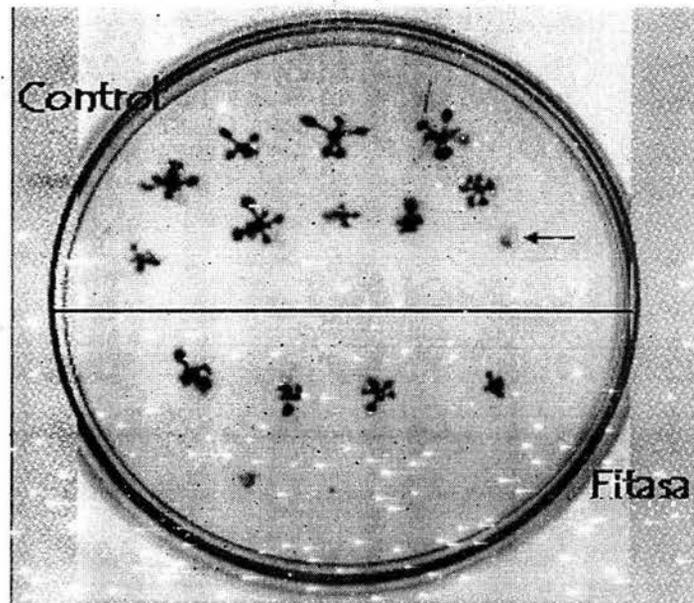


Fig III.21. Transformantes de *Arabidopsis*. Las plántulas de *Arabidopsis* que fueron capaces de germinar en presencia de kanamicina se trasplantaron a suelo para obtener semillas, la flecha indica una planta susceptible al antibiótico.

Se extrajo DNA de las transformantes y se digirió con *Eco RI*, este DNA se corrió en un gel que fue transferido a una membrana de nylon para confirmar mediante hibridación, que las plantas transformantes contuvieran el transgen o el vector únicamente, para ello se utilizaron dos sondas una con la fitasa y otra con el promotor 35S.

Los resultados de la transferencia tipo Southern muestran la existencia de varias transformantes independientes de *A. thaliana* que contienen el pBin19-PSFitasa, Fi1, Fi2, Fi3, Fi4, Fi7. Debido a que se digirió con *Eco RI* y la secuencia de fitasa no contiene un sitio de corte interno para esta enzima, es posible determinar el número de copias del transgén que contiene cada línea, las primeras tres contenían

dos copias del transgèn y tanto Fi4 como Fi7 sólo una. En el caso de las plantas transformadas con el vector pBin19, se obtuvieron 5 líneas independientes, Co1, Co2, Co5, Co6 y Co7 (Fig. III.22.).

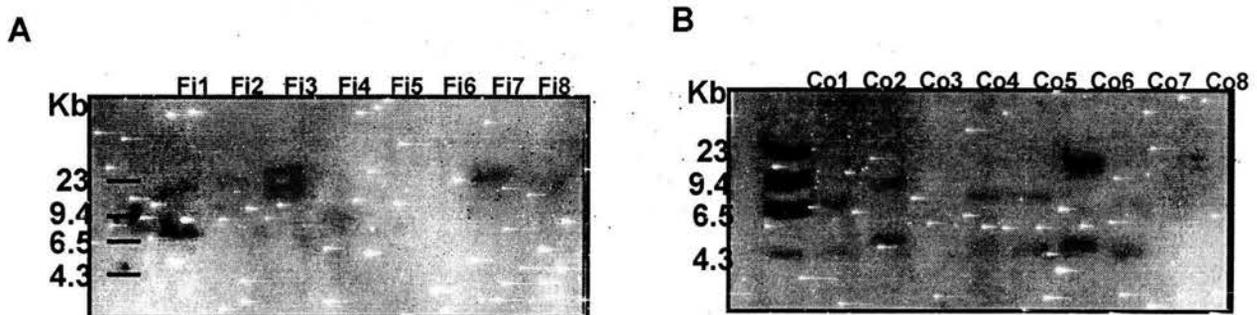


Fig. III.22. Líneas independientes de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. A, 10µg de DNA extraído de plantas transformadas con la construcción p-Bin19-PSFitasa resistentes a kanamicina se digirieron con *Eco* RI, y se sometieron a una transferencia tipo Southern utilizando el gen de fitasa marcado radiactivamente como sonda, Fi1, Fi2, Fi3, Fi4 son líneas independientes, mientras que Fi7 y Fi8 parecen ser la misma. B, 10µg de DNA, extraído de plantas transformadas el vector p-Bin19, resistentes a kanamicina se digirieron con *Eco* RI, y se sometieron a una transferencia tipo Southern utilizando el promotor 35S marcado radiactivamente como sonda, Co1, Co2, Co4, Co6 y Co7 son líneas independientes.

### III.3 Caracterización de las plantas transgénicas

#### III.3.1 Actividad de fitasa.

Para demostrar que las plantas transgénicas secretaban fitasa al medio, se evaluó la actividad de fitasa en las líneas Fi1, Fi2, Fi4, Fi7, transformadas con la construcción pBin19-PSfitasa y dos que sólo tuvieran el vector, Co1 y Co6 (Fig. III.22), todas de la T1. Se encontró que la actividad de las plantas transgénicas que

contenían el gen de la fitasa, tenían más actividad con respecto a las control (Fig. III.23). En el caso de  $Fi1$  este incremento llegó a ser de 50 veces.

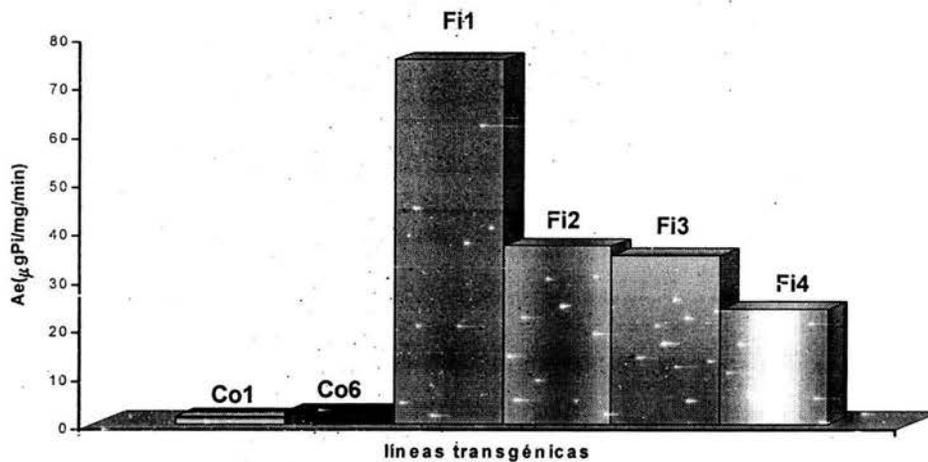


Fig. III.23 Actividad específica de fitasa que presentan las diferentes líneas transgénicas. Las plantas transgénicas se pusieron a exudar durante 3 horas y se evaluó la actividad de fitasa.

Se eligieron dos líneas de  $Fi$  y una de control para realizar los experimentos siguientes ( $Fi1$ ,  $Fi4$ ,  $Co1$ ).

### III.3.2 Crecimiento en ácido fítico.

Plantas homocigas para el transgen se crecieron dos semanas en medio completo. Al término de ese tiempo se aplicaron tres tratamientos,  $Pi$  (+ $Pi$ ), ácido fítico y sin  $Pi$  (- $Pi$ ) durante varias semanas hasta que las plantas creciendo en - $Pi$  presentaran síntomas de deficiencia (Fig. III.24). Al comparar en *A. thaliana* tipo silvestre (Columbia) y la línea  $Co1$  el crecimiento que se presentaba durante la deficiencia de  $Pi$  y el tratamiento con ácido fítico, no se observaron diferencias entre las plantas ya que presentaban rosetas y raíces de tamaño y color muy semejantes, aunque se nota una ligera mejora en la apariencia de la roseta cuando crecen en ácido fítico; por otro lado, una de las transgénicas,  $Fi1$ , tuvo un crecimiento similar al anterior, es decir sin ninguna diferencia en

cuanto a rosetas y raíces al crecer en esos medios. En el caso de la otra línea, Fi4, el desarrollo de la roseta, fue intermedio entre el tratamiento de +Pi y el de -Pi, siendo más grande y con un verde más brillante que las rosetas de plantas creciendo en deficiencia de Pi, aunque sin llegar a estar del tamaño y apariencia que presentaron las rosetas de plantas creciendo en suficiencia de Pi. Lo anterior sugiere que la secreción de fitasa al medio extraradical, podría ser benéfico para las plantas en el medio con ácido fítico como única fuente de fosfato.

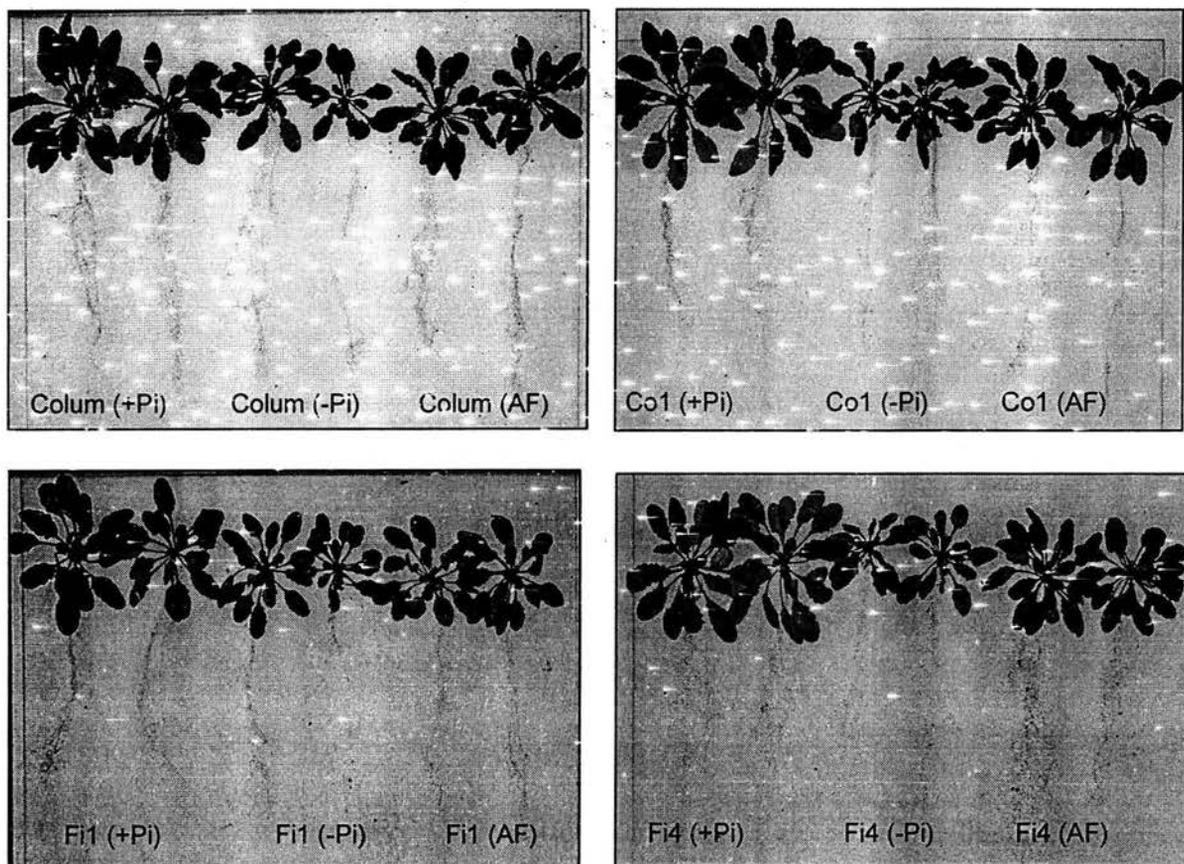


Fig.III.24. Diferencias morfológicas. Las plantas se cultivaron en medio con (+Pi) o sin (-Pi) fosfato, o con ácido fítico (AF), las líneas a las que pertenecen se indican debajo de cada planta

## IV. DISCUSIÓN

Se ha especulado mucho acerca del valor de algunas de las respuestas que las plantas presentan ante la deficiencia de  $P_i$ , para ser utilizadas como herramientas para incrementar la disponibilidad y absorción de este macronutriente (Raghothama, 1999; Vance, 2001; Dakora y Phillips, 2002). El objetivo de este trabajo, fue analizar el comportamiento de plantas de soya cultivadas en deficiencia de  $P_i$ , con el fin de conocer su respuesta ante este estrés e introducir algún cambio que favorezca el crecimiento de las plantas durante la privación de  $P_i$ .

Algunos de los síntomas que presentaron las plantas en deficiencia de  $P_i$ , es el oscurecimiento de las hojas, debido a que las células no se expanden y por tanto, la clorofila se concentra (Marshner, 1995) y la aparición de manchas café-violetáceas producidas por la acumulación de antocianinas. Las antocianinas son pigmentos que pueden prevenir el daño provocado por la absorción de luz ultravioleta, al funcionar como filtros moleculares (Poirier y Bucher, 2002). Como molécula protectora, su acumulación también está influida por otros tipos de estrés ambiental (Steyn *et al.*, 2002). En el caso de las plantas de soya, la deficiencia de  $P_i$  indujo la acumulación de antocianinas y la aparición de un color verde oscuro a partir de los 23 días de tratamiento.

Ha sido ampliamente documentado que la deficiencia de  $P_i$  promueve un crecimiento radical e inhibe el desarrollo de la parte aérea (Fan *et al.*, 2003; López-Bucio *et al.*, 2003). Cuando se considera el cociente entre el peso de la raíz y el peso del vástago, normalmente la deficiencia en  $P_i$  induce un aumento en esta relación (Bates y Lynch, 1996). En plantas de soya, observamos una importante disminución en el peso del vástago a partir de los 14 días de tratamiento. Sin embargo, la raíz no incrementó el peso, pero sí su longitud y grado de ramificación. Adicionalmente, se observó que las raíces de plantas cultivadas en deficiencia de  $P_i$  son más delgadas que las de las plantas

creciendo en suficiencia de  $P_i$ . Algunos estudios en cultivos de importancia económica, como maíz y frijol, han demostrado que las plantas con mayor tolerancia a la deficiencia de  $P_i$ , se caracterizan por mantener el crecimiento radical e incrementar el peso seco y el largo de las raíces durante la deficiencia del nutrimento (Gaume et al., 200; Lynch y Brown, 200).

Otro aspecto de la arquitectura radical que se ve modificado durante la deficiencia de  $P_i$  son los pelos radicales (Bates y Lynch, 2001(1)). En plantas de soya observamos que los pelos radicales son más largos y su densidad aumenta durante la deficiencia de  $P_i$ , favoreciendo la exploración de un mayor volumen de suelo e incrementando la superficie de absorción de la raíz.

En muchos casos, la deficiencia de  $P_i$  se debe a la incapacidad de las plantas para aprovechar diferentes compuestos fosfatados. En este caso al cultivar las plantas en fuentes alternas de  $P_i$ , como fosfato de aluminio y ácido fítico, no se encontraron diferencias entre ellas y el tratamiento de inanición de fosfato, lo que indica que soya no puede utilizar esas fuentes. Estos datos concuerdan con la observación de que, en esta variedad de soya, no se detectó la producción de ácidos orgánicos (datos no mostrados), ni fitasa durante la deficiencia de  $P_i$ .

En estados tempranos de deficiencia, los niveles de  $P_i$  citoplásmico permanecen generalmente constantes, a expensas del  $P_i$  almacenado en vacuola. En una deficiencia severa y/o prolongada, las reservas vacuolares se agotan y los niveles de  $P_i$  citoplásmico disminuyen de manera importante (Poirier y Bucher, 2002). Esto puede explicar por qué los primeros síntomas se observaron después de los 20 días de deficiencia.

La secreción radical de diversos compuestos es una de las estrategias más extendidas entre las especies vegetales para enfrentar la deficiencia de  $P_i$ , sobresaliendo la exudación de enzimas, principalmente de fosfatasas ácidas (Yadav y Tarafdar, 2001). En este trabajo se pudo observar un incremento en la secreción de fosfatasas al medio extra-radical en aquellas plantas creciendo tanto en las fuentes alternas de  $P_i$  (ácido fítico, fosfato de aluminio) como en su ausencia.

Al hacer la correlación entre el contenido de  $P_i$  y la actividad de las fosfatasas ácidas secretadas, se observó que el momento cuando la cantidad de  $P_i$  interno fue menor, correlacionó con el aumento en la actividad de fosfatasas ácidas. Estos datos sugieren que el contenido interno de  $P_i$  actúa como una señal que estimula la secreción y la actividad de estas enzimas.

Es importante resaltar que durante la deficiencia de  $P_i$ , la actividad de varias isoformas de fosfatasas ácidas aumentó tanto en extractos como en exudados radicales, sin embargo, el patrón de isoformas que presenta actividad tanto en exudados como en extractos proteicos radicales, parece ser el mismo; lo cual contrasta con lo observado en *Lupinus albus* y *Arabidopsis thaliana*, en donde se ha demostrado que existe una isoforma que responde en particular a esta condición (Gilbert et al., 1999; Coello, 2002).

Por otro lado, los geles de actividad *in vivo* ponen de manifiesto que la secreción de fosfatasa ácida durante la deficiencia de  $P_i$ , aumenta de manera homogénea en la raíz, mientras que la actividad de fosfatasa en las plantas control, parece estar más localizada en los ápices.

Un gran número de estudios han contribuido a proporcionar evidencias de la importancia de las fosfatasas ácidas en la utilización de recursos organofosfatados (Helal, 1990; Tarafdar y Jungk, 1987). Sin embargo, estudios realizados en genotipos

de frijol que son contrastantes en su capacidad de crecer en suelos orgánicos no muestran diferencias en la actividad de fosfatasa ácida (Yan *et al.*, 1996).

Entre las fosfatasas que son secretadas al medio extra-radical se encuentran las fitasas, estas enzimas presentan una alta especificidad en la degradación del fitato (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato). Su actividad produce la defosforilación del fosfato 1 ó 6 para dar origen al mio-inositol pentafosfato (Konietzny y Greiner, 2002). Las plantas que secretan fitasa podrían crecer en suelos con ácido fítico, sin embargo en los resultados obtenidos en soya, la actividad de fitasa que se presenta en exudados es muy baja y aunque parece responder a la deficiencia de  $P_i$ , no es lo suficientemente alta como para liberar  $P_i$  desde medios que contienen ácido fítico como única fuente de  $P_i$ , ya que el contenido de fosfato en esas plantas no se incrementa; por tanto la secreción de fitasa no es una respuesta universal a la deficiencia de  $P_i$  puesto que especies como soya (este trabajo) y *Arabidopsis thaliana* (Coello, 2002) no tienen esta característica.

En algunas especies vegetales como jitomate, tabaco y frijol, se ha reportado que la velocidad de toma de  $P_i$  aumenta durante la deficiencia de este nutrimento (Katz *et al.*, 1986; Ragothama, 1999). En soya, la toma de  $P_i$  también se incrementa en respuesta a la deficiencia y esto puede ser debido a la activación de los transportadores de alta afinidad de  $P_i$  que se encuentran en la raíz (Liu *et al.*, 1998). El aumento en la actividad de estos transportadores puede actuar sinérgicamente con los cambios morfológicos descritos, ya que el aumento en el volumen radical, aumenta la superficie de absorción y en este caso de toma de  $P_i$ .

Una vez caracterizada la respuesta de soya se determinó que no presenta actividad extra-radical de fitasa, como también sucede en *A. thaliana*, por lo que en la segunda parte de este trabajo, el objetivo planteado fue el evaluar si la sobre-expresión

de esta enzima en plantas de *A. thaliana*, representaba una ventaja para éstas al crecer en un medio con ácido fítico como única fuente de fósforo.

La fitasa utilizada proviene de *E. coli*, es altamente específica por ácido fítico y se ha demostrado que se expresa en forma activa en plantas de *A. thaliana* (Coello *et al.*, 2001). Se utilizó el péptido señal de una fosfatasa ácida que es efectiva para dirigir a las proteínas al medio extra-radical (Haran *et al.*, 2000).

Se produjeron plantas transgénicas que sobreexpresaran y secretaran fitasa; se obtuvieron por lo menos 2 líneas independientes con alta actividad de fitasa en el medio extraradical. Se observó que una de las líneas transgénicas evaluadas (F14), presentó un mejor crecimiento en ácido fítico que en  $-P_i$ , aunque no llegó a tener la apariencia de las plantas creciendo en  $+P$ . Esta capacidad parece depender del número de copias del transgen, ya que la línea con mayor actividad de fitasa (F11) que tiene insertadas dos copias, presentó un desarrollo muy parecido creciendo en ácido fítico o en ausencia de  $P_i$ , una posibilidad es que en esta línea, la sobreexpresión de la enzima represente un costo metabólico muy elevado aunque deben realizarse más estudios para investigar esta relación.

Los resultados obtenidos con estas líneas no son concluyentes acerca del efecto que tiene la secreción de fitasa en el crecimiento cuando se tiene ácido fítico como única fuente de fosfato, por lo que se hace indispensable continuar caracterizando estas transgénicas. Dicha evaluación consistiría en determinar el contenido de  $P_i$  y el peso seco de estas plantas creciendo tanto en ácido fítico como en suficiencia y ausencia de  $P_i$ ; además se deben analizar las respuestas de otras líneas para determinar si el beneficio, si es que existe, se limita a plantas que contienen sólo una copia del transgen.

## V. CONCLUSIONES

- Soya Tapachula 86 presenta modificaciones en su sistema radical durante la deficiencia de Pi, estas incluyen la elongación de la raíz, un aumento en la densidad y longitud de pelos radicales.
- Esta variedad de soya responde a la deficiencia de Pi secretando fosfatasa ácida al medio y acidificando el medio extracelular.
- La velocidad en la toma de Pi aumenta durante la deficiencia de Pi.
- La secreción de fitasa no es un mecanismo utilizado por esta variedad de soya en respuesta a la deficiencia de Pi.
- Las plantas transgénicas que secretan fitasa presentan un aumento en la actividad de esta enzima en el medio extra-radical
- No se logró determinar si existe o no un efecto benéfico en las plantas que secretan fitasa al crecer en medio con ácido fítico

## REFERENCIAS.

- Ames B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* 8, 115-118.
- Aono T., Kanada, N., Ijima, A. y H. Oyaizu. 2001. The response of the Phosphate uptake and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. *Plant Cell Physiol.* 42 (11):1253-1264.
- Bates T y JP. Lynch. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* 19:529-538.
- Bates T, y JP Lynch. 2000 (1). The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *Am. J. Bot.* 87(7):964-970
- Bates T, y JP Lynch. 2000 (2). Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 87(7):958-963.
- Benfey PN, Ren L, Chua NH. 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO Journal* 8(8):1295-2202
- 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
- Brundrett M. CSIRO Forestry and Forest. <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/vam.html>. Última modificación octubre 1999
- Clough SJ y AF. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal.* 16:735-743
- Chiariello N, Hickman y Mooney. 1982. Endomycorrhizal role for interspecific Transfer of phosphorus in a community of Annual Plants. *Science* 217:941-943
- Coello P. 2002. Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 116:293-298.
- Coello P, Maughan JP, Mendoza A, Philip R, bollinger DW, Veum TL, Vodkin LO y Polacco J. 2001. Generation of low phytic acid *Arabidopsis* seeds expressing an *E. coli* phytase during embryo development. *Seed Science research* 11: 285-291.
- Dakora FD, Phillips DA. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. *Plant and Soil* 245:35-47.

- Dassa J., Marck C., y P. Boquet. 1990. The complete Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* Gene appA Reveals Significant Homology between pH 2.5 Acid Phosphatase and Glucose-1-Phosphatase. *Journal of Bacteriology*. 172,9:5497-5500
- Delhaize E, Hebb DM, Ryan P. 2001. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* Citrate Syntase Gene in tobacco is not associated with Either Enhanced Citrate Accumulation or Efflux. *Plant Physiology* 125:2059-2067.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. Isolation of DNA from higher plants. *PMB Reporter* 4:19-21
- de la Fuente J.M. Ramirez-Rodriguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L. 1997. Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568.
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plantarum* 90:781-800.
- Duff SMG, Lefevre DD y Plaxton WC. 1989. Purification and characterization of a Phosphoenolpyruvate Phosphatase from *Brassica nigra* Suspension Cells. *Plant Physiol.* 90:734-741.
- Fan M, Zhu J, Richards C, Brown K.M y J Lurch. 2003. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus stressed roots. *Functional Plant Biology*. 30: 493-506.
- Furihata T, Suzuki M, Sakura H. 1992. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol* 33: 1151-1157
- Gaume A, Mächler F, y E. Frossard. 2001. Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: Root exudation of organic acids and influence of phosphorous nutrition. *Plant Soil* 234:73-81
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allan DL. 1999. Acid phosphatase activity in phosphorus deficient white lupinus roots. *Plant Cell Environ* 22:801-810.
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allen DL. 2000. Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Annals Bot*, 85:921-928
- Grossman A, y H Takahashi. 2001. Macronutrient utilization by photosynthetic Eukariotes and the Fabric of Interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. 52:163-210.
- Grotz N, y ML Guerinot. 2002. Limiting nutrients: an old problem with new solutions?. *Curr Op Plant Biol.* 5:158-163
- Guzmán-Plazola RA y Ferrera- Cerrato R. 1990. La endomicorriza VA en la leguminosas. Edit Centro de edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México.

- Hamburguer D, Rezzonico E, MacDonald-Comber PJ, Somerville C y Poirier C. 2002. Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xilem. *Plant Cell* 14:889-902.
- Haran S, Logendra S, Seskar M, Bretanova M, y Raskin J. characterization of Arabidopsis Acid Phosphatase Promoter and Regulation of Acid Phosphatase Expression. *Plant Physiol* 124:615-626
- Harrison MJ, van Buuren M, 1995. A phosphate transporter from the micorrizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378(6557):626-629
- Hayes JE, Richardson AE, y Simpson RJ. 2000. Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biol Fertil Soils* 32:279-286.
- Helal HM 1990 Varietal differences in root phosphatase activity as related to the utilisation of organic phosphates. *Plant Soil* 123,161-163.
- Hymowitz, T. 1970. 42! On the Domestication of the Soybean. *Economic Botany*. 24(4):408-421.
- Jasper A y Dacy A. 1993. Root characteristics of native plants species in relation to the Benefit of Mycorrhizal Colonization for phosphorus uptake. *Plant Soil* 156:281-284.
- Katz DB, Gerolff GC, Gabelman WH. 1986. Effects of phosphate stress on the rate of phosphate uptake during resupply to deficient tomato plants *Physiol Plant* 67:23-28.
- Konietzny U y Greiner R, 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases) *International Journal of Food Science and Technology* 37: 791-812.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227, 680-685.
- 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  $P_i$ -absorption rate. *Plant Physiol*. 93:504-511
- Leggewie G, Willmitzer L y Riesmer JW. 1997. Two cDNAs fro potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters of higher plants. *Plant Cell* 9:381-382
- Li M, Osaka M, Rao IM y Tadano T. 1997. Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil* 195:161-169
- Liu C, Muchhal US, Mukatira U, Konowicz AK y Raghothama KG. 1998. Tomato phosphate transporters genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116:91-96
- López-Bucio J, Martínez O, Guevara-García, Herrera-Estrella L. 2000. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotech* 18:450-453

- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 129:244-256.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A y Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in Plant Biology*. 6:1-8.
- Lynch JP. 1995. Root Architecture and Plant productivity. *Plant Physiol* 109:7-13
- Lynch J, Brown K. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiologia Plantarum* 100:613-619.
- Lynch JP y KM Brown. 2001. Topsoil foraging –an architectural adaptation to low phosphorus availability. *Plant Soil* 273:225-237.
- Ma Z, Walk TC, Marcus A, y Lynch JP. 2001. Morphological synergism in root hair length, density, initiation and geometry acquisition in *Arabidopsis thaliana*: a modeling approach. *Plant Soil* 236, 221-235.
- Martin AC, Del pozo JC, Iglesias JC, Rubio V, Solano R, Dela peña A, Leyva A, Paz-Ares J. 2000. Influence of cytokinins on the expresión of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 24:559-567.
- Marshner H. 1992. Nutrient dynamics at the Soil-Root interface (rhisosphere) in mycorrhizas in ecosystems, DH Lewis A.H Fitter y J Alexander, editores. CAB international. UK. pp3-12.
- Marshner H. Mineral nutrition in higher plants. 1995. 2 ed Academic press London.
- Mimura T. 1995. Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol* 36: 1-7
- Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S, Shibata D, 1997. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* High-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7098-7102.
- McCully ME. 1999. ROOTS IN SOIL: Unearthing the complexities of roots and their rhisospheres. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 50: 695-718
- Morales SL y Coello C MP. 2003. purificación y caracterización de una fosfatasa inducida por deficiencia de fosfato en raíces de frijol. Tesis UNAM.
- Muchhal US, Pardo JM, y KG Raghothama. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:10519-10523.
- Muchhal US, y KG Raghothama. 1999. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5868-5872

- Mukatira U, Liu C, Varadarajan DK, Raghothama K. 2001. Negative regulation of phosphate starvation- Induced genes. *Plant Physiol* 127: 1854-1862.
- Narang RA, Altman T. 2001. Plant Heterosis in *Arabidopsis thaliana*: a morphological and physiological analysis. *Plant Soil* 234: 91-97.
- Neuman G y E. Martinoia. 2002. Cluster roots -An underground adaptation for survival in extreme environments. *TRENDS Plant Sci* 7(4).
- Patel K, Lockless S, Thomas B, McKnight T.D. 1996. A secreted purple acid phosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol Suppl* 11:81.
- Pieters A.J. Paul M. J. Lawlor D.W. 2001. Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. *Journal of experimental Botany*, 52,358:1083-1091.
- Poirier Y y Bucher M. 2002. phosphate Transport and Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 2002. American Society of plant Biologists.
- Pozo del JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, Peña de la Alicia, Aragoncillo C. y J Paz-Ares. 1999. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing/oxidative stress conditions. *Plant J.* 19(5): 579-589.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate Acquisition. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-93
- Raghothama, K.G. 2000. Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3:182-187
- Rao MA, Violante A, Gianfeda L. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biol. Biochem.* 32:1007-1014
- Richardson AE, Hadobas PA y Hayes JE. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* ohytase from *Arabidopsis* roots enables Plants to obtain phosphorus from phytate. *Plan J.* 25(6):1-10.
- Rojo MJ, Carcedo SG, Mateos MP. 1990. Distribution and characterization of phosphatase and organic phosphorus in soil fractions. *Soil Biology & Biochemistry* 22(2):169-174.
- Ryan PR, Delhaize ED, y DL Jones. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:527-60
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2<sup>o</sup> ed Cold Spring Harbor Laboratory press USA. tomo 2
- Sas L, Rengel Z, Tang C. 2001. Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Sci.* 160:1191-1198.
- Schachatman DP, Reid RJ y SM Ayling. 1998. Phosphorus Uptake: from Soil to cell. *Plant physiol* 116: 447-453

- Smith FW, Rae AL y Hawkesford MJ. 2000. Molecular mechanisms of phosphate and sulfate transport in plants. *Biochemica et Biophysica Acta* 1465:236-245.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM y Jacobs G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155(3):349-351.
- Tanimoto M, Roberts K, y L Dolan. 1995. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8(6):943-948.
- Tarafdar JC, Jungk A, 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils* 3(4): 199-204
- Trull MC, Deikman J, 1998. An *Arabidopsis* mutant missing one acid phosphatase isoform. *Planta* 206: 544-550.
- Vance CP. 2001. Symbiotic Nitrogen fixation and phosphorus Acquisition. *Plant Nutrition in a world of declining renewable resources.* *Plant Physiol* 127:390-397
- Vance CP, Uhde-Stone, Allan DL, 2003 Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157 (3): 423-44.
- Vincent JBC, Crowde MW, y BA Averill. 1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.* 17: 105-110.
- West HM, 1996. Competition between *Holcus lanatus* and *Dactylis glomerata*. *Ecology* 84:426-438.
- Yadav RS, Tarafdar JC. 2001. Influence of organic and inorganic phosphorus supli on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biol Fertil Soils* 34: 140-143
- Yan X, Liao H, Trull MC, Beebe SE y JP Lynch. 2001. Induction of a Major leaf acid Phosphatase Does not confer adaptation to Low Phosphorus Availability in Common Bean. *Plant Physiol.* 125:1901-1911.
- Zhang FS, Ma J, y YP Cao. 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilizatiuon of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raghanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant Soil* 196:261-264