



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

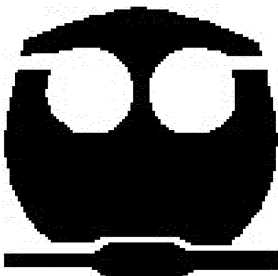
---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS  
TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana* QUE  
SOBREEXPRESAN Y SECRETAN FITASA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:  
LILIANA LAGUNAS TAPIA



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Irma Ofelia Bernal Lugo
Vocal	Profa. Alicia Cervantes Peredo
Secretario	Profa. Patricia Coello Coutiño
1er Suplente	Profa. Rosario Adelaida Muñoz Clares
2da Suplente	Profa. Catalina Machuca Rodríguez

Departamento de Bioquímica, Conjunto E  
Facultad de Química.

Asesor: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Supervisor Técnico: M. en C. Selene Fragoso Iñiguez

Sustentante: Liliana Lagunas Tapia



## Indice

<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Introduccion</b>	
3	
2.1 Nutrición : vida vegetal	3
2.2 Fósforo, eje estructural, metabólico y regulatorio	5
2.3 Deficiencia de fosfato	
6	
2.4 Estrategias contra la deficiencia de fosfato	7
2.4.1 Respuestas morfológicas	7
2.4.2 Reapuestas bioquímicas	9
2.5 Antecedentes del trabajo	15
<b>3. Justificación</b>	
17	
<b>4. Hipótesis</b>	17
<b>5. Objetivos</b>	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos Particulares	
18	
<b>6. Materiales y métodos</b>	19
6.1 Material biológico	19
6.2 Extracción de DNA	19
6.3 Extracción de RNA	20
6.4 Transferencia tipo Northern	
21	
6.5 Hibridación de las membranas	21
6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	
22	

---



---

6.7 Actividad de fitasa y fosfatasas ácidas	23
6.8 Hidrólisis del ácido fítico	25
6.9 Contenido de Pi en raíces	25
6.10 Comparación fenotípica	25
6.11 Crecimiento en un medio con ácido fítico como única fuente de fosfato	26
<b>7. Resultados</b>	<b>27</b>
7.1 Selección de plantas transgénicas	27
7.2 Caracterización de plantas transgénicas	30
7.3 Estabilidad del ácido fítico en el medio	32
7.4 Crecimiento de plantas transgénicas en diferentes medios	35
7.5 Hidrólisis del ácido fítico <i>in vivo</i>	36
<b>8. Discusión de resultados</b>	<b>40</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>43</b>
<b>10. Referencias</b>	<b>44</b>

---



## 1. Resumen

El suelo es un sustrato que sirve como medio de anclaje a las raíces de las plantas y como sostén nutritivo para las mismas. Éste representa una fuente directa de nutrimentos necesarios para un desarrollo adecuado. El fósforo es uno de los nutrimentos indispensables en la nutrición vegetal, ya que es un componente esencial de biomoléculas, por lo tanto su deficiencia causa graves problemas a las plantas. Las plantas toman el fósforo del suelo en forma de ión ortofosfato, este ión es muy reactivo y forma complejos estables en el suelo. Por esta razón existen condiciones de baja disponibilidad de este nutrimento.

Para contrarrestar estas condiciones de deficiencia, las plantas han desarrollado diferentes estrategias que les permiten utilizar el fosfato de manera más eficiente. Existen dos tipos de estrategias, bioquímicas y morfológicas. En cuanto a las estrategias bioquímicas, las plantas incrementan la expresión y actividad de enzimas como fosfatasas, que hidrolizan los compuestos orgánicos fosfatados, aumentando el fosfato libre. Un tipo particular de fosfatasas, son las fitasas, que hidrolizan específicamente el ácido fítico, que es un compuesto orgánico presente en altas concentraciones en algunos tipos de suelo. No todas las plantas tienen la capacidad de secretar fitasa en respuesta a la deficiencia de fósforo.

En el laboratorio se han obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan y secretan una fitasa de *Escherichia coli*. El objetivo de este trabajo, es caracterizar el desarrollo de estas plantas en diferentes fuentes de fosfato.



Los resultados obtenidos indicaron que las plantas transgénicas no tienen ninguna característica fenotípica asociada al gen de la fitasa y crecen de forma normal cuando las condiciones de crecimiento son óptimas. El análisis de la expresión del gen de la fitasa, mediante una transferencia tipo Northern, muestra que las líneas transgénicas presentan diferente nivel de expresión concordando con los datos de actividad de la fitasa en los exudados de éstas líneas. En ambos casos, Fi 1 y Fi 4 fueron las líneas con mayor expresión y actividad.

El crecimiento de algunas de las líneas transgénicas en un medio sólido  $+2 \text{ Pi}$  y con ácido fítico como fuente de fosfato, mostró que, mientras el crecimiento con  $\text{Pi}$  era importante, las plantas que se encontraban en un medio no adicionado de  $\text{Pi}$  y en un medio con ácido fítico, no crecieron y entre ellas no existía ninguna diferencia. A pesar de esto, se demostró que las plantas secretan enzima y que ésta es capaz de hidrolizar el ácido fítico. Además, se observó que el  $\text{Pi}$  liberado de esta hidrólisis, se transporta a las raíces.

El análisis de los resultados, sugiere que la sobreexpresión del gen de la fitasa bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, podría representar un costo metabólico alto y que el fosfato asimilado no compensa la energía gastada en la sobreexpresión y secreción de la misma.



## 2. Introducción

### 2.1 Nutrición: vida vegetal.

El suelo representa un sustrato físico, químico y biológico complejo; dentro del medio ambiente, el suelo cumple una doble función, por un lado servir como medio de anclaje a las raíces de las plantas y por otro como sostén nutritivo, ya que es la fuente directa de los nutrientes necesarios para un crecimiento y desarrollo adecuado. Estos nutrientes se dividen principalmente en dos grupos, los micronutrientes que son los que se utilizan en poca cantidad y los macronutrientes que son los que se utilizan en mayor cantidad. Existen niveles en el suelo de ambos tipos de nutrientes adecuados para cubrir los requerimientos de las plantas (Tabla 2.1)

**Tabla 2.1.** Niveles adecuados de los nutrientes que pueden ser requeridos por la plantas expresados en concentraciones por peso seco de suelo ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ , ppm o %) (Epstein, 1972)

Niveles óptimos de los nutrientes requeridos por las plantas		
Elemento	Símbolo químico	Concentración en peso seco
<b>Macronutrientes</b>		<b><math>\mu\text{mol g}^{-1}</math></b>
Nitrógeno	N	1000
Potasio	K	250
Calcio	Ca	150
Magnesio	Mg	80
Fósforo	P	60
Sulfuro	S	30
Silicio	Si	30
<b>Micronutrientes</b>		<b>ppm o %</b>
Cloro	Cl	3.0
Fierro	Fe	2.0
Boro	B	2.0
Manganeso	Mn	1.0
Sodio	Na	0.4



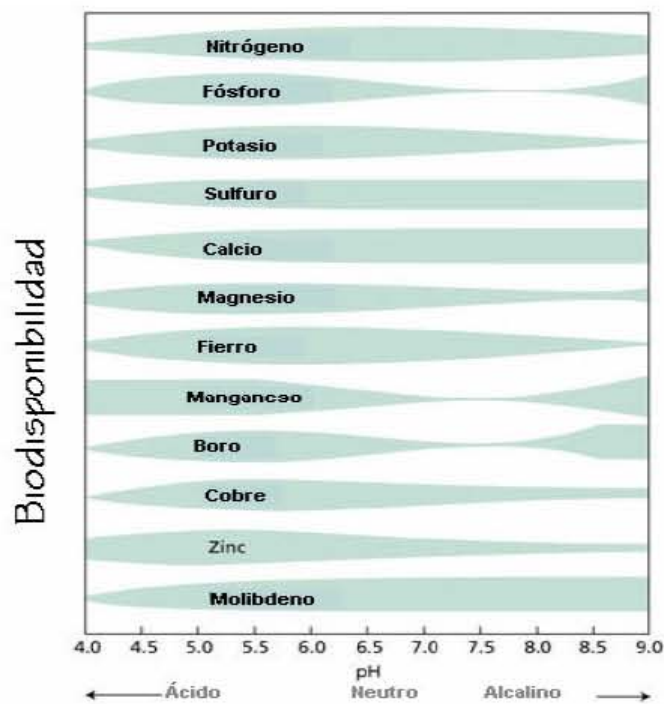


Zinc

Zn

0.3

En ocasiones, el suelo cultivable no contiene los nutrimentos necesarios para un buen desarrollo y crecimiento vegetal; además, la biodisponibilidad de estos nutrimentos está mediada por el pH del medio (Figura 2.1), todo esto en conjunto, produce respuestas de deficiencia en las plantas ante la carencia de estos elementos.



**Fig. 2.1.** Biodisponibilidad de los nutrimentos de acuerdo al pH. El área sombreada indica las disponibilidad de cada nutriente a los diferentes pH (modificada de <http://>

La deficiencia de ciertos nutrimentos en el suelo provoca cambios físicamente notables en la morfología de las plantas. En la deficiencia de fosfato (Figura 2.2) las hojas presentan, inicialmente una coloración verde oscuro, y posteriormente un color púrpura, debido a la clorosis y la



acumulación de antocianinas respectivamente. Cuando se presenta una deficiencia mayor, la planta puede detener su desarrollo y no se reproduce, muriendo en etapas tempranas.



**Fig. 2.2.** Síntomas característicos que presentan las plantas en un medio ambiente con deficiencia de fosfato. (modificada de [http://www.infojardin.com /carencias-nutrientes-](http://www.infojardin.com/carencias-nutrientes-)

## 2.2 Fósforo, eje estructural, metabólico y regulatorio.

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas. El P presente en las plantas juega un papel importante en varios procesos, los cuales incluyen la generación de energía, la síntesis de ácidos nucleicos, la fotosíntesis, la glicólisis, la respiración, la síntesis y estabilidad de las membranas, la activación / desactivación de enzimas y en el metabolismo del carbono (Vance, *et al.*, 2002). El fosfato forma enlaces ester fosfato que representan una fuente de energía metabólica en las rutas de biosíntesis y degradación en la célula; además, actúa como una molécula



regulatoria a través del mecanismo de fosforilación–defosforilación (Marschner, 1995)

En los ecosistemas naturales, el fósforo es convertido a fosfato orgánico e inorgánico por procesos biológicos y químicos (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002). Las raíces de las plantas asimilan el fósforo en forma de ión ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y su concentración en el suelo, no es mayor a 10  $\mu\text{M}$ . Esto representa una concentración de fosfato por debajo de las concentraciones existentes en tejidos vegetales (5-20 mM) (Raghotama, 1999).

### 2.3 Deficiencia de Fosfato

Dentro de los macronutrientes, el Pi es el que tiene menor disponibilidad en el suelo, ya que sus niveles son regulados principalmente por las interacciones con moléculas orgánicas e inorgánicas (Raghotama, 1999). Las formas orgánicas representan alrededor del 30-80% del P total en el suelo (Harrison 1987) y dentro de estas, el fitato es la forma mayoritaria (Anderson, 1980).

En países industrializados, la deficiencia de fósforo o de otros macronutrientes en los suelos usados para la agricultura, es compensada por la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes, los cuales garantizan una alta productividad en los cultivos y cosechas (Poirier y Bucher, 2002 y Plaxton, 2004). Sin embargo, el uso de fertilizantes trae consigo varios problemas como un alto costo y una fuente de contaminación, ya que sólo el 20% del fertilizante que es aplicado a los suelos es aprovechado por los cultivos. El agua que se fuga de los cultivos fertilizados contiene una alta concentración de éstos y por lo tanto es causa de problemas ambientales. Para aliviar los



efectos negativos del uso de fertilizantes, se deben buscar alternativas que no dañen el medio ambiente, por esta razón es importante conocer cómo las plantas han logrado tener un crecimiento y desarrollo adecuado en suelos con deficiencia de fósforo, desarrollando estrategias que les permitan obtener los nutrientes necesarios (Poirier y Bucher, 2002) y basándonos en estas estrategias proponer una solución al problema de la deficiencia de fósforo.

## **2.4 Estrategias contra la deficiencia del fósforo**

Para sobrevivir con una baja disponibilidad de fósforo, las plantas han desarrollado sofisticadas estrategias fisiológicas y bioquímicas para aumentar la adquisición y removilización de este nutriente. Las respuestas a la deficiencia de fósforo les permiten solubilizar el fósforo que se encuentra en compuestos no asimilables en el suelo y mantener una concentración constante de Pi en el citoplasma para realizar óptimamente sus funciones (Raghotama 1999). Estas respuestas se pueden dividir en respuestas morfológicas y respuestas bioquímicas.

### **2.4.1. Respuestas morfológicas**

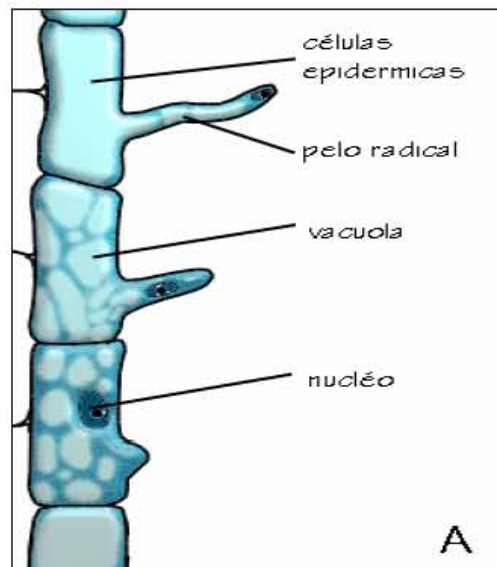
#### **Cambios morfológicos de la raíz y su arquitectura.**

El conjunto de características que determinan el crecimiento y configuración del sistema radical en el tiempo y espacio, se denomina arquitectura radical (Raghotama, 1999). Ésta se ve modificada cuando la planta se encuentra en deficiencia de fósforo (Lynch y Brown, 2001). Dentro de los cambios morfológicos existe un crecimiento sostenido de la raíz mientras que el vástago se detiene. Hay un incremento en la



longitud y densidad de los pelos radicales y en la proliferación de raíces laterales (Poirier y Bucher, 2002).

La producción de pelos radicales, que son extensiones subcelulares de la epidermis de la raíz, facilitan la adquisición de nutrimentos (Bates y Lynch 1996)



**Fig. 2.3. ( A )** Desarrollo del pelo radical. **( B )** Cambios en el crecimiento de pelos radicales en *Arabidopsis* sometidas a la deficiencia de fosfato ( $5\mu\text{M}$ ) (Poirier y Bucher,

Bates y Lynch (1996, 2000) demostraron la importancia que tienen los pelos radicales en la adquisición de  $\text{P}_i$  en *Arabidopsis* al usar dos mutantes, uno deficiente en la elongación de los pelos radicales (*rdh2*) y otro en el cuál la densidad de los pelos radicales estaba reducida (*rdh6*). Cuando las plantas se cultivaban en una concentración baja de  $\text{P}_i$  ( $0.4 \mu\text{M}$ ), todas las plantas eran pequeñas y mostraban síntomas de deficiencia. Al crecerlas con una concentración de  $1.5 \mu\text{M}$  de  $\text{P}_i$ , las plantas control (WT) tenían más biomasa en el vástago y presentaban una mayor toma de  $\text{P}_i$  que las dos mutantes y a una concentración con suficiencia de  $\text{P}_i$  ( $54 \mu\text{M}$ ) no había diferencia en el crecimiento de las plantas. Esto implica que la capacidad de absorber  $\text{P}_i$  a través de los pelos radicales se hace más evidente a bajas concentraciones de este nutrimento.



## 2.4.2 Respuestas bioquímicas:

### Transportadores de fosfato.

Los sistemas de transporte específicos son esenciales para la toma y redistribución de fosfato dentro de las plantas (Smith et al. , 2003); existen dos rutas de transporte en las raíces de la plantas: por el apoplasta y por el simplasma. En el transporte apoplásmico, los iones viajan intracelularmente en células corticales de raíces y la restricción del paso de iones a la estela en este transporte, es mediante la banda de Caspari que se encuentra entre las células de la corteza y la estela (Figura 2.5) (Smith, 2002). En el transporte simplásmico los iones pueden cruzar la membrana de las células corticales y epidermales de la raíz hasta llegar a la estela. Este movimiento de iones es un paso crucial en el transporte de nutrientes dentro de la planta; estos iones son distribuidos por el xilema dentro de toda la planta (Smith et al. , 2003). En este transporte, el paso de los iones está mediado por proteínas transportadoras específicas que han sido caracterizadas. De acuerdo a las características cinéticas de las proteínas transportadoras de fosfato, se conocen dos sistemas , el de baja afinidad cuya expresión es constitutiva, con  $K_m$  entre 50 y 330  $\mu M$  y el de alta afinidad con  $K_m$  entre 3-7  $\mu M$ , el cual es inducido por la deficiencia de fosfato y su expresión es preferentemente en raíz (Muchal y Raghotama, 1999). Los iones ortofosfato son tomados por las proteínas transportadores que se encuentran en las células de la epidermis de la raíz y en los pelos radicales (Rausch y Bucher , 2002). El fosfato que entra a la planta tiene cuatro posibles destinos dentro de ella: (1) entrar al metabolismo para la formación del grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP; (2) entrar a las vías de biosíntesis

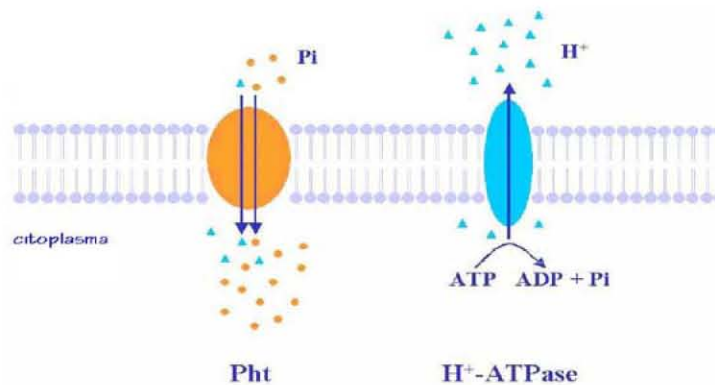


de lípidos, DNA y RNA; (3) almacenarse en vacuola y (4) transportarse a los diferentes órganos de la planta (Rausch y Bucher, 2002)

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado nueve genes que codifican para transportadores de Pi de alta afinidad. Esta familia génica lleva el nombre de *Pht1* (Bucher 2001). Los genes *Pht1* de *Arabidopsis thaliana* son predominantemente expresados en raíz (Smith *et al.*, 1997; Poirier y Bucher, 2002) y las proteínas no solo están involucradas en la toma de Pi del suelo, sino también juegan un papel importante en la translocación de Pi dentro de la planta (Poirier y Bucher, 2002). En *Arabidopsis thaliana* se ha visto que en deficiencia de Pi, aumentan los niveles de transcritos de esta familia génica (Shin *et al.*, 2004)

Se han identificado genes similares en diferentes especies vegetales como jitomate (*LePT1* y *LePT2*), papa (*StPT1* y *StPT2*) y *Medicago truncatula* (*MtPT1* y *MtPT2*) (Raghotama, 1999)

La adquisición de los iones ortofosfato es un proceso que requiere energía, estos deben moverse a través de un gradiente eléctrico ya que el interior de la célula está cargada negativamente. La energía requerida es mediada por una H<sup>+</sup>-ATPasa, la cual bombea los protones fuera de la célula creando un gradiente en la membrana plasmática, y el regreso de los protones a las células está acoplado a la entrada de iones ortofosfato a través de un cotransporte (Figura 2.4) (Smith, 2002).

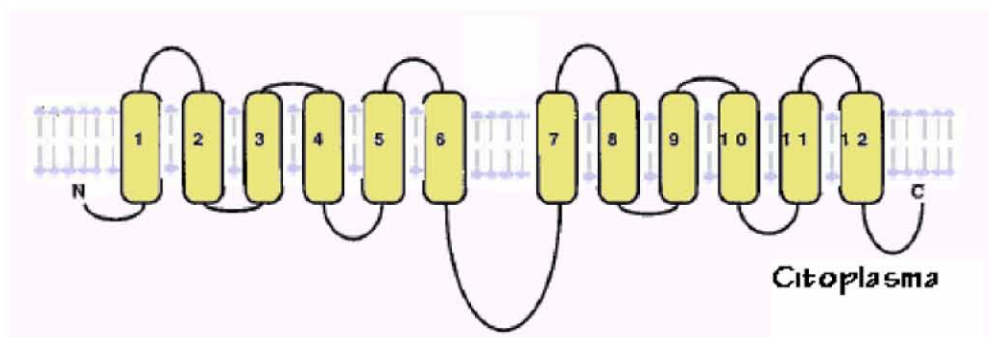


**Fig. 2.4.** Modelo del transporte de fosfato dentro de la célula (Poirier y Bucher 2002)





Cada transportador tiene 12 dominios intermembranales separados en dos grupos de seis (configuración 6+6) por una asa central hidrofóbica. Los dominios intermembranales están separados por asas extracelulares e intracelulares, por lo que un análisis predice que los extremos N y C y el asa central hidrofóbica están orientadas hacia la parte interna de la membrana (Figura 2.5) (Raghotama, 1999; Smith, 2002).



**Fig.2.5.** Modelo propuesto para los transportadores de Pi (Raghotama, 1999)

### **Producción de fosfatasa ácidas.**

Más del 50% de fósforo total del suelo se encuentra en su forma orgánica. Estas fuentes orgánicas deben ser hidrolizadas para que las plantas aprovechen el fosfato liberado (Richardson *et al.*, 2001). Las fosfatasa intracelulares y extracelulares son las encargadas de la hidrólisis de grupos monoesteres de fosfato que componen estas fuentes orgánicas ( Figura 2.6 ), favoreciendo la movilización y translocación de Pi en condiciones de deficiencia (Duff *et al.*, 1994).



**Fig.2.6.** Hidrólisis de los grupos fosfoester por las fosfatasas (Plaxton, 2004)

Las fosfatasas que actúan en el suelo son producidas por las raíces de las plantas, por hongos como *Aspergillus*, micorrizas y bacterias (Tarafdar *et al.*; 2001)

Las fosfatasas se clasifican en ácidas y alcalinas de acuerdo al pH óptimo para la catálisis ( Duff *et al.*, 1994). Las fosfatasas alcalinas presentan una especificidad por sustratos y participan en el metabolismo. Ejemplos de esta clase de fosfatasa en plantas es la fructosa-1,6-bifosfatasa, que cataliza una reacción que es parte de la gluconeogénesis ( Mathews, 2001).



Las fosfatasa ácidas son generalmente inespecíficas, por lo que se piensa que son importantes en la liberación de Pi desde fuentes orgánicas durante la deficiencia de Pi ( Duff *et al.*, 1994).

Existen factores determinantes para el incremento de la expresión de fosfatasas ácidas (APasas) intra y/o extracelulares. Dentro de estos factores se encuentra la exposición de las raíces de las plantas a cationes como el níquel (Ni<sup>2+</sup>), calcio (Ca<sup>2+</sup>) y magnesio (Mg<sup>2+</sup>), el estrés salino, germinación de la semilla, infección patógena y el estrés por deficiencia de agua y fosfato (Duff *et al.*, 1994).



Las fitasas (myo-inositol hexafosfato fosfohidrolasa) tienen como sustrato específico al ácido fítico; conocido también como fitato. Es una molécula con seis grupos ortofosfato de nombre químico myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato (Figura 2.7). Existe en la naturaleza en forma de sales con cationes monovalentes y divalentes, en particular el ión fitato reacciona con elementos minerales como el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  (Liu *et al.*, 1998). Se considera al ácido fítico como un agente antinutricional ya que forma quelatos con los iones previamente citados, lo que disminuye la biodisponibilidad de importantes minerales nutritivos (Nagashima *et al.*, 1999), ocasionando que no se absorban en el tracto intestinal de los animales (Liu *et al.*, 1998)

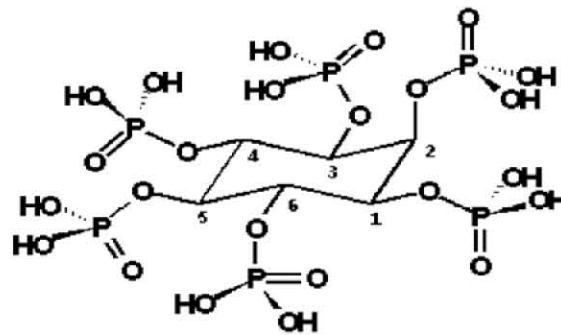
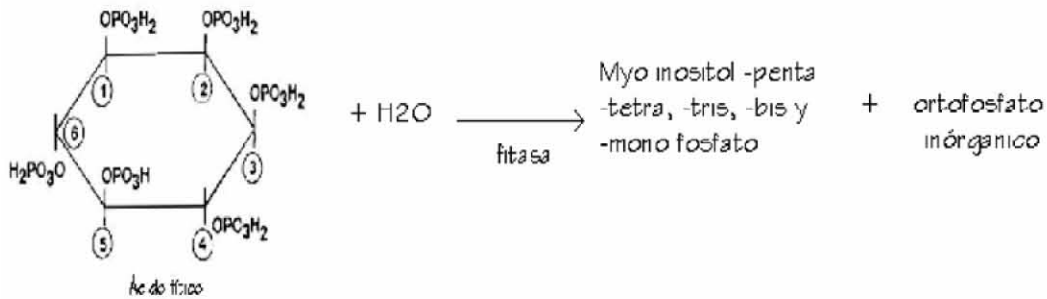


Fig 2.7 Estructura del ácido fítico ( Haefner *et al.*, 2005)

El fitato está compuesto por seis enlaces fosfoéster, estos son hidrolizados por las fitasa liberando iones ortofosfato los cuales son utilizados por las plantas (Figura 2.7). Durante esta hidrólisis se producen compuestos intermedios que incluyen ésteres mono-, bis-, tris-, tetra- y pentafosfatados de inositol ( $\text{IP}_1$ - $\text{IP}_5$ ) (Liu *et al.*, 1998).



**Fig.2.10** Hidrólisis del fitato por la fitasa (Liu *et al.*, 1998).

En general, las fitasas no hidrolizan completamente al ácido fítico; esta enzima se encarga de la hidrólisis de sólo tres de los enlaces fosfoéster que se encuentran en la estructura del fitato (Haefner *et al.*, 2005). Son conocidos dos tipos de fitasas, la 3-fitasa (EC 3.1.3.8) producidas por microorganismos, este tipo de fitasa ataca preferentemente al carbono de la posición 1 y 3 del anillo de inositol y la 6-fitasa (EC 3.1.3.26) producidas por plantas y atacan el carbono 6 del anillo del inositol (Lei y Porres, 2003).

Las fitasas son enzimas distribuidas en plantas, tejidos animales y microorganismos (Greiner *et al.*, 1993). La mayoría de los microorganismos producen fitasas periplásmicas, un ejemplo es la fitasa producida por la bacteria *Escherichia coli*. Greiner *et al.* (1993) purificó dos fitasas periplásmicas de *Escherichia coli*, las cuales tiene un pH óptimo ácido y son enzimas termoestables. Las fitasas de *Escherichia coli* tienen una alta especificidad



por el fitato y están clasificadas como 6-fitasas. Por otro lado, se ha observado que los hongos filamentosos como *Aspergillus niger* produce fitasas extracelulares (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2** Ejemplos de organismos que producen fitasas (Vohra *et al.*, 2003 y Greiner, 2002)

Organismo	Nombre	Localización de la enzima
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	Extracelular
Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	Periplasma
Hongo	<i>Aspergillus niger</i>	Extracelular
Planta	<i>Glycine soja</i>	Extracelular
Planta	<i>Zea mays</i>	Extracelular
Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Extracelular

Las fitasas en plantas se han reportado en semillas y en raíces (Liu *et al.*, 1998). Entre las plantas que producen fitasas se encuentran arroz, maíz, cebada, trigo y algodón (Liu *et al.*, 1998). En el caso de *Arabidopsis thaliana* no existe la producción de fitasas.

Se ha demostrado que muy poca de la actividad de las fitasas es secretada mediante la raíz de la planta (Coello, 2002). La secreción de esta enzima en algunas plantas, está ligada a condiciones deficientes de Pi (Li *et al.*, 1997).

Muchos autores han propuesto soluciones a la deficiencia de fosfato basándose en las estrategias desarrolladas por las plantas, estas soluciones están dirigidas a disminuir los daños producidos por este estrés.

## 2.5 Antecedentes del trabajo.



### Generación de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

El uso de fertilizantes y el alto consumo de semillas de cereales en la alimentación de animales doméstico conlleva una alta concentración de compuestos fosfatados. Al ser el fitato el compuesto de fosfato de mayor concentración dentro de las semillas, y tomando en cuenta que éste no es degradado en el intestino de los animales, las cantidades de fosfato que se desechan contribuyen en gran parte a la contaminación del medio aunado por supuesto al uso de fertilizantes.

Coello *et al.* (2001) propusieron una posible solución a este problema generando semillas de *Arabidopsis thaliana* con un bajo nivel de ácido fítico. En estas semillas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se reduce el contenido de ácido fítico un 60% en comparación con los controles no transfectedos. Este decremento de ácido fítico está acompañado por un incremento de fosfato inorgánico, lo que indica una actividad *in vivo* de la fitasa en estudio.

A pesar de esto, una solución más directa, es la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen y secreten una fitasa de *Escherichia coli*, que les permite crecer y desarrollarse en suelos con alto contenido de ácido fítico. En el laboratorio, se han identificado diferentes líneas independientes de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la fitasa de *Escherichia coli* y la dirigen al medio extracelular a través de un péptido señal (Fragoso 2004) (Figura 2.9), pero la evaluación de la expresión del gen y de la capacidad de las plantas de crecer en diferentes fuentes de fosfato, no se ha estudiado.





**Fig 2.9** Transferencia tipo Southern utilizando el gen de fitasa marcado radiactivamente como sonda. Líneas independientes de plantas transgénicas de Arabidopsis, 10 mg de DNA extraído de plantas transgénicas con la construcción p-Bin19 PS-Fitasa, resistentes a kanamicina se digirieron con *Eco RI* (Fragoso 2004)



### 3.0 Justificación

Los antecedentes de este trabajo ponen de manifiesto que un medio con deficiencia de fósforo es un problema para el buen desarrollo y crecimiento de las plantas. La existencia de suelos con altas concentraciones de compuestos fosforados que se encuentran en formas no asimilables por las plantas, representa una situación de deficiencia de fósforo.

Por esta razón, se han buscado soluciones basándose en las estrategias desarrolladas por las plantas que permitan aminorar los efectos negativos de la escasez del fósforo. *Arabidopsis thaliana*, es un modelo apropiado para este estudio ya que presenta los síntomas clásicos de la deficiencia de fósforo y no contiene una fitasa extracelular.

Basándonos en los antecedentes se plantea la siguiente hipótesis.





## 4.0 Hipótesis:

Si las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresan y secretan una fitasa, entonces su crecimiento y desarrollo será mejor que el de las plantas silvestres, cuando se encuentren en un medio con fitato como única fuente de fosfato.










## 5.0 Objetivos

### 5.1 Objetivos general:

Caracterizar las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen y secreten la fitasa de *Escherichia coli*.

### 5.2 Objetivos particulares:

-  Identificar mediante PCR el gen de la fitasa de *Escherichia coli* en el genoma de las plantas transgénicas.
-  Caracterizar cambios fenotípicos asociados a la expresión del transgen
-  Evaluar la expresión del gen de la fitasa de *Escherichia coli* en diferentes líneas transgénicas mediante una transferencia tipo Northern.
-  Determinar la actividad de fitasa en las diferentes líneas transgénicas
-  Evaluar la capacidad de liberación de Pi en plantas transgénicas crecidas en medios líquidos con ácido fítico
-  Evaluar la capacidad de toma de Pi de las distintas líneas transgénicas al crecer en un medio con ácido fítico como única fuente de fosfato
-  Determinar la capacidad de crecimiento de las plantas en un medio con ácido fítico.



## 6. Materiales y Métodos.

### 6.1 Material biológico

Para seleccionar las transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, las semillas de las plantas transgénicas y control se lavaron con una solución de etanol al 70% (v/v) durante 15 segundos. Posteriormente durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 15% (v/v) y 0.01% (v/v) de Tween 20. Al finalizar se lavaron extensivamente con agua estéril. Las semillas se germinaron en medio B5 con 1% (w/v) de agar y 50  $\mu\text{g}$  /mL de kanamicina. Para romper la latencia, se dejaron a 4°C por una noche y se trasladaron a una cámara de crecimiento a 22°C con un fotoperiodo de 8h de luz por 16h de oscuridad. Después de dos semanas de crecimiento, se transplantaron a tierra sólo aquellas plántulas que crecieron verdes. Las plantas se suplementaron con medio Hoagland (3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.004 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.023 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.0004 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.00015 mM  $\text{CuSO}_4$ , 0.00005 mM  $\text{H}_2\text{MoO}_4$ , 1g /200mL Fe(III) EDTA y 500  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , pH 5.2) cada tres días durante dos semanas. Para la obtención de las semillas, las plantas se cambiaron a una condición de luz constante, por aproximadamente un mes

### 6.2 Extracción de DNA

Se extrajo DNA por medio del método descrito por Dellaporta et al., (1983). Se congeló 1 g de tejido de la planta completa con nitrógeno líquido y se molió en un mortero estéril hasta obtener un



polvo fino. El tejido molido se transfirió a un tubo y se le agregó (100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl y 0.2  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol) y 1 mL de SDS al 20%. La mezcla se incubó a 65°C por 10 minutos, se le agregó 5 mL de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 25000xg durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró a través de una gasa estéril colocada sobre un tubo que contenía 10 ml de alcohol isopropílico, se mezcló y se dejó 30 minutos a -20°C. La mezcla se centrifugó a 20000xg durante 15 minutos, la pastilla se secó y se disolvió en 0.7 mL de Tris 50 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8. Los ácidos nucleicos se incubaron con 1  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL). Durante 30 minutos a 37°C. La proteína se extrajo con 200  $\mu$ L de una solución de PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1). La fase acuosa se precipitó con 1 /10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 0.5 mL de isopropanol durante 30 minutos a -20°C. El DNA se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 0.1 mL de Tris 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.

El DNA se cuantificó mediante espectrofotometría a una  $A_{260}$ , considerando la siguiente relación  $A_{260} = 1 = 50\mu\text{g/mL}$ .

### 6.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA, 0.1 g de raíz se molió en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A esa cantidad de tejido, se le agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen), que es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina, se mezcló en un vórtex durante 5 minutos a temperatura ambiente y se le añadieron 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de TRIzol. La mezcla se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se



centrifugó a 12000xg por 15 minutos a 4°C para separar la fase acuosa de la orgánica. La fase acuosa se precipitó con 0.5 mL de isopropanol , durante 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla se colectó por centrifugación durante 10 minutos a 12000xg y se lavó con etanol al 75%. La pastilla se dejó secar 5 minutos y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPc) (0.1% v/v). El agua con DEPc se preparó agitando toda la noche la mezcla e inactivando el DEPc por esterilización durante 30 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup>.

El RNA se cuantificó mediante espectrofotometría a una  $A_{260}$  considerando la siguiente relación  $A_{260}= 1 = 40 \mu\text{g/mL}$ .

#### **6.4 Transferencia tipo Northern.**

El RNA (30  $\mu$ g ) se resuspendió en 4.8  $\mu$ L de buffer A (3x HEPES /EDTA) y 9.2  $\mu$ L de formaldehído/formamida (9.7% formaldehído, 74% formamida). Las muestras se incubaron a 65°C por 10 minutos y se colocaron en hielo. Se les agregó 3  $\mu$ L de Ficoll 10X como amortiguador de carga (0.25% (w/v) azul de bromofenol, 0.25% (w/v) xilen cianol, 25% (w/v) Ficoll tipo 400) y se separaron electroforéticamente en un gel al 1% de agarosa que contenía 1x HEPES /EDTA (HEPES 0.05M pH 8, EDTA0.001M) y formaldehído 0.062%. Se corrieron a 70V constantes usando como amortiguador de corrida 1x de HEPES/EDTA con 6% de formaldehído.

Al término de la corrida, el gel se lavó de 15-30 minutos con una solución 20X SSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M). Se transfirió a una membrana de Nylon (Hybond- N+, Amersham Pharmacia Biotech) mediante capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989). La integridad del RNA se observó tiñendo los RNA, con NaOAc pH 0.3 M 5.2, 0.03%



de azul de metileno (Wilkinson *et al.*, 1990). El RNA, se fijó a la membrana mediante entrecruzamiento con UV.

### 6.5 Hibridación de las membranas

La membranas con las muestras de RNA se prehibridaron por una hora en un baño con agitación a 65°C en un amortiguador que contenía 0.33 M fosfatos, pH 7.2, 1mM EDTA y 7% SDS. La sonda para la hibridación se marcó radioactivamente con [ $\alpha$  <sup>32</sup> P] dCTP (*Random primer*), utilizando reactivos comerciales de Invitrogen. Se desnaturalizaron 5 $\mu$ L de la sonda, en 20 $\mu$ L de agua estéril. Se le agregó 1 $\mu$ L de 500  $\mu$ M dATP, 1 $\mu$ L de 500  $\mu$ M dTTP, 1 $\mu$ L de 500  $\mu$ M dGTP, 20 $\mu$ L de amortiguador Rad Prime (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, MgCl<sub>2</sub> 12.5 mM, 2-mercaptoetanol 25 mM, oligodeoxirribonucleótidos: random octamers 150  $\mu$ g/ $\mu$ L) y 50 $\mu$ Ci de [ $\alpha$  <sup>32</sup> P] dCTP (10 mCi /mL) y se añadió 1  $\mu$ L del fragmento Klenow de la DNA pol I (40 U/ $\mu$ L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 100 mM, DTT 1mM glicerol 50% (v/v)). La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se purificó la sonda marcada de los nucleótidos no incorporados a través de una columna de Sephadex G-10. La mezcla de la reacción se cargó en la columna y se centrifugó por 5 minutos a 23000xg. La sonda purificada se desnaturalizó en agua en ebullición por 5 minutos, y se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos adicionales. La sonda se agregó a la bolsa que contenía el amortiguador de pre-hibridación, en un baño de agua a 65°C, con agitación constante toda la noche. Los lavados se realizaron con 2x SSC y 0.2% SDS durante 15 minutos a temperatura ambiente y a 65°C y un lavado de 15 minutos a 65°C con 0.2x SSC y SDS 0.2%. La



membrana se expuso a una película de rayos X Kodak (X-Max) con pantallas intensificadoras a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con  $2\ \mu\text{g}$  de DNA, los cuales se mezclaron con  $5\ \mu\text{L}$  de Buffer para PCR (10X),  $1\ \mu\text{L}$  de dNTP's (10 mM) y  $1.5\ \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM). A las muestras se les agregaron  $1\ \mu\text{L}$  de cada uno de los primers específicos ( $10\ \mu\text{M}$ ) diseñados a partir de la secuencia de fitasa reportada por Dassa *et al.*, (1990).

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

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

Finalmente se agregaron  $0.5\ \mu\text{L}$  de TAQ polimerasa ( $5\text{u}/\mu\text{L}$ ) (Invitrogen) en  $50\ \mu\text{L}$  de volumen de reacción. Se dejó 30 ciclos cada uno de 30 segundos de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$ , un minuto de alineamiento a  $62^{\circ}\text{C}$ . y una extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  por minutos. El producto de reacción de PCR se separó en un gel al 1% (w/v) de agarosa con bromuro de etidio ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) usando el fago  $\lambda$  digerido con Hind III (Invitrogen), como marcador de peso molecular. El gel se corrió a 70V.

### **6.7 Actividad de fitasa y fosfatasa ácidas**

Obtención de exudados.



Se colocaron las plantas en 1 mL de agua desionizada para permitir la exudación de las raíces durante tres horas. Esta solución se liofilizó y se mantuvo congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### Cuantificación de proteína.

Para la cuantificación de proteínas se siguió el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de exudados y se adicionó 1 mL de solución Bradford, se dejó reaccionar durante 10 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una  $\lambda=595$  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 amortiguador de acetatos (Acetato de sodio 100 mM pH 4.8,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EDTA 1 mM y glicerol al 10%) con 20  $\mu\text{L}$  de exudados en un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al término de este tiempo, se añadió 1 mL de NaOH 1 M, para estabilizar la reacción y cuantificar el p-nitrofenol formado, el cual es colorido pudiéndose detectar a  $\lambda=410$ nm. Para calcular la cantidad de Pi liberado, se utilizó el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol que es de  $20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Con la cantidad de proteína y la de Pi liberado, se calculó la actividad específica reportada como  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberado por minuto por mg de proteína.

#### Actividad de Fitasa.

Se incubaron 20  $\mu\text{L}$  de exudados con una solución 1 mM de ácido fítico en un amortiguador de acetatos (acetato de sodio 100





mM pH 2, de  $MgCl_2$  3 mM, EDTA 1 mM y glicerol al 10%) en un volumen final de 300  $\mu$ L durante 10 minutos, a 37°C. Para detener la reacción, se agregaron 700  $\mu$ L del reactivo ascórbico-molibdato (ácido ascórbico al 10% y molibdato de amonio al 0.42% en ácido sulfúrico 5N, en una relación 1:6). La cuantificación del Pi liberado se realizó por el método de Ames (1966), incubando la mezcla durante 20 minutos a 45°C y cuantificando a una  $\lambda = 820$  nm para determinar la cantidad de Pi. La curva patrón se construyó utilizando concentraciones conocidas de fosfato de potasio.

### **6.8 Hidrólisis del ácido fítico.**

Se colocaron las plantas en 7 mL de una solución 50  $\mu$ M de ácido fítico a pH 2. Las plantas permanecieron 24 horas con agitación constante permitiendo la exudación de las raíces y el Pi liberado se cuantificó tomando una alícuota de la solución cada tres horas. La cuantificación del Pi liberado, se realizó por el método de Ames (1966), como se describió anteriormente.

### **6.9 Contenido de Pi en raíces.**

El ensayo estaba compuesto por dos lotes de plantas que habían crecido en deficiencia de Pi durante 15 días. Un lote se colocó en 7 mL de 50  $\mu$ M de ácido fítico pH 2 y otro lote como control en agua a pH 2. Las plantas se mantuvieron por 18 horas con agitación constante y se cuantificó el Pi presente en las raíces de



esas plantas al término de este tiempo. Para la obtención del extracto, 0.01 g de raíz se molió en nitrógeno líquido, se agregaron 2 mL de agua y se calentaron a ebullición durante 5 minutos dejando enfriar hasta 72°C manteniendo esta temperatura toda la noche. Las muestras se liofilizaron y se resuspendieron en 400 µL de agua estéril.

La cuantificación del Pi liberado se realizó por el método de Ames (1966), descrito anteriormente.

### **6.10 Comparación fenotípica**

Se esterilizaron y sembraron semillas de todas las líneas transgénicas (Fi 1, Fi 2, Fi 4, Fi 7 y Fi 8) y controles (Co 1 y Columbia) en las condiciones descritas anteriormente y se transplantaron a tierra tres plantas de cada línea. Las plantas se crecieron en tierra durante 60 días en cámaras de crecimiento utilizando solución Hoagland como fuentes de nutrimentos. Las plantas se compararon morfológicamente después de este tiempo.

### **6.11 Crecimiento en un medio con ácido fítico como única fuente de fosfato**

Se esterilizaron y sembraron semillas de las plantas transgénicas (Fi4 y Fi7) y control (Co1) en las condiciones descritas anteriormente, y se transplantaron a cajas petri con medio Hoagland con suficiencia de fosfato (  $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$  500 µM), con medio Hoagland con deficiencia de fosfato (  $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$  500 µM) y en un medio adicionado con ácido fítico 50 µM a pH 5.2. Las plantas se mantuvieron creciendo en estas cajas hasta que



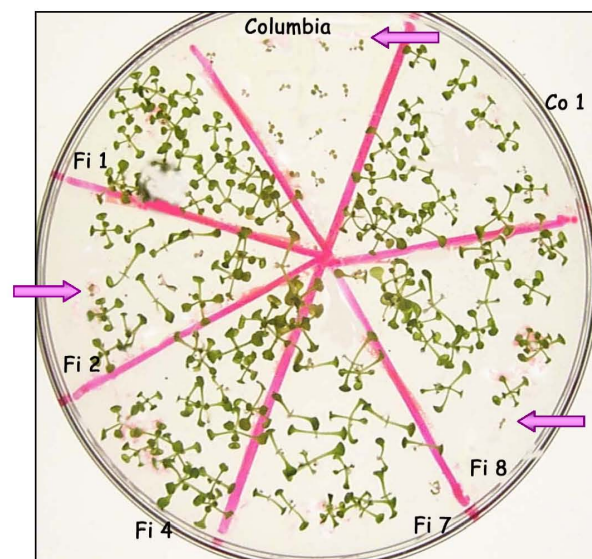
las de deficiencia de fosfato mostraban síntomas característicos de la falta de Pi. Al final del tratamiento se registró el peso seco de cada planta.



## 7. Resultados:

### 7.1 Selección de plantas transgénicas.

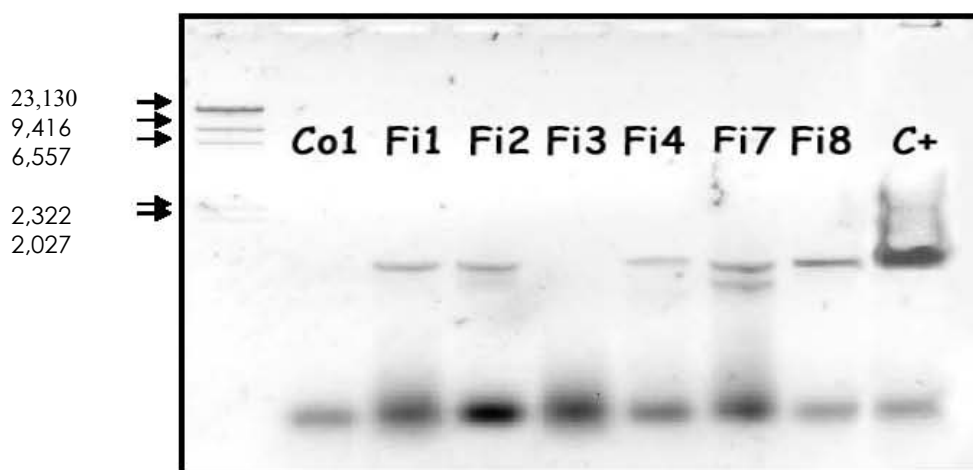
Para la obtención de semillas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan y excretan fitasa, se recuperaron las plantas que germinaron en presencia de kanamicina (Figura 7.1). Estas plantas de *Arabidopsis* se transplantaron a suelo para obtener semillas. Después de 3-5 ciclos de autopolinización, se consiguieron generaciones filiales con un alto porcentaje de plantas resistentes a la kanamicina. Los porcentajes obtenidos de las líneas transgénicas resistentes a la kanamicina fueron 95 % de Fi 1, 67 % de Fi 2, 99 % de Fi 4, 75 % de Fi7, 56 % de Fi 8 y 80 % del control Co1.



**Figura 7.1** Transformantes de *Arabidopsis thaliana* resistentes a kanamicina, las flechas indican plantas susceptibles al antibiótico



Para confirmar que las plantas seleccionadas en kanamicina, fueran plantas transgénicas, se realizó un PCR con DNA de cada línea utilizando oligonucleotidos específicos para la fitasa, que confirmaría la presencia del gen ( Figura 7.2)



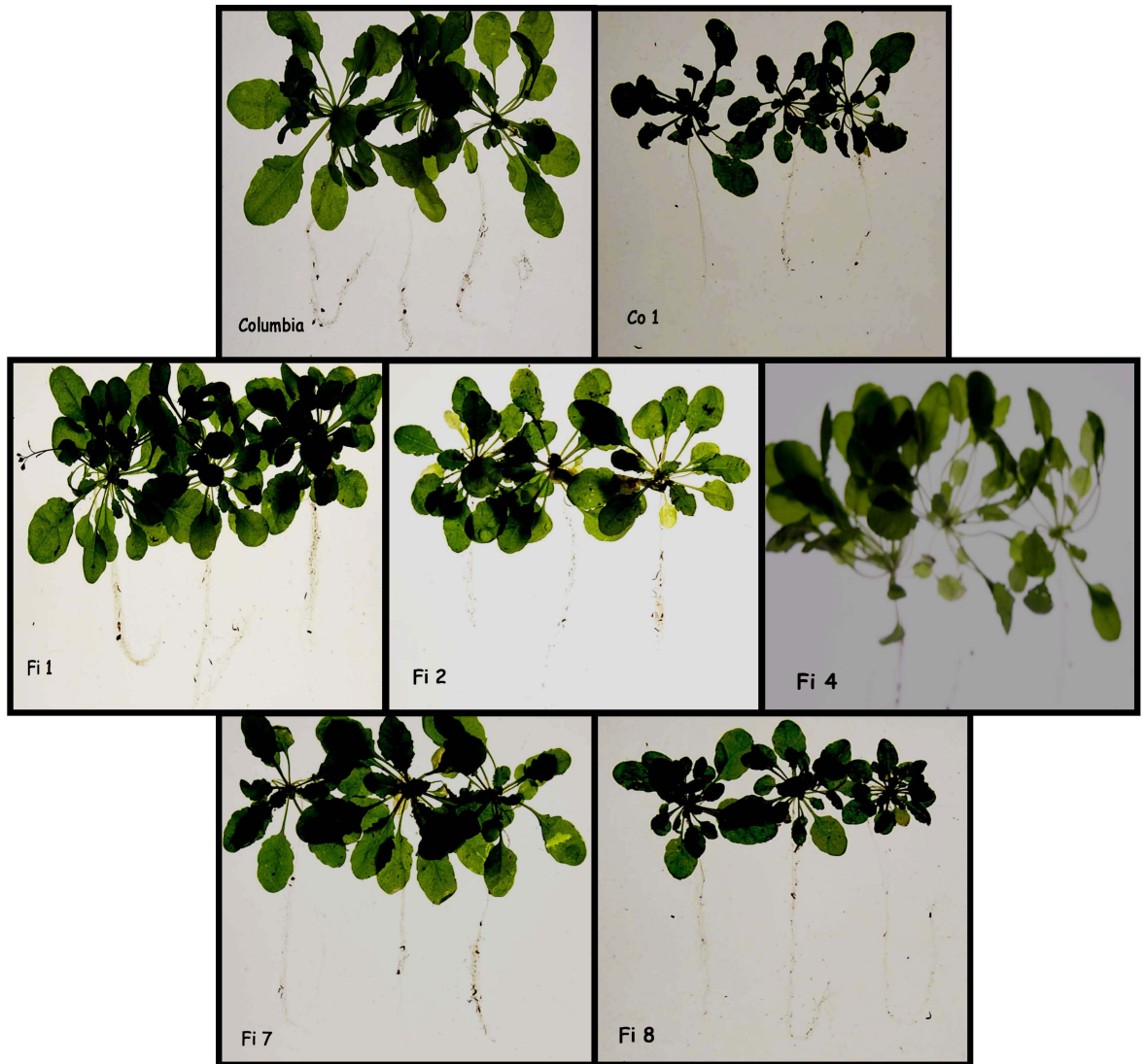
**Figura 7.2.**Amplificación por PCR del gen de la fitasa en las diferentes líneas transgénicas

En la separación electroforética de la reacción de PCR, se puede observar que las líneas transgénicas que tiene el gen de la fitasa, con un tamaño ~1kb, son Fi1, Fi2, Fi4, Fi7 y Fi8, mientras que Fi3 no presenta la banda que corresponde a la fitasa lo que indica que esta línea no es transgénica. Co1, el cual es un control con solo el vector de transformación, no amplifica ninguna banda; mientras que el control positivo proveniente de un plásmido, sí tiene un fragmento del mismo tamaño ( Fig. 7.2).

Para conocer si existen algunas características fenotípicas asociadas con la expresión del transgen, plantas transformantes y



controles se cultivaron durante 1 mes en condiciones normales en tierra.



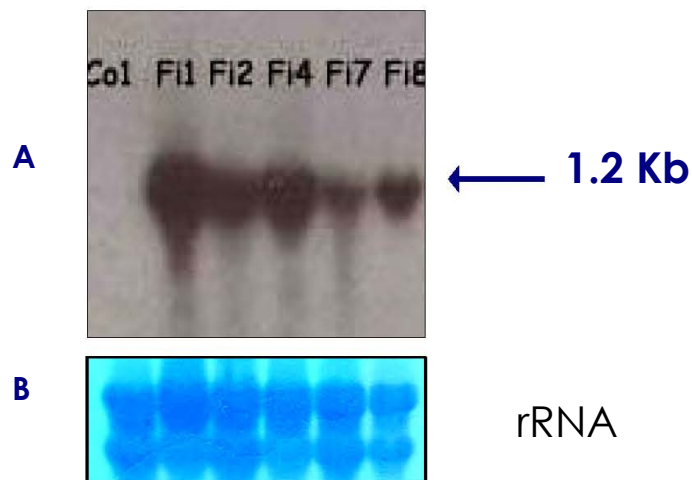
**Figura.7.3** Observaciones morfológicas entre las líneas transgénicas y controles cultivadas en condiciones óptimas

Con estas observaciones (Figura 7.3), podemos decir que las inserciones del gen de la fitasa dentro del DNA en las plantas de las líneas transgénicas y control no afecta su desarrollo en condiciones óptimas de crecimiento.



## 7.2 Caracterización de plantas transgénicas.

Mediante una transferencia tipo Northern, se observó una expresión diferencial del gen de la fitasa en las diferentes líneas transgénicas ( Figura 7.4 A ). El tamaño del mensaje es ~1.2kb por la presencia del péptido señal que tiene un tamaño ~200pb ( Fragoso, 2004 ). Ya que el cargado, representado por los RNAr, fue muy similar (Figura 7.4 B) algunas líneas parecerían mostrar un nivel de expresión más alto como es el caso de Fi1 y Fi4. La línea Fi7 y Fi8 mostraron una expresión menor que todas las demás líneas.

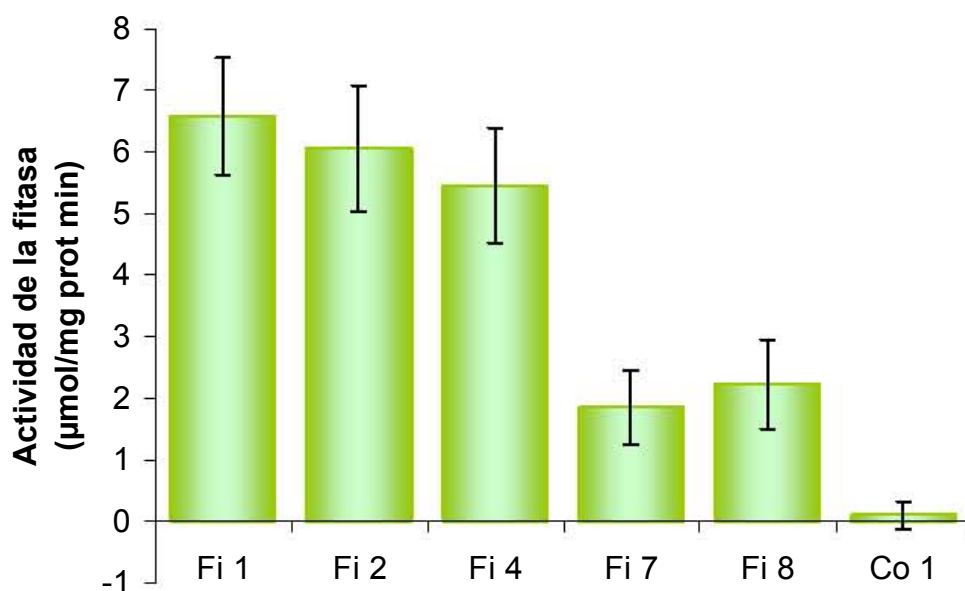


**Figura 7.4 (A)** Expresión diferencial del gen de la fitasa en raíces de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*  
**(B)** Control de carga del RNA

Para complementar al análisis del gen de la fitasa, se evaluó la actividad de esta enzima en los exudados de las líneas transgénicas. Los resultados mostraron que existe una correlación



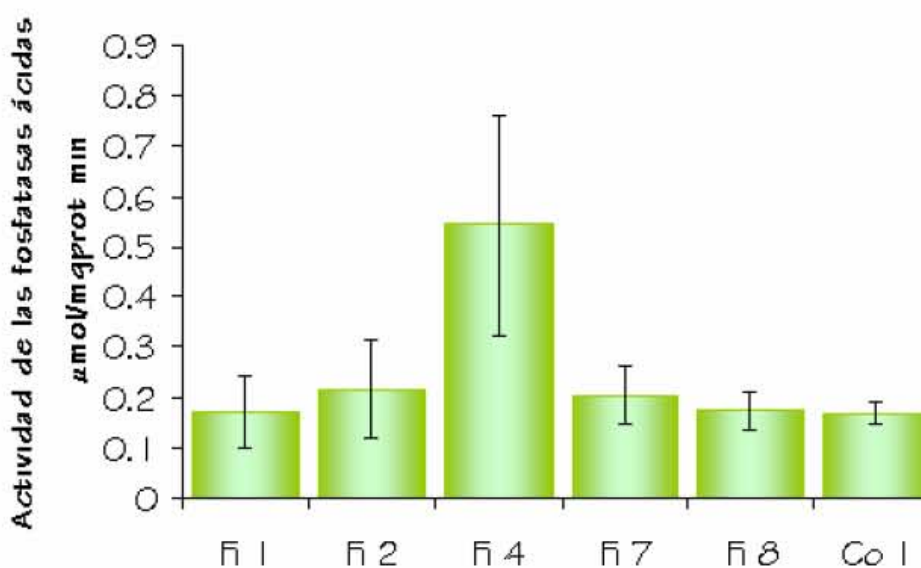
entre la cantidad de mensaje y la actividad de la enzima. Las líneas Fi1, Fi2 y Fi4 tienen una actividad de entre 7 y 8 veces por arriba del control, mientras que Fi7 y Fi8, presentan una actividad específica elevada de esta enzima con respecto al control pero que no alcanza los valores de las otras líneas ( Figura 7.5 ). De acuerdo a la gráfica, la actividad en Fi 1, Fi 2 y Fi 4 se incrementa de 7 a 10 veces más que el control mientras que el aumento presentado por Fi 7 y Fi 8 es de solo 3 veces.



**Figura 7.5.** Actividad específica de la fitasa (Ae) en exudados de raíz de plantas

Para evaluar si la actividad de fitasa era una respuesta específica debido al gen introducido, se determinó la actividad de fosfatasa ácida de todas las líneas transgénicas, con respecto al control. Con excepción de Fi 4, que es ligeramente superior, el nivel de actividad de fosfatasa es el mismo en todas las líneas incluyendo el control (Figura 7.6).





**Figura 7.6** Actividad específica de Fosfatasas ácidas (Ae) en exudados de raíz de plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

### 7.3 Estabilidad del ácido fítico en el medio.

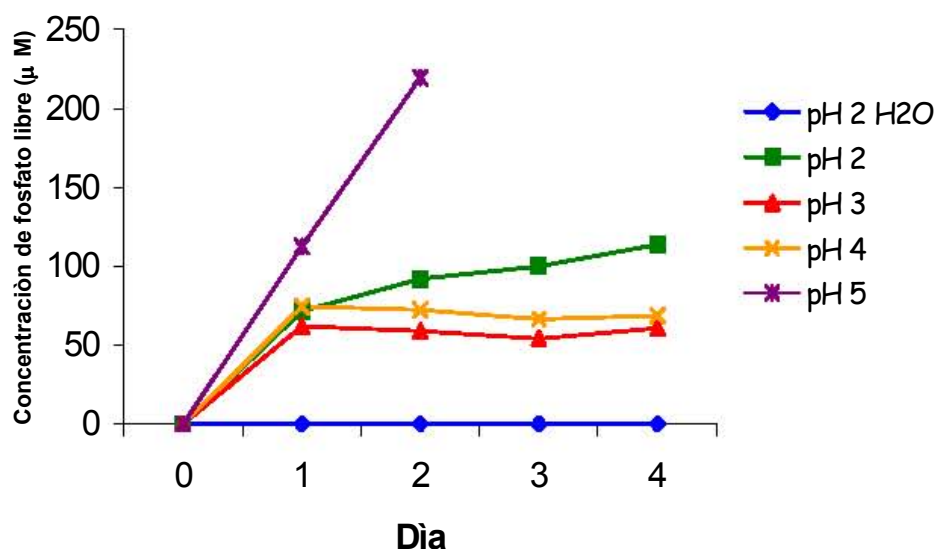
Hasta el momento se sabe que la fitasa expresada en *Arabidopsis* tiene actividad hidrolizando al ácido fítico en condiciones *in vitro*; sin embargo, fue necesario saber si esta fitasa tenía actividad *in vivo*.

Se evaluaron varios parámetros para conocer en qué condiciones se degradaba el ácido fítico, uno de estos parámetros



fue determinar la estabilidad del ácido fítico a diferentes pH. Una concentración inicial de  $50\mu\text{M}$  de ácido fítico disuelto en agua y en solución Hoagland sin fosfato se incubó a diferentes pH y se determinó su hidrólisis a través de la cuantificación del fosfato libre durante diferentes tiempos.

El ácido fítico se empezó a degradar a los diferentes pH's desde el primer día, siendo la solución a pH 5 la menos estable. Las soluciones a pH 2, 3 y 4 presentan degradación constante ligeramente menor aunque a los tres días alcanzan valores hasta  $100\mu\text{M}$  a un pH de 2. La solución de ácido fítico disuelto en agua a un pH de 2 resultó ser la más estable (Figura 7.7).

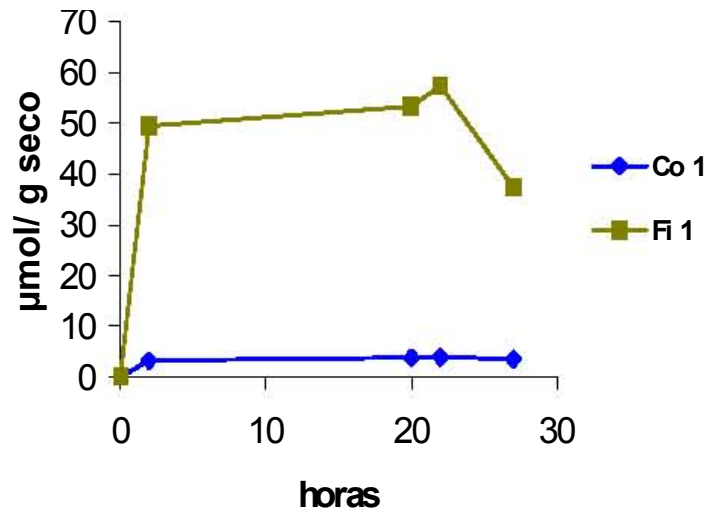


**Figura 7.7** Comportamiento del ácido fítico a diferentes pH con una concentración de ácido fítico de  $50\mu\text{M}$

Para probar estas condiciones en un estudio *in vivo*, con una línea transgénica (Fi 1) y la planta control (Co 1), se colocaron las plantas en el medio y se cuantificó el fosfato libre a diferentes horas. La Figura 7.8 muestra la cantidad de fosfato liberado por la



actividad de la fitasa que secretan las plantas. La cantidad de fosfato liberado en las plantas transgénicas es muy superior a la del control. Esto nos indica que la enzima secretada por las plantas, presenta actividad en las condiciones establecidas, mientras que en el control no existe actividad de fitasa



**Figura 7.8** Hidrólisis del ácido fólico mediante la enzima secretada por plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* a pH 2, con una concentración de ácido fólico de 50 µM disuelto en agua durante 24 horas.

Una vez establecido que la fitasa era capaz de hidrolizar el ácido fólico en el medio, las plantas fueron cultivadas en estas condiciones (medio hidropónico) por varios días. Los resultados indicaron que las condiciones hidropónicas no eran adecuadas, ya que aún las que crecían en un medio de fosfato no se desarrollaban de manera adecuada y morían. Debido a esto se eligió un medio sólido para probar la capacidad de las plantas de crecer en un medio con ácido fólico a una concentración de 50 µM. La tabla 7.1 muestra que en los medios existe una concentración baja de fosfato al inicio y con esto se comprueba que no existe degradación de ácido fólico en el medio antes de que las plantas estén en tratamiento.

**Tabla 7.1** Concentración de fosfato libre en los diferentes medios.

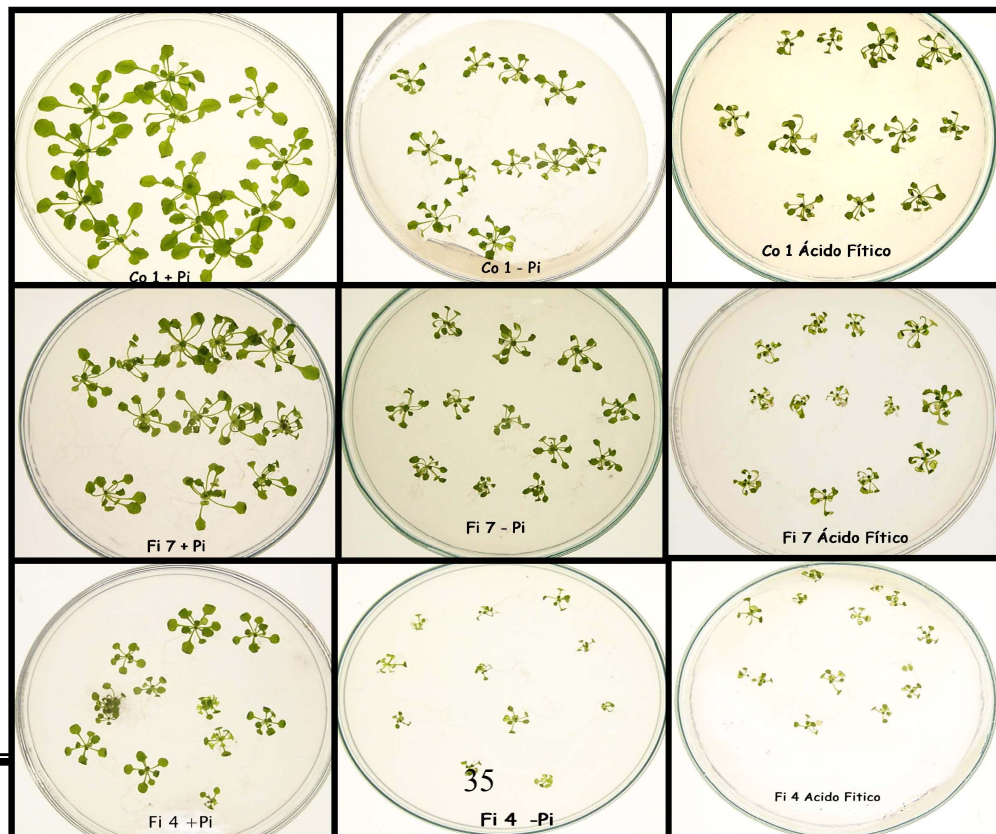
+ PI	- PI	ÁCIDO
------	------	-------



FÍTICO		
0.0298 $\mu\text{mol}$	0.0012 $\mu\text{mol}$	0.0003 $\mu\text{mol}$

### 7.4 Crecimiento de las plantas transgénicas en los diferentes medios.

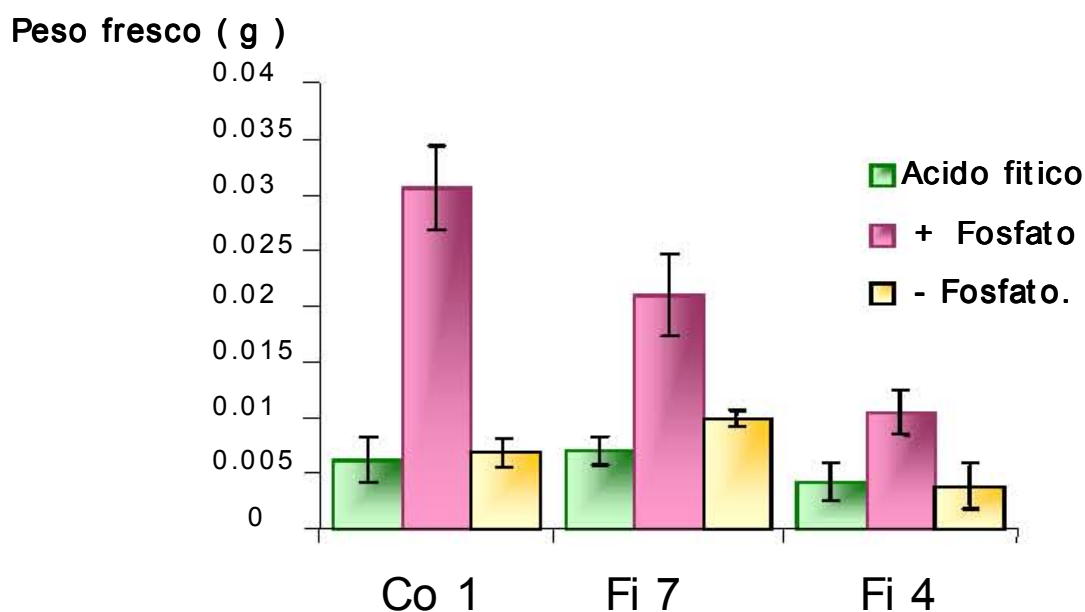
Debido a que los medios hidropónicos no dieron resultados adecuados para el crecimiento de las plantas, se utilizaron medios sólidos para evaluar su crecimiento. Se cultivaron las siguientes líneas transgénicas durante dos semanas en medio completo; Fi4 que es una línea transgénica que presenta una alta actividad de fitasa, Fi7 que presenta una baja actividad de fitasa y la planta control sin el gen de la fitasa Co 1 como control. Al término de este tiempo las plantas se sometieron a tres tratamientos: con fosfato (+Pi), ácido fítico y sin fosfato (-Pi) durante tres semanas. Al terminar este tiempo se comparó el crecimiento de las plantas en los diferentes medios ( Figura 7.9).





**Figura 7.9.** Plantas cultivadas en medio sólido con suficiencia de fosfato(+Pi), deficiencia de fosfato (-Pi) y con ácido fítico.

El desarrollo y crecimiento de las tres líneas en el medio con suficiencia de fosfato es uniforme en cuanto al color y tamaño de roseta. Las tres presentaron una roseta mayor en este tratamiento en comparación con los otros dos. En Co 1 las plantas con deficiencia de fosfato y con ácido fítico presentaron un mismo tamaño lo que implica que no están adquiriendo el fosfato liberado. Al igual que Co 1, Fi 4 y Fi 7 no tienen diferencias entre estos tratamientos. El peso fresco de cada tratamiento corroboró las observaciones de crecimiento (Figura 7.10)



**Figura 7.10** Peso fresco de plantas de *Arabidopsis* sometidas a los distintos tratamientos.

### 7.5 Hidrólisis del ácido fítico *in vivo*.

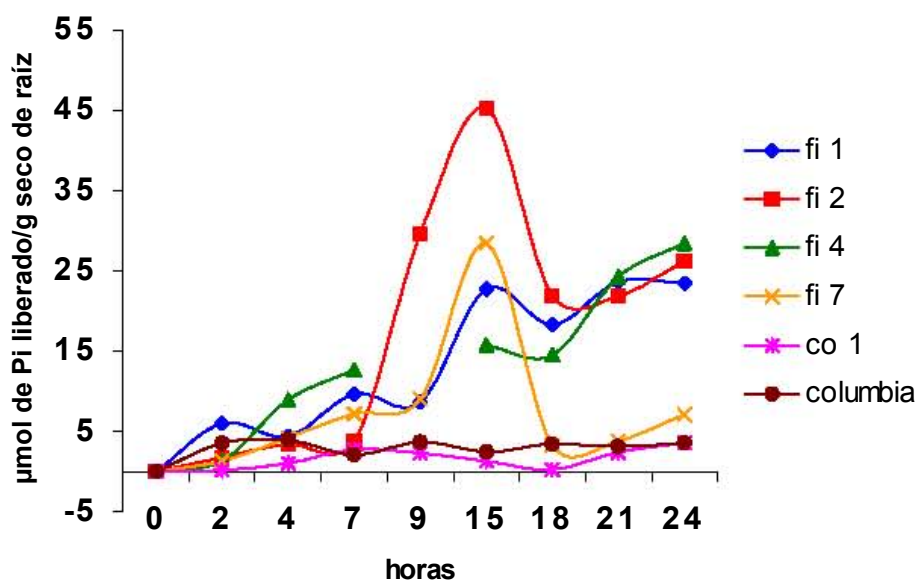
Hasta el momento se sabe que las plantas transgénicas secretan fitasa y que esta tiene actividad cuando está presente en el medio con un sustrato, sin embargo cuando las plantas se



someten a un tratamiento en un medio con fitato como única fuente de fosfato, éstas no presentan beneficio de la actividad de la fitasa secretada.

Por esta razón se realizó un ensayo en el cuál se monitoreo durante todo un día la cantidad de fosfato liberado en el medio por la acción de la fitasa. El experimento se realizó con todas las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que previamente presentaron actividad de fitasa *in vitro* en las condiciones establecidas en el punto 7.5.

El ensayo mostró un incremento en la cantidad de fosfato liberado por la actividad de la enzima secretada desde las dos horas, hasta alcanzar su punto máximo a las 15 horas; de este punto en adelante las líneas se comportan diferentes entre sí, Fi2 y Fi7 decremantan la cantidad de fosfato, mientras que Fi4 y Fi1 mantienen la cantidad de fosfato libre e incluso después de un



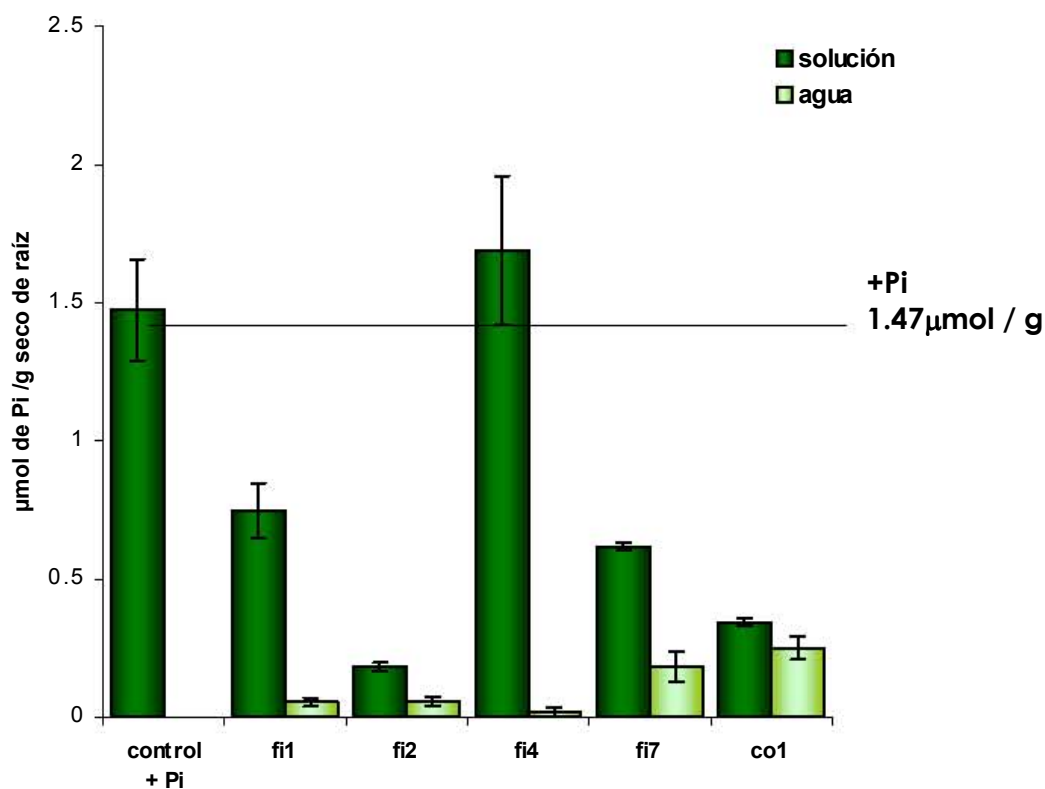
tiempo esta cantidad de fosfato libre empieza a incrementar de nuevo (Figura 7.11)



**Figura 7.11** Hidrólisis del ácido fítico *in vivo* por la fitasa secretada en las diferentes líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

El comportamiento de Fi1 y Fi4 se justifica por los niveles de actividad de la fitasa, estas dos líneas son las que presentan más actividad y por lo tanto liberan más fosfato, manteniendo alta su concentración en el medio.

Las 18 horas es el tiempo en que disminuye la cantidad de fosfato libre en Fi2 y Fi7; mientras que en Fi1 y Fi4 la cantidad se mantiene constante; este punto podría representar la adquisición de fosfato libre en el medio por las raíces de las plantas. Para corroborar esta aseveración se realizó un ensayo para la cuantificación de contenido de fosfato en raíces de las diferentes líneas transgénicas y control de *Arabidopsis thaliana* sometidas a deficiencia de fosfato durante 1 semana.







**Figura 7.12.** Contenido de fósforo en raíces de plantas transgénicas y control de *Arabidopsis thaliana* en deficiencia de Pi expuestas por una semana a una solución de ácido fítico ( $50\mu\text{M}$  y pH 2 ) durante 18 horas con agitación constante.

En la Figura 7.12, observamos que las raíces de las plantas expuestas a la solución con ácido fítico tienen una concentración mayor de fósforo en comparación con las que estuvieron en agua; esto significa que las plantas están adquiriendo el fósforo libre del medio. Las líneas con mas alto contenido de fósforo en la raíz son Fi 1 y Fi 4 ya que, comparadas con su control en agua, presentan un mayor incremento en el contenido de fósforo. Comparando las líneas con el control que estuvo en suficiencia de fósforo, los resultados muestran que la línea Fi 4 alcanza niveles de Pi similares, mientras que Fi 1, Fi 2 y Fi 7 tienen una cantidad muy inferior.



## 8. Discusión de Resultados.

Las plantas en condiciones de deficiencia de fosfato han desarrollado estrategias que tienen como finalidad incrementar la disponibilidad y absorción de este macronutriente ( Raghutama, 1999; Vance, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue analizar el crecimiento y desarrollo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que secretan una fitasa de *Escherichia coli*. Esta fitasa presenta alta especificidad por el ácido fítico (Dassa *et al.* 1990) y se ha demostrado que se expresa en forma activa al ser introducida en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Coello *et al.*, 2001)

Del grupo de plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*, se escogieron líneas independientes y autopolinizaron durante varias generaciones hasta alcanzar generaciones filiales con un alto porcentaje de plantas resistentes a la kanamicina (Figura 7.1). Después del proceso de selección, se corroboró la obtención de plantas transformantes mediante un PCR realizado directamente sobre DNA genómico.

Al hacer un análisis del crecimiento de las plantas transgénicas en condiciones óptimas, no se encontraron características fenotípicas asociadas a la inserción del DNA exógeno, lo que sugiere que la transformación no afectó ninguna función esencial dentro de las plantas



Los resultados de expresión de la transferencia tipo Northern mostraron diferencias sustanciales entre las líneas transgénicas (Figura 7.4). Estos resultados concuerdan con la actividad de la fitasa en exudados de las plantas transgénicas, en donde las plantas de mayor actividad (Fi 1, Fi 2 y Fi 4) son además las de mayor expresión. La mayor expresión del gen de la fitasa en algunas líneas transgénicas puede ser el reflejo del número de T-DNAs insertados durante la transformación. Se ha observado que durante la transformación de las plantas con *Agrobacterium*, existen varios eventos de inserción de T-DNA ( Clough, 1998 ).

Las plantas crecen en diferentes condiciones y en suelos con características diferentes en cuanto a su composición nutrimental (Hammond *et.al.*, 2004) Se ha manejado, que una solución nutritiva de Hoagland a pH 5, suplementada con ácido fítico, es la solución que se utiliza para evaluar si esta molécula fosfatada puede servir como fuente de fosfato (Richardson *et al* 2001; Zimmermann *et al.*,2003; Xiao *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo, indicaron que bajo esas condiciones, el ácido fítico es muy inestable y se hidroliza liberando fosfato inorgánico. Se encontró que las condiciones experimentales adecuadas para evitar la degradación del ácido fítico, son solubilizarlo en agua a un pH de 2.



Utilizando estas condiciones para crecer plantas transgénicas en un sistema hidropónico, no se logró un crecimiento constante de las plantas. Sin embargo, utilizando un medio sólido, las plantas crecían de manera adecuada, aunque los resultados indicaban que no existía diferencia entre las plantas creciendo en deficiencia de fosfato y aquellas que crecían en

ácido fítico. Estudios anteriores, han demostrado que plantas transgénicas que sobrepresan fitasas de diferentes fuentes, incrementan su capacidad para tomar Pi del fitato (Richardson *et al* 2001; Zimmermann *et al.*, 2003; Yip *et al.*, 2003); sin embargo, en ninguno de esos trabajos se demostró que el ácido fítico fuera estable, y que el fosfato liberado proviniera de la hidrólisis enzimática de esta molécula.

Los resultados demostraron que la enzima secretada por las plantas, hidroliza el ácido fítico y que el Pi liberado es asimilado por la raíz, en el caso de una de las líneas transgénicas (Fi 4), en valores muy semejantes a los de plantas crecidas en suficiencia de Pi. Zimmerman *et al.*, 2003 mostró la secreción de una fitasa sintética en los pelos radicales de plantas transgénicas de papa, utilizando el promotor LeExt 1.1 de tomate que es específico de ese órgano. Los resultados obtenidos en ese trabajo, demostraron que no existía diferencia entre el control y las plantas transgénicas en su desarrollo en condiciones de suficiencia y deficiencia de fosfato; sin embargo, en el medio con el ácido fítico, las plantas transgénicas incrementan biomasa en un 30 % comparado con el control.



---

Los resultados obtenidos por Zimmerman *et al.*, 2003, contrastan con los presentados en este trabajo, sugiriendo que en nuestro caso, la sobreexpresión de la fitasa dirigida por un promotor constitutivo fuerte, representa un costo metabólico muy elevado y que el fosfato que liberan no es suficiente para compensar la energía gastada en la sobreexpresión y secreción de la fitasa. Si este fuera el caso, la generación de plantas que expresen a la fitasa bajo el control de un promotor inducible, podría ser la solución.



## 9. Conclusiones



Las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* no presentan características fenotípicas asociadas a la inserción del gen de la fitasa.



Las plantas transgénicas que secretan la fitasa, presentan un aumento en la actividad de la enzima.



El ácido fítico es estable en agua, como medio de solución a pH 2



La fitasa secretada por las plantas transgénicas hidroliza el ácido fítico del medio y parte de este Pi es asimilado por la raíz



No existe diferencia entre el crecimiento de plantas transgénicas que secretan fitasa bajo la regulación de un promotor constitutivo, cuando están en un medio sin Pi ó un medio con ácido fítico



## 10. Referencias

- Ames B N 1966. **Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases.** Methods Enzymol 8: 115-118
- Anderson G 1980. **Assessing organic phosphorus in soils.** In : **The role of Phosphorus in Agriculture.** Madison, USA: American Society of Agronomy. 411-432
- Bates T R, Lynch J P 1996. **Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability.** Plant Cell Env 19: 529-538
- Bates T R, Lynch J P 2000. **The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) root hairs in phosphorus acquisition.** Am J Bot 87 (7): 964-970
- Bio-Green Agritech 2003. **Biodisponibilidad de los nutrimentos.** <http://www.biogreen.com.sg/ph.htm>.
- Bradford M M 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem 72: 248-254
- Brinch-Pedersen H, Sorensen L D, Holm P B. 2002. **Engineering crop plants: getting a handle on phosphate.** Plant Sci. 7 (3): 118-125
- Bucher M 2001 **Molecular root bioengineering.** Plants Roots the Hidden Half, Vol 3. New York. 279-294
- Clough S J., Bent A F 1998. **Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediates transformation of *Arabidopsis thaliana*.** Plant J. 16: 735-743



- Coello P. 2002. **Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*.** *Physiol. Plantarum* 116: 293-298
- Coello P, Maughan J P, Mendoza A, Philip R, Bollinger D W, Deum T L, Vodkin L O, Polacco J 2001. **Generation of low phytic acid *Arabidopsis* seeds expressing an *E. coli* phytase during embryo development.** *Seed Sci Res.* 11 : 285-291
- Dassa E, Cahu M, Dejavoix –Cherel B, Boquet P L. 1990. **The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*.** *The J Biol. Chem.* Vol. 257 (12): 6669-6676
- Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. 1983. **Isolation of DNA from higher plants.** *PMB Reporter* 4; 19-21
- Duff S M G, Sarath G, Plaxton W C 1994. **The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism.** *Physiol Plantarum* 90: 781-800
- Epstein E 1972. **Mineral Nutrition of Plants: principles and perspectives.** New York, Wiley
- Fragoso S 2004. **Respuesta de soya a la deficiencia de fosfato y sobreexpresión de fitasa en plantas transgénicas.** Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México
- Grenier R, Konietzny U, Joni K I 1993. **Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*.** *Arch. Bioch. Biophys.* 303: 107-113
- Grenier R. y Konietzny U. 2002. **Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases).** *Int J Food Techno* 37. 791-812





- Haefner S, Knietzsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O 2005. **Biotechnological production and applications of phytases**. Appl Microbiol Biotech. 68: 588-597
- Hammond J P, Broadley M R, White PJ 2004. **Genetic Response to phosphorus deficiency**. Annals of Botany 94: 323-332
- Harrison A F 1987 **Soil Organic Phosphorus**. A Review of world Literature. Wallingford, UK
- Lei G L, Porres J M 2003. **Phytase enzymology, applications and biotechnology**. Biotech Letters 25: 1787-1794
- Li M, Osaki M, Toshiaki T 1997. **Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions**. Plant and Soil. 195: 161-169
- Liu B, Amjad R, Tzeng Y, Abdul R 1998. **The induction and characterization of phytase and beyond**. Enzyme and Microbial technology. 22: 415-424
- Lynch J P, Brown K M 2001. **Topsoil foraging on architectural adaptation of plants to low phosphorus availability**. Plant and Soil. 237: 225-237
- Mathews C 2001 **Bioquímica**. Ed Mc Graw-Hill. 2a edit, Madrid. 617
- Marschner H 1995. **Mineral nutrition in higher plants**. 2a edit. Academic Press. Londres. 3-5
- Morales J 2005 **Sintomas de la carencia nutrimental en plantas**. <http://www.infojardin.com/carencias-nutrientes-minerales.htm>



- Muchhal U S, K G Raghothama 1999. **Transcriptional regulation of plant phosphate transporters**. Proc Natl Acad Sci USA 96: 5868-5872
- Nagashima T, Tange T, y Anazawa H. 1999. **Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus Niger* phytase with a high affinity for phytate**. Applied and Env. Microbiol. 65 (10): 4682-4684
- Poirier Y, y Bucher M. 2002. **Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis***. American Society of Plant Biologists.
- Plaxton W C. 2004. **Plant response to stress: biochemical Adaptations to phosphate Deficiency**. Encyclopedia of plant and Crop Science. 476-480
- Raghothama KG. 1999. **Phosphate Acquisition**. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 50: 665-693
- Raush C, y Bucher M. 2002. **Molecular mechanism of phosphate transport in plant**. Planta. 216: 23-37
- Richardson A E, Hadobas P, Hayes J E 2001. **Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate**. Plant J. 25 (6) : 1-10
- Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2a edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY. USA. Tomo 2. pp. 7. 49
- Shin H, Shin H, Dewbre G R, Harrison M J 2004. **Phosphate transport in *Arabidopsis* Pht 1;1 and Pht 1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high- phosphate environments**. Plant J. 39: 629-642



- Smith F W, Ealing P M, Dong B, Delhaize E. 1997. **The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family.** Plant J. 11, 83-92
- Smith F W 2002. **The phosphate uptake mechanism.** Plant and Soil 245: 105-114
- Smith F W, Mudge S R, Rae A L, Glassop D 2003. **Phosphate transporter in plants.** Plant and Soil. 298: 71-83
- Tarafdar JC 2001 **Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources.** J Plant Nutr Soil Sci 164: 279-282
- Vance C P. 2001. **Symbiotic Nitrogen fixation and phosphorus Acquisition.** Plant Nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiol 127: 390-397
- Vance C P, Uhde-Stone C, Allan DL. 2003 **Phosphorus acquisition and use: critica adaptations by plants for securing a nonrenewable resource.** New Phytol 157: 423-427
- Vohra A, y Satyanarayana T. 2003. **Phytases: Microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications.** Crit. Rev. Biotech. 23: 29-60
- Wilkinson M, Duskow J, Lindsey S. 1990. **RNA blots: Staining procedures and optimization of conditions.** Nucl. Acids Res. 19(3): 679
- Xiao K, Harrison MJ, Wang ZY 2005 **Transgenic expression of a novel *M. Truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*.** Planta 222: 27-36
- Yip W, wong L, chang C, wu W, Lung S, y Lim B L. 2003. **The introduction of phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the**



---

**growth performance of transgenic tobacco.** Bio. Biophys. Res. Com. 310: 1148-1154

- Zimmerman P, Zardi G, Lehmann M, Zeder C, Amrhein N, Frossard E y Bucher M. 2003. **Engineering the root –soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts.** Plant Biotech J. 353-360