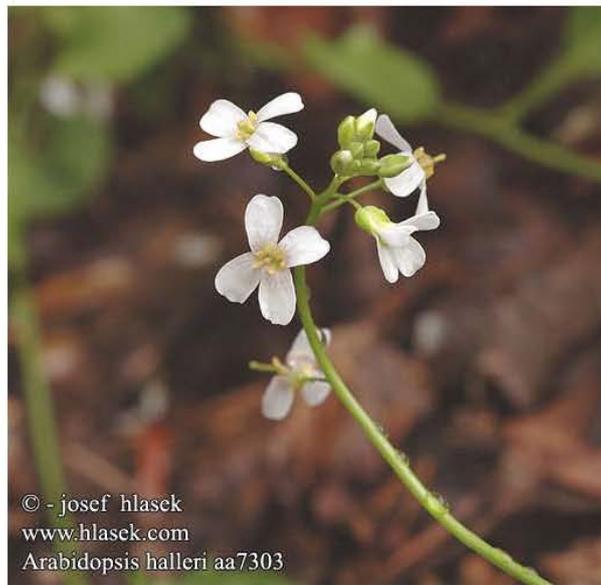


Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología

Departamento de Biología Molecular de Plantas

**Análisis diferencial del proteoma del tonoplasto de *Arabidopsis thaliana* en la tolerancia a metales pesados.**



Tesis que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Bioquímicas  
presenta

María Cristina Miranda Vergara.

Directora de Tesis: Dra. Bronwyn J. Barkla Coady  
Lab. Dr. Omar Pantoja Ayala



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.

## AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por haberme regalado la maravillosa oportunidad de seguir estudiando y haber podido terminar este sueño.

A mis papás porque siempre han estado a mi lado, ayudándome con solidaridad y respeto a las decisiones que tomo, impulsándome siempre a ser una mejor mujer.

A Güero y Beto que con su amor de hermanos caminan conmigo en esta vida.

A Gerardo, mi compañero de vida, por tu apoyo incondicional y por saber esperar a pesar de la distancia.

A mi Yaya, mis tías, Laura, Lili, Luisa, Malusa, Pili y Mari, a mis tíos Ernesto, Felipe y Noé y a mis diez primos que son la mejor familia en la que he podido vivir.

A mis amigos, Mariana, Josué y Eric por estar en todos los momentos de esta aventura.

A los Doctores Omar Pantoja y Bronwyn Barkla por enseñarme con su ejemplo qué es hacer ciencia y saber equilibrarlo para ser feliz.

A Rosario por ayudarme cada vez que tenía una duda y a trabajar con tesón y dedicación. A todos los integrantes del laboratorio Paul, Julio, Enrique, Dulce, Ivonne, Cynthia, Juan, Jorge, Guadalupe, Martina por haber hecho especiales el tiempo en la maestría.

Agradezco especialmente al Dr. Lourival Posani y a la Dra. Victoria Pando por haber corregido con dedicación y paciencia mi tesis y haber dado sabios consejos y observaciones durante mis tutorales.

También a Dr. Arturo Guevara, Dra. Alejandra Covarrubias, Dra. Herminia Loza, Dr. César Batista por haber revisado mi tesis y ayudarme a mejorarla.



ÍNDICE	
ÍNDICE.....	1
1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Contaminación por metales pesados, el caso de México.....	4
2.2 Riesgos por el contacto con metales pesados.....	5
2.3 Métodos utilizados para la remoción de metales pesados.....	8
2.4 Biorremediación.....	9
2.5 Papel de la vacuola en la acumulación de metales.....	12
2.6 Transportadores de metales en plantas.....	16
2.7 Proteómica de la vacuola.....	20
2.8 Regulación por sustrato de los genes de transportadores.....	21
2.9 <i>Arabidopsis halleri</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> como plantas modelo.....	21
2.10 Ventajas de la electroforesis por flujo libre.....	24
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.1.1 Propagación de <i>Arabidopsis halleri</i> .....	25
4.1.2 Proteómica de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
4.2.1 Propagación de <i>A. halleri</i> .....	25
5. METODOLOGÍA.....	27
5.1 Material vegetal.....	27
5.2 Propagación vegetativa de <i>A. halleri</i> .....	27
5.2.1 Estolones.....	27
5.2.2. Enraizamiento de hoja.....	28
5.2.3 Propagación por callo (tejido indiferenciado).....	28
5.3 Curva de tolerancia a zinc en <i>A. thaliana</i> .....	29
5.4 Aislamiento de membranas microsomales.....	31
5.5 Electroforesis de Zona de Flujo Libre.....	33
5.6 Determinación de proteína y concentración de la muestra.....	35
5.7 Análisis por western blot de las fracciones separadas por FFZE.....	35
5.8 Enfoque isoeléctrico de tonoplasto puro usando tiras de IPG.....	36
5.9 Electroforesis en gel diferencial (DIGE).....	38
5.9.1 Reconstitución de los fluoróforos CyDyes y preparación de la solución de trabajo.....	38
5.9.2 Fluoróforos CyDye para marcaje de proteínas.....	39
5.9.3 2D-PAGE del tonoplasto marcado con fluoróforos CyDye.....	40
5.9.4 Adquisición y Análisis de Imágenes.....	40
6. RESULTADOS.....	44
Sección 1. PROPAGACIÓN DE <i>Arabidopsis halleri</i> .....	44
6.1 Germinación y sobrevivencia de <i>A. halleri</i> .....	44
6.1.1 Reproducción por Estolones.....	45
6.1.2 Enraizamiento de hoja.....	46
Sección 2. Proteómica de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
6.2 <i>A. thaliana</i> como planta sustituta.....	50

6.3 Tolerancia de <i>A. thaliana</i> al zinc.....	51
6.4 Purificación del tonoplasto de <i>A. thaliana</i> por FFZE.....	59
6.5 Solubilidad mejorada de proteínas del tonoplasto con detergentes para su separación por IEF.....	66
6.6 Electroforesis en Gel Diferencial del tonoplasto de <i>A. thaliana</i> .....	69
7. DISCUSIÓN.....	78
8. CONCLUSIONES.....	86
9. PERSPECTIVAS.....	86
10. BIBLIOGRAFÍA.....	88
11. APÉNDICE.....	98

## 1. RESUMEN

La contaminación del suelo por metales pesados es un problema latente en México y a nivel mundial. Técnicas no tradicionales y económicamente viables para la remoción de metales pesados, como la fitorremediación, han cobrado importancia y despertado interés. En la naturaleza existen pocas plantas hiperacumuladoras e hipertolerantes, las cuales acumulan metales y los secuestran a través de transportadores específicos presentes en el tonoplasto (membrana de la vacuola). Antes de poder utilizar plantas modificadas genéticamente con fines de fitorremediación, se deben conocer los mecanismos de la toma, traslocación y secuestro de metales. A la fecha, la función de transportadores de interés para la fitorremediación es desconocida o su caracterización está incompleta.

Por eso se propone un estudio subproteómico diferencial del tonoplasto, que pretende identificar aquellas proteínas que en la presencia de elevadas concentraciones de zinc, un micronutriente que puede volverse tóxico, revele aquellas proteínas directamente involucradas con su toma y secuestro al interior de la vacuola.

Se obtuvo una fracción pura del tonoplasto por electroforesis de zona de flujo libre, que separa a las endomembranas según su carga superficial neta en una capa de flujo laminar continua. Por western blot se identificó a la fracción pura de tonoplasto. Esta fracción se marcó con fluoróforos CyDyes para poder hacer una comparación cuantitativa en la expresión de proteínas entre la muestra control y la tratada con zinc gracias a la técnica de Electroforesis en Gel Diferencial (DIGE). Se identificaron ocho proteínas cuya expresión cambia significativamente en la presencia del metal, cuatro aumentan su expresión y cuatro disminuyen. Con la futura identificación y caracterización funcional de estas ocho proteínas, se contextualizará su papel en la tolerancia a metales pesados y podrá usarse esta información para el diseño de plantas útiles en fitorremediación.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Contaminación por metales pesados, el caso de México**

Los metales pesados se definen comúnmente como aquellos elementos químicos que poseen una densidad específica de más de 5 g/cm<sup>3</sup> (Järup, 2003). Tienen además propiedades metálicas, como ductilidad, conductividad, estabilidad como cationes, especificidad por su ligando, etc. y su número atómico es mayor a 20 (Lasat, 2000). Las emisiones de metales pesados pueden ocurrir por una amplia gama de rutas, que incluyen al aire, al suelo y las aguas superficiales, que después se integran a los mantos acuíferos o se utilizan en las tierras de cultivo.

Además de los procesos industriales que utilizan metales pesados, ciertas prácticas en la agricultura contribuyen con este tipo de contaminación por el uso de pesticidas y fertilizantes que los contienen. Según la SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (México, 2000), la discusión actual sobre dichas sustancias ha cobrado mayor importancia porque suelen incluir elementos tóxicos como plomo, cadmio, arsénico o dioxina, que resultan del empleo de residuos industriales contaminados o fango de las alcantarillas, como fuente barata de nutrientes minerales tales como zinc o hierro. La contaminación del suelo por cadmio aumenta por esta vía, causando que su incorporación por vegetales y legumbres sea mayor y, en consecuencia, el consumo de productos agrícolas sea la fuente más importante de exposición de la población no fumadora a este metal (World Health Organization, 1992). También la minería deja expuestos depósitos minerales o roca de desecho que tiene por resultado la lixiviación de metales pesados. Por otra parte, una gran variedad de desechos domésticos y pinturas contienen metales pesados que son simplemente descargados al ambiente. Las fundidoras, por su parte, expiden altas concentraciones de metales al aire, igual que los humos expedidos por los medios de transporte (Pilon-Smiths, 2004), que eventualmente a través de la lluvia llegan al suelo y con el tiempo son arrastrados

a mantos acuíferos, ríos y lagos, hasta llegar al mar. Cabe mencionar que dicha contaminación del aire puede viajar grandes distancias y contaminar lugares alejados de la zona de donde son expedidos (Beyer et al., 1985). Las emisiones industriales de metales pesados, sobretodo cadmio, cobre, plomo, níquel y zinc al medio ambiente, han sobrepasado los ciclos biogeoquímicos naturales en varios ecosistemas (Nriagu, 1996). Las actividades militares, como el entrenamiento con armas, las municiones y la manufactura de explosivos, contribuyen fuertemente con la contaminación del suelo por metales pesados (US Army Environmental Center, 2003). Los metales pesados son considerados peligrosos en México, según la Norma NOM-052-ECOL, que es el código de clasificación de las características que contienen los residuos peligrosos llamados CRETIB y que significan: corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico infeccioso. Esta Norma toma en cuenta desechos que contienen metales pesados, entre los que se encuentran a manera de ejemplo, residuos provenientes del cadmizado, lodos del tratamiento de aguas residuales en la producción de baterías de níquel-cadmio, residuos de los hornos de producción de las baterías de mercurio, etc.

## **2.2 Riesgos por el contacto con metales pesados**

Los metales esenciales son requeridos por todos los organismos en pequeñas cantidades para poder llevar a cabo reacciones catalíticas específicas. Ejemplos de ello es la hemoglobina, que tanto en vertebrados como en invertebrados contiene hierro, la hemocianina, pigmento de moluscos y crustáceos, que contiene cobre y la vitamina B<sub>12</sub>, que contiene cobalto (Clark, 1992).

Sin embargo, a niveles que exceden sus requerimientos, tanto los metales esenciales como los no esenciales, pueden perturbar el metabolismo al unirse a proteínas de manera no específica; por ejemplo al unirse al grupo sulfhidrilo, ocasionan daño oxidativo debido a su capacidad de catalizar reacciones redox. Esto puede traer como consecuencia la desactivación

de reacciones enzimáticas esenciales, por enmascarar los grupos catalíticamente activos o por desnaturalización de las proteínas (Benavides et al., 2005), daño a las estructuras fundamentales (especialmente membranas) y modificaciones al DNA (mutagénesis) (Clemens et al., 2002). Además, los metales pesados tienen una alta afinidad por moléculas orgánicas y tienen la habilidad de reemplazar cofactores catiónicos de proteínas (Dräger et al., 2004).

Las principales amenazas para la salud humana debidas a la exposición a metales pesados, están asociadas principalmente a plomo, mercurio, cadmio, arsénico y aluminio. La toxicidad producida por los metales de transición involucra generalmente, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad; estas diferencias en toxicidad que presentan los diferentes metales en el cuerpo dependen de su solubilidad, absorción, transporte y reactividad química (Stohs & Bagchi, 1995).

La Secretaría de Salud en México advierte que las personas deben evitar el contacto con metales pesados en la NOM-117-SSA1-1994, que es una norma sobre bienes y servicios en la que se establecen los métodos para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica (Moctezuma, 1995).

La exposición humana al cadmio puede causar daño a los riñones, específicamente una disfunción tubular, disminuyendo la tasa de filtración glomerular y aumentando el riesgo a desarrollar cálculos renales. Una exposición a largo plazo a altas concentraciones de cadmio, puede causar daño al esqueleto, una combinación de osteomalacia con osteoporosis. En general, el contacto con cadmio tiene como efecto la desmineralización del esqueleto, que como consecuencia final, aumenta la probabilidad de fracturas. Según la IARC (International Agency for Research on Cancer), al cadmio se le considera con potencial carcinogénico para humanos (<http://www.iarc.fr/>). La toxicidad del zinc provoca en humanos náusea, vómito, dolor epigástrico, diarrea y letargo. La sobredosis crónica del metal puede inducir deficiencia

en el nivel del cobre en el organismo y alteraciones en la respuesta inmune, así como cambios en el perfil lipídico de la sangre (Fosmire, 1990).

La exposición prolongada del suelo a metales pesados, resulta en una marcada disminución en la actividad enzimática de procesos biogeoquímicos de la microflora y fauna (Tyler et al., 1989).

El cadmio puede alterar la toma de minerales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{P}^{-3}$  y  $\text{K}^{+}$  en plantas por su efecto en la disponibilidad de éstos o por la reducción en la población de la microfauna del suelo (Benavides et al., 2005). Asimismo, la apertura estomatal, la transpiración y la fotosíntesis se afectan en presencia de este metal. A simple vista, las plantas pueden presentar clorosis, enrollamiento en las hojas y una reducción en el crecimiento o enanismo. En particular, se ha reportado que el cadmio afecta directamente el balance de agua en las plantas (Costa & Morel, 1994).

El zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) es un metal de transición y ocupa el lugar 23 entre los elementos más abundantes de la tierra. Posee dos facetas interesantes: es un micronutriente esencial aunque en exceso es tóxico (Broadley et al., 2007). Actúa como cofactor metálico en un gran número de metaloproteínas. Entre las más de 400 proteínas presentes en plantas que contienen zinc se encuentran los factores de transcripción con dedos de zinc, como la superóxido dismutasa  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ , la anhidrasa carbónica, las  $\text{Zn}^{2+}$  metaloproteasas y también la RNA polimerasa (Desbrosses-Fourage et al., 2005). El exceso de zinc en plantas, que ocurre sobretodo en plantas en suelos contaminados por actividades mineras y de fundición, inhibe el crecimiento de la raíz, disminuye la tasa fotosintética y provoca clorosis por deficiencia de hierro, siendo más sensibles a este metal, las células en alargamiento y división, lo cual puede provocar pérdidas importantes en agricultura ya que reduce la cosecha (Woolhouse, 1983; Chaney, 1993).

## 2.3 Métodos utilizados para la remoción de metales pesados

Se han investigado diversas técnicas para remover metales pesados que se desechan al suelo tendientes a recuperar las áreas contaminadas y así, disminuir los riesgos para la salud humana y para los ecosistemas, minimizando la entrada de elementos tóxicos a la cadena alimenticia (Krämer & Chardonens, 2001). Existen métodos tradicionales para la extracción de metales pesados, entre ellos está el retirar el suelo contaminado trasladándolo a lugares asignados para desechos peligrosos, aumentando así el riesgo de dispersión de los contaminantes por partículas de polvo durante su transporte (Lambert et al., 2001). Otro método es enterrar el estrato de suelo contaminado, sustituyendo la segunda capa de 12 pulgadas de suelo por la primera, considerando que ahí se encontraran los metales. Después se sugiere que se cubra con corteza de árbol, pedazos pequeños de madera o arena limpia (HMRC, 2000). Lo anterior definitivamente no da una solución, solamente relocaliza el problema.

Otra técnica *in situ*, es la estabilización o inmovilización de los metales en el suelo mediante la adición de sustancias químicas que causan la formación de minerales que contienen metales en formas que no son fácilmente absorbidas por plantas o animales (Lambert et al., 2001). También se pueden inmovilizar metales, dependiendo si se trata de cationes o aniones, variando el pH del suelo a 6.5 o más básico, lo cual provoca que los cationes sean más insolubles y no se incorporen fácilmente a las plantas. Lo anterior funciona bien con la mayoría de los metales, con la excepción del cromo. La aplicación de fosfato es otra opción para inmovilizar metales, al disminuir la disponibilidad de metales catiónicos por su efecto de contraponos o quelante (NRCS, 2000). De la misma forma, se utilizan agentes quelantes como el ácido nitrilotriacético de sodio, para extraer los metales pesados, método rápido y eficiente para la extracción de plomo y cadmio (Lim et al., 2004).

Asimismo, se pueden usar tratamientos a altas temperaturas, conocidos como vitrificación del suelo, cuyo resultado es la obtención de un material granular que no se puede

filtrar. Además de los costos que este proceso involucra, un problema grave es que al calentar el suelo de 1,600 a 2,000° C se tarda mucho tiempo en regresar a su temperatura original, (VKI, 2003). Otro método relacionado con altas temperaturas es el Método de Calentamiento por Vapor (300-800° C), en el que se pone en contacto el suelo con vapor, para vaporizar los contaminantes, que en un paso posterior son absorbidos por carbón activado (Ministry of the Environment Japan, 2002).

Un método adicional para la remoción de metales pesados *in situ* es la remediación electrocinética, en la que se crea un campo eléctrico por el que se hace pasar el suelo aplicando una corriente directa de bajo voltaje. Sin embargo, al utilizar esta técnica, se ha visto que se producen productos secundarios que son perjudiciales para la microfauna del suelo (US Army Environmental Center, 2003).

Aparte de los problemas inherentes a cada método de remediación de metales pesados mencionados, se trata de métodos invasivos, cuyos costos son muy elevados pudiendo oscilar entre 10 y 100 dólares por metro cúbico (m<sup>3</sup>) *in situ*; por su parte la remoción de metales pesados *ex situ* podría tener un costo de 30 a 300 dólares/ m<sup>3</sup> (Watanabe, 1997). Shmaefsky (2002), expone que el costo de excavar suelo de su lugar de origen y llevarlo a un relleno sanitario especial, es aproximadamente de 2 millones de dólares por hectárea.

## **2.4 Biorremediación**

Debido al alto costo y a la baja practicidad que representan los métodos convencionales para descontaminar suelos, existe un gran interés tanto científico como comercial en métodos alternativos de bajo costo. Aunque numerosas técnicas de limpieza de contaminantes pueden ser consideradas, la biorremediación *in situ*, representa la solución más efectiva, debido a su bajo costo, hasta cinco veces menos que los métodos descritos arriba y la más amigable, ecológicamente hablando. La biorremediación es el uso de organismos biológicos para

mejorar la calidad del ambiente al explotar su habilidad de poder desarrollarse en presencia de sustancias peligrosas, incluyendo las tóxicas o simplemente compuestos nocivos en lugares contaminados (Lees & Senior, 1995).

Dicha técnica es una tecnología alternativa muy atractiva, ya que involucra procesos biológicos, que además se pueden seleccionar y mejorar aquéllos que muestren una rápida remoción de sustancias químicas peligrosas o metales pesados del suelo, del agua e incluso de la atmósfera.

La biorremediación puede ser usada directa o indirectamente, para tratar desechos inorgánicos a través de la transformación de compuestos que contienen nitrógeno o azufre e incluso, la inmovilización/movilización de metales pesados (Lees & Senior, 1995).

De la biorremediación se desprende el concepto de fitorremediación, que es el empleo de plantas para la remoción de contaminantes de suelos, sedimentos y aguas freáticas (Dietz & Schnoor, 2001; McGrath & Zhao, 2003). Estos métodos utilizan la capacidad de algunas plantas, natural o genéticamente modificadas, para extraer, desintoxicar y/o secuestrar contaminantes ambientales del suelo y del agua (Meagher, 1998).

La fitorremediación se puede aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos. Esta técnica se ha dividido en varios subtipos, siendo los dos más importantes: la fitoestabilización, que es el uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de contaminantes en el ambiente y la fitoextracción, que es el uso de plantas acumuladoras de contaminantes para remover metales o sustancias orgánicas del suelo *in situ*, al concentrarlas en sus partes aéreas que son cosechables (McGrath & Zhao, 2001; Salt et al., 1998). La fitoextracción tiene como fuente primaria de energía la luz solar y se lleva a cabo *in situ*, minimizando el contacto humano y los costos (Pilon-Smits, 2004). Esta alternativa es la técnica más efectiva, ya que al final del periodo de crecimiento, la parte aérea de la planta es cosechada, secada o incinerada y el material rico en contaminantes se descarga en un depósito especial o en una fundidora. La energía obtenida al quemar la planta podría sostener la tecnología si los humos pueden ser

limpiados apropiadamente, por ejemplo con carbón activado para reciclarlos en procesos industriales donde se utilicen, proceso conocido como fitominería (Chaney et al. 2000; Krämer, 2005 a). La fitominería puede generar ganancias por la extracción de metales de cuerpos mineros que de otra forma no son rentables (Robinson et al., 2003). Se ha reportado el uso de pirólisis para la recuperación de metales pesados de plantas hiperacumuladoras (Alkorta et al., 2004). La parte aérea de la planta cosechada después de la extracción de los metales puede ser utilizada con fines no comestibles, por ejemplo para madera o para fabricar papel corrugado.

Para que la fitoextracción sea efectiva, la biomasa obtenida deberá tener concentraciones mucho más altas del metal que la que existe en el suelo, siendo esto el cuello de botella de esta tecnología (Krämer, 2005 a).

Dejando a un lado el menor costo que representa el uso de plantas para la extracción de metales pesados del suelo, en cuanto a daños al ecosistema, es una técnica con menos problemas secundarios de los que presentan los métodos tradicionales mencionados anteriormente, además de que es más agradable a la vista y socialmente más aceptada. Los sistemas de raíces de las plantas enriquecen el suelo, al añadir materia orgánica y al aumentar la capacidad de unión del agua y nutrientes esenciales a las partículas del suelo. También las raíces estabilizan el suelo contra la erosión, previniendo la contaminación secundaria de áreas aledañas por arrastre por agua o aire (Meagher, 1998).

Una planta ideal que pueda ser utilizada para la fitorremediación de metales pesados deberá poseer múltiples características entre las que destacan rápido crecimiento, raíces profundas, biomasa abundante, fácil de cosechar y capaz de tolerar y acumular una amplia gama de metales pesados en sus partes aéreas, es decir, deben ser hipertolerantes e hiperacumuladoras (Clemens et al., 2002). El factor de bioconcentración en plantas hiperacumuladoras, es decir, la proporción de concentración de metal en sus tallos con respecto a la del suelo, es generalmente mayor a uno y llega a alcanzar niveles de 50-100

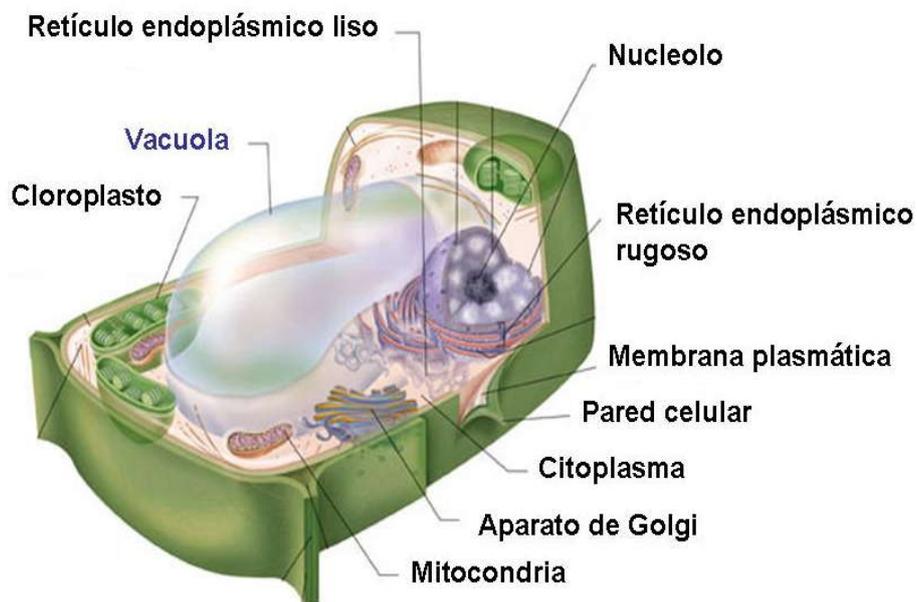
(McGrath & Zhao, 2003). El fenómeno de hiperacumulación es raro, pero ocurre en plantas terrestres. Por su parte, una planta hipertolerante es aquella que posee mecanismos internos de desintoxicación que le permiten secuestrar metales y metaloides en la vacuola.

A pesar de que la lista de plantas hiperacumuladoras identificadas a la fecha sigue en aumento, hasta el momento, no se ha descrito alguna planta que cumpla con todos los criterios deseables. Muchas de las plantas hiperacumuladoras identificadas poseen una biomasa muy pequeña y crecen lentamente. De tal manera, comprender los mecanismos biológicos de la hiperacumulación puede ayudar en el desarrollo de plantas modificadas genéticamente para la fitorremediación de metales pesados. La ingeniería genética puede ser utilizada para transferir genes involucrados en la hiperacumulación a plantas no acumuladoras que crecen más rápido y poseen una biomasa mayor (Salt et al., 1998). En este sentido será muy conveniente diseñar plantas que sean clones estériles para aplicaciones de fitorremediación, porque no hay necesidad de que las plantas se reproduzcan y su esterilidad evitaría el riesgo de fertilización cruzada con plantas de tipo silvestre (Dietz & Schnoor, 2001).

## **2.5 Papel de la vacuola en la acumulación de metales**

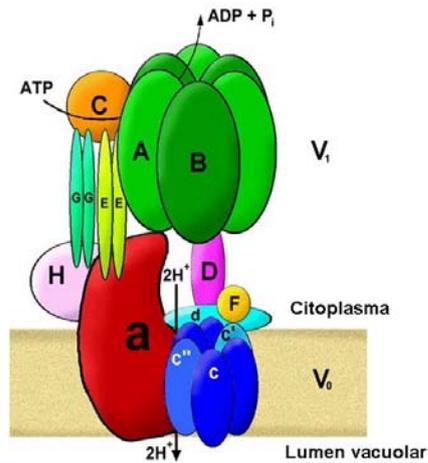
Existe evidencia de que los metales y metaloides son secuestrados en las vacuolas de las hojas en plantas hiperacumuladoras de zinc, cadmio, níquel y arsénico (McGrath & Zhao, 2003). La vacuola es el compartimento subcelular más grande de una célula vegetal madura ocupando hasta el 95% del volumen celular total. El citosol en dichas células se observa como una delgada capa entre la membrana plasmática y la membrana vacuolar llamada tonoplasto (Figura 2.1). La vacuola posee varias funciones dentro de la célula: recicla componentes celulares, genera la turgencia celular, mantiene la homeostasis iónica, regula el pH citoplásmico, almacena  $\text{Ca}^{2+}$  y esqueletos de carbono en forma de malato y secuestra xenobióticos y iones tóxicos como  $\text{Na}^+$  y metales pesados, entre otros (Maeshima, 2001; Neuhaus & Martinoia, 2001). En condiciones fisiológicas el lumen vacuolar tiene un pH de

alrededor de 4.8, mientras que el pH citosólico es de 7.6, es decir, hay una diferencia de alrededor de dos órdenes de magnitud entre el citoplasma y el lumen de este compartimento (Figura 2.4) (Barkla & Pantoja, 1996). El gradiente de pH se mantiene por la presencia de dos bombas de protones presentes en el tonoplasto: la  $H^+$ -ATPasa vacuolar, que utiliza la hidrólisis de ATP para conducir  $H^+$  hacia dentro de la vacuola y la  $H^+$ -pirofosfatasa vacuolar (V-PPasa), que utiliza la hidrólisis de pirofosfato para transportar protones hacia el lumen vacuolar.



**Figura 2.1** Componentes típicos de una célula vegetal.  
Adaptada de: <http://www.kensbiorefs.com/cellstructure.html>

En las plantas, los procesos de transporte activo secundario a través del tonoplasto son aquellos que dependen de la fuerza motriz de los protones, formada por un gradiente de pH y por un potencial eléctrico, generados por las bombas de protones,  $H^+$ -V-ATPasa (Figura 2.2) y V-PPasa (Neuhaus & Martinoia, 2001).

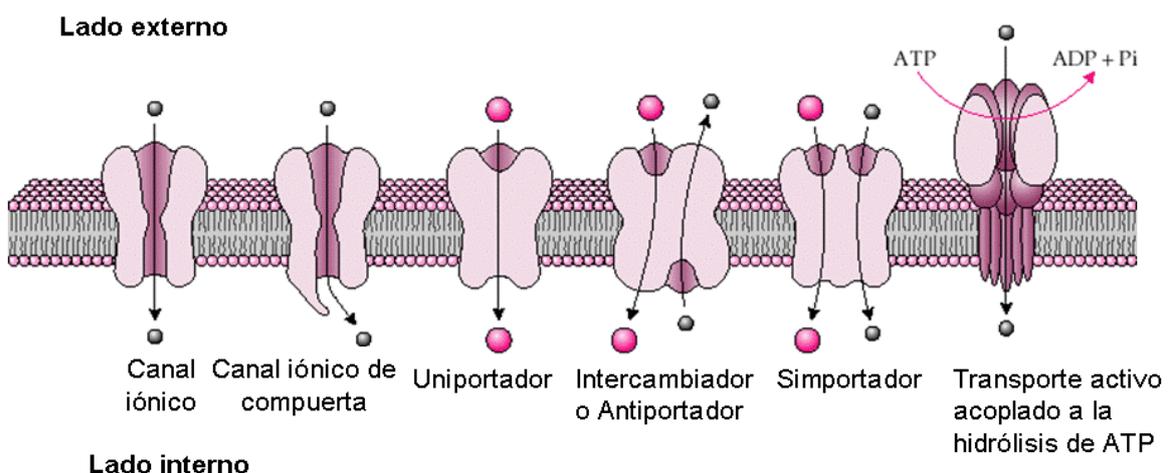


**Figura 2.2**  $H^+$ - $V$ -ATPasa

El transporte de protones a través del dominio integral  $V_0$  del citoplasma al lumen vacuolar, (en azul) es impulsado por la hidrólisis de ATP por el dominio periférico  $V_1$  (en verde). El dominio catalítico  $V_1$  está formado por las subunidades A y B en una conformación  $A_3B_3$ .  $V_0$  está formado por subunidades a y c del complejo  $a_6c_6$ .

Adaptada de: <http://biochemistry.utoronto.ca/manolson/bch.html>.

Se han identificado varios tipos de transportadores activos secundarios en el tonoplasto que incluyen simportadores y antiportadores. Simporte es el transporte de solutos acoplado al movimiento de protones en la misma dirección. Antiporte es el transporte acoplado de solutos y protones en direcciones opuestas, también llamado intercambiador (Reuss, 2001) (Figura 2.3).



**Figura 2.3** Ejemplos de Transportadores Membranales

Los iones están representados como pequeñas esferas grises, mientras que los iones/solutos de mayor tamaño como esferas rosas. Adaptada de:

<http://www.chemistry.emory.edu/justice/seminar/images/fig3.19.gif>

El papel central de la vacuola en la hiperacumulación de metales es el transporte de metales pesados a su interior, en la mayoría de los casos en contra de su gradiente de concentración y por tanto, es dependiente de mecanismos de transporte activo. Entre los transportadores de metales que se pueden encontrar en el tonoplasto, están aquéllos que necesitan de la fuerza motriz de los protones para llevar a cabo la acumulación del metal pesado, como antiportadores Metal/H<sup>+</sup>. También se encuentran los transportadores energizados directamente por la hidrólisis del ATP entre ellos, los transportadores ABC (ATP Binding Cassette) y las ATPasas del tipo P<sub>1B</sub> (Theodoulou, 2000; Williams & Mills, 2005).

Una vez que los metales se encuentran dentro de la vacuola son quelados por diferentes sustancias, para alejarlos de reacciones que pudieran catalizar y controlar su toxicidad. Además, la acidificación de la vacuola también contribuye a que los metales sean retenidos en este compartimento. Entre los agentes quelantes de los metales en la vacuola, se encuentran los ácidos orgánicos y algunos aminoácidos, particularmente la histidina (Cobbett, 2000). Se tiene evidencia de que el zinc está unido predominantemente a malato en las hojas de *Arabidopsis halleri* (Figura 2.4) (Sarret et al., 2002) y aunque no se tiene evidencia de otro metal quelado de esta manera, es probable que, por complementación de cargas, otros metales interactúen con diversos ácidos orgánicos que se acumulan en la vacuola de las células vegetales a altas concentraciones, como el citrato y el fumarato (Ryan & Walker-Simmons, 1983). Otro tipo de agentes quelantes son el tripéptido glutatión (GSH) ( $\gamma$ -glu-cis-gli) y sus oligómeros llamados fitoquelatinas (PC) que tienen la estructura general ( $\gamma$ -Glu-Cis)<sub>n</sub>-Gli (n=2-5). Se ha visto que *in vivo*, el cadmio y el arsénico forman complejos con PC. El mecanismo de desintoxicación de metales por PC es más complejo que la simple quelación del metal dentro de la vacuola, éste debe activar la síntesis de la PC, ser quelado en el citoplasma y luego transportado en forma de complejo a la vacuola, donde probablemente forme un complejo con azufre o ácidos orgánicos (Cobbett, 2000).

## 2.6 Transportadores de metales en plantas

Antes de poder utilizar plantas modificadas genéticamente con fines de fitorremediación, se deben conocer los mecanismos de la toma, traslocación y secuestro de metales. A la fecha, las funciones de ciertos transportadores centrales para la fitorremediación se desconocen o su caracterización está incompleta (Alkorta et al., 2004).

El genoma de *A. thaliana* codifica para más de 150 transportadores de cationes diferentes que pertenecen al menos a nueve familias (Pilon-Smits & Pilon, 2002). Hasta ahora, sólo pocos genes responsables del transporte de metales han sido identificados y/o aislados. Se propone que muchos de ellos se localizan en la membrana plasmática y están involucrados en la toma de metales hacia dentro de la célula, aunque también se han identificado otros en membranas internas, que regulan su almacenamiento y pueden ser específicos de ciertos tipos de células (Clemens, 2001; Pilon-Smits & Pilon, 2002). Frecuentemente, existe más de un sistema de transporte para un metal, cada uno posee capacidades y afinidades diferentes para su sustrato. De especial interés para la fitorremediación son aquéllos que son selectivos para una amplia gama de metales y tienen la capacidad de transportar con alta afinidad más de un metal a la vez (Pilon-Smits & Pilon, 2002).

Las familias de genes involucradas en el transporte de metales identificadas hasta ahora en plantas, incluyen a las que codifican las siguientes proteínas:

- Las CPx-ATPasas de metales pesados, un grupo de la superfamilia de las ATPasas tipo P llamadas así porque comparten un motivo intermembranal cisteína(C)-prolina(P) e histidina o serina(x) (Williams et al., 2000).
- Los NRAMPs (por sus siglas en inglés, Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) (Nevo & Nelson, 2006).
- La familia de facilitadores de difusión de cationes o CDF (Cation Diffusion Facilitator family) (Hall, 2002).

- La familia ZIP que toma su nombre de los primeros miembros que fueron identificados ZRT (Zinc Regulated Transporter), IRT-like Protein (Iron Regulated Transporter) (Guerinot, 2000).
- Los antiportadores catión/H<sup>+</sup> (Hall & Williams, 2003).
- Los transportadores ABC (ATP- Binding Cassette) son una superfamilia que son activos en el transporte de una amplia gama de sustancias que incluye alcaloides, aminoácidos, azúcares y sus conjugados, péptidos y sus conjugados, metales pesados quelados y lípidos (Liu et al., 2001).

Entre los transportadores conocidos que se localizan en membrana plasmática se encuentra el transportador IRT1, que media la toma de hierro (II) y pertenece a la familia ZIP. También tiene la capacidad de transportar Zn<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>, así como Cd<sup>2+</sup> (Rogers et al., 2000). En *Arabidopsis* se encontraron los transportadores ZIP 1-3 que presentan diferentes afinidades por Zn<sup>2+</sup> en el intervalo nanomolar. ZIP1 y ZIP3 se expresan sobretodo en raíces y se inducen cuando hay deficiencia de este metal, sugiriendo un papel en la toma normal de este micronutriente (Krämer et al., 2007). Otro transportador de membrana plasmática que se ha identificado es el transportador putativo de cobre, COPT1 (Hall et al., 2003).

Una desintoxicación eficiente por parte de la planta requiere de mecanismos de transporte que acumulen al compuesto tóxico o metales pesados, lejos de los procesos metabólicos, en un compartimento definido: dentro de la vacuola (Figura 2.1). Sin embargo, a la fecha se han localizado muy pocos transportadores de metales en el tonoplasto.

Recientemente se ha demostrado que AtMTP1, un transportador de zinc localizado en el tonoplasto que pertenece a la familia CDF, está involucrado en la desintoxicación de este metal, mediando su acumulación en la vacuola, y en la tolerancia basal al Zn<sup>2+</sup> sobretodo en células de tejidos en crecimiento (Desbrosses-Fonrouge et al., 2005). Asimismo, AtMTP3 también se localiza en la vacuola de las células vegetales y está involucrado en la homeostasis del zinc, aumentando la tolerancia al metal si se expresa ectópicamente (Arrivault et al., 2006).

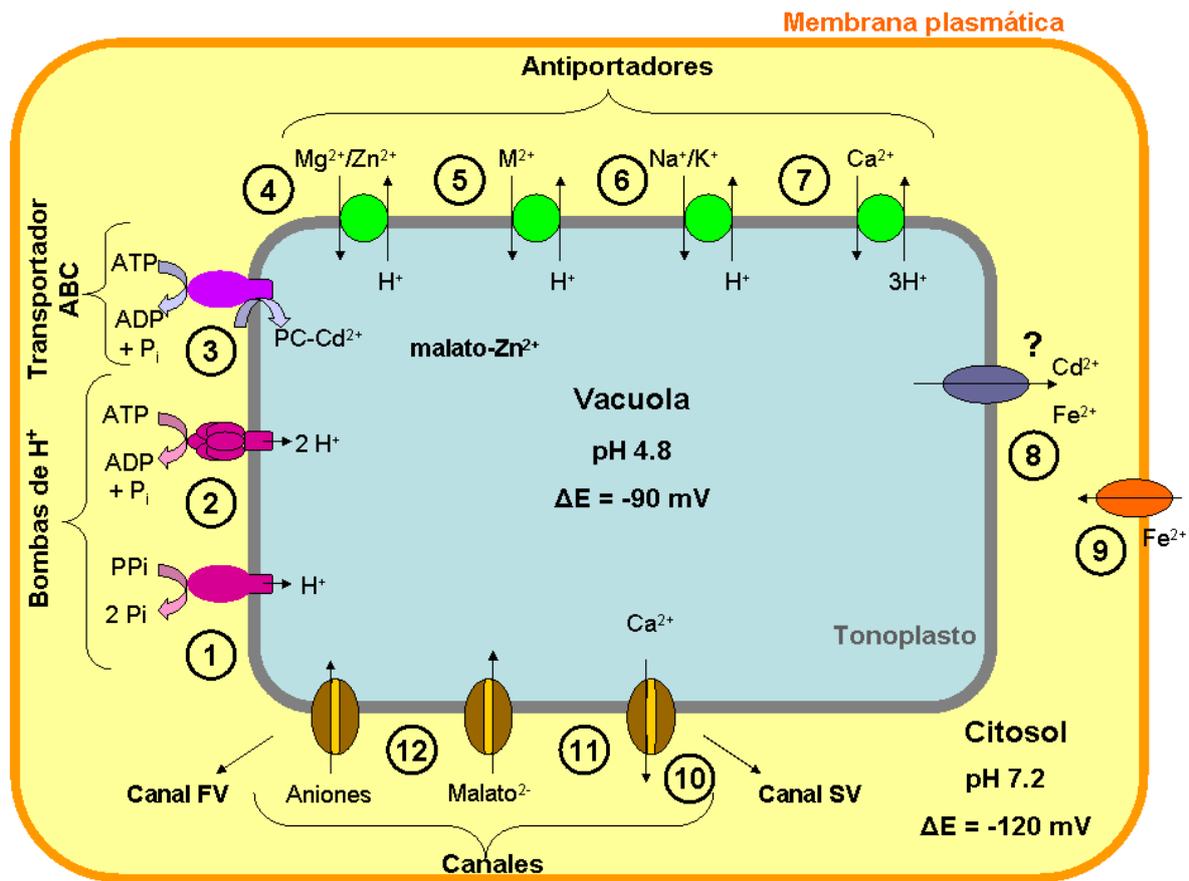
Varios de los 11 miembros de la familia CAX (Cation exchanger) de intercambiadores vacuolares catión/ $H^+$ , han sido caracterizados como capaces de transportar metales pesados. Los genes CAX1 y CAX2 (Figura 2.4) codifican antiportadores  $Ca^{2+}/H^+$  de alta y baja eficiencia, respectivamente (Hirschi et al, 1996). CAX1 se expresa sobretodo en las hojas. Una mutación en la His<sup>338</sup> del dominio repetitivo C-2 de CAX1 identificó a este residuo como clave en la selectividad iónica, haciendo a este transportador más afin a metales pesados como  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , que a  $Ca^{2+}$  (Shigaki et al., 2005). Otro miembro de la familia, CAX2, parece mediar la toma de  $Cd^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  aunque con baja afinidad. Plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína *AtCAX2* son más tolerantes a niveles elevados de  $Mn^{2+}$  (Hirschi et al., 2000).

Los NRAMPs, que están presentes desde bacterias hasta el hombre, juegan un rol importante en la homeostasis iónica. Los miembros de esta familia comparten una alta identidad en las secuencias de sus proteínas con las de mamíferos, 40% plantas, 28% levadura y 55% en mosca (Nevo & Nelson, 2006). En plantas han sido implicados en el transporte de una amplia gama de cationes metálicos divalentes, entre ellos está *AtNRAMP3* (Figura 2.4), que es un transportador de  $Fe^{2+}$  que se encuentra en el tonoplasto y se expresa en tejido conductivo, postulándose que puede estar involucrado en el transporte de metales a larga distancia entre los tejidos de la raíz donde se acumulan y la parte aérea (Thomine et al., 2003). Cuando este transportador se elimina, aumenta la resistencia al cadmio, mientras que si se sobreexpresa, confiere hipersensibilidad al mismo. Tanto *AtNRAMP4* como *AtNRAMP3* juegan un papel en el transporte de  $Cd^{2+}$ . Entre los transportadores ABC que han sido caracterizados, se encuentra el *AtMRP2*. Este gen en levadura codifica para un transportador ABC que tiene la capacidad de transportar al cadmio conjugado con dos moléculas de glutatión S (conjugado GS<sub>2</sub>) (Lu et al., 1998). *AtMRP3* es el único miembro de plantas que tiene la capacidad de suprimir la hipersensibilidad de la levadura *ycf1Δ* deficiente en un transportador tipo ABC vacuolar que transporta conjugados de glutatión y tiene un papel en la

desintoxicación de metales como cadmio y mercurio (Tommasini et al., 1998). *AtMHX* (Figura 2.4) es un transportador del tonoplasto que intercambia protones por  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . Está codificado por un solo gen en *A. thaliana* (David-Assael et al., 2005).

Siendo el secuestro de los metales parte esencial del proceso de desintoxicación de la planta, es necesario acelerar la identificación de los transportadores involucrados en esta tarea. Por eso se propone un enfoque proteómico para la identificación de proteínas de membrana de tonoplasto involucradas en la tolerancia a metales pesados. Un estudio proteómico completo se espera que represente un análisis que comprenda todas las proteínas expresadas en un tiempo determinado, bajo condiciones determinadas, en un organismo particular (Barbier-Brygoo & Joyard, 2004). Un estudio subproteómico dirigido al tonoplasto permitiría identificar proteínas que serían poco abundantes en un estudio proteómico general de toda la célula donde no se detectarían y que pudieran estar localizadas en esta membrana.

Además de que el estudio de transportadores de metales pesados ayudaría en el diseño de plantas para fitorremediación, se conocerá más sobre los mecanismos biológicos básicos que están involucrados en estos procesos y las enzimas que forman los pasos limitantes (Pilon-Smits & Pilon, 2002). Así mismo, otra manera de optimizar la tolerancia a metales es identificando genes reguladores que controlen la activación de genes inducidos por metales y sobreexpresarlos (Pilon-Smits & Pilon, 2002), que bien podrían identificarse a través de un estudio subproteómico. Un resumen de los procesos y transportadores vacuolares identificados a la fecha, se presenta en la Figura 2.4.



**Figura 2.4** *Diversos procesos de transporte a través del tonoplasto y la membrana plasmática.*

1 a 2: Bombas de protones. 1 Pirofosfatasa vacuolar (V-PPasa), 2 H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (V- H<sup>+</sup>-ATPasa). 3: Transportador ABC. 3 Subgrupo MRP (MultiResistance Protein) que transporta complejo fitoquelatina-cadmio PC-Cd<sup>2+</sup> (PC: PhytoChelatin). 4 a 7: Antiportadores. 4 *At*MHX, 5 *At*CAX2, M<sup>2+</sup> puede ser Cd<sup>2+</sup>, 6 *At*NHX, 7 *At*CAX1. 8: NRAMPs. 8 *At*NRAMP3. 9: De la familia ZIP. 9 Transportador de hierro de membrana plasmática IRT. 10 a 12 Canales iónicos. 10 Canal *At*TPC1 tipo SV (Slow vacuolar), 11 Canal de malato, 12 Canal FV (Fast vacuolar).

## 2.7 Proteómica de la vacuola

Recientemente varios grupos han iniciado a catalogar proteínas que se localizan en el tonoplasto, usando técnicas de separación tradicionales; incluyendo la purificación de vacuolas por lisis osmótica de protoplastos y centrifugación de microsomas en gradientes de densidad (Szaponarski et al., 2004; Carter et al., 2004 a ; Shimaoka et al.; 2004; Sazuka et al., 2004; Endler et al., 2006; Jaquinod, 2007; Schmidt, 2007). Sin embargo, la identificación de proteínas de origen mitocondrial, de cloroplasto, de retículo endoplásmico y aparato de Golgi, indican que en esos estudios no se pudieron obtener preparaciones puras del tonoplasto. El encontrar proteínas contaminantes, que claramente no son del tonoplasto, causa incertidumbre

sobre si es correcto asignar proteínas desconocidas como pertenecientes a esta membrana y resalta la necesidad del uso de otras técnicas para obtener fracciones suficientemente puras.

Entre los transportadores encontrados en estos estudios proteómicos, se identificó un transportador putativo de  $Zn^{2+}$ , dos transportadores NRAMP que transportan una amplia gama de metales divalentes, un transportador putativo de cobre y transportadores tipo ABC del tonoplasto MRP1 y MRP2 (Carter et al., 2004 a; Shimaoka et al., 2004; Endler et al., 2006).

## **2.8 Regulación por sustrato de los genes de transportadores**

Hirschi (1999) demostró que la expresión de CAX1, a nivel de transcrito, se incrementó más de 12 veces al agregar su sustrato ( $Ca^{+2}$ ) al medio. El aumento fue dependiente de la concentración de  $Ca^{+2}$  agregado. También se ha demostrado que el nivel de transcrito del antiportador vacuolar  $Na^+/H^+$  *AtNHX1* aumenta en la presencia de NaCl, KCl y el regulador de crecimiento de plantas ABA (Ácido abscísico) (Shi & Zhu, 2001). Estos resultados indican que la expresión de transportadores vacuolares puede estar regulada por su sustrato, por lo tanto, se sugiere que se puede encontrar una diferencia en la expresión proteica de los transportadores del tonoplasto entre plantas control y plantas tratadas con metales pesados. Esta diferencia podría dar una nueva perspectiva sobre el funcionamiento y expresión de ciertas proteínas del tonoplasto o proteínas que las regulan, lo que podría ayudar además, en la identificación de nuevos transportadores en esta membrana que jueguen un papel en la tolerancia e hiperacumulación de metales pesados.

## **2.9 *Arabidopsis halleri* y *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo**

*Arabidopsis* es miembro de la familia Brassicaceae que incluye aproximadamente 340 géneros y más de 3350 especies, que viven en un amplio número de hábitats y con diversas condiciones ambientales, incluyendo suelos contaminados con altas concentraciones de

metales pesados (Alonso-Blanco & Koorneef, 2000). Dentro de la familia Brassicaceae se han identificado 11 géneros y 87 especies de plantas hiperacumuladoras de metales (Pollard et al., 2002; Vara & Oliveira, 2003).

Entre la lista de plantas hiperacumuladoras identificadas en sitios contaminados con metales pesados, como representantes del género destaca la presencia de *Arabidopsis halleri*, que es capaz de hiperacumular  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  y exhibe tolerancia a ambos metales (Dräger et al., 2004).

*A. halleri* se considera como una pseudo-metalofita porque se encuentra en lugares contaminados y no contaminados con metales pesados presentando por lo tanto poblaciones metalíferas y no metalíferas. Las poblaciones metalíferas se encuentran sobretodo en Europa central y del este, en países como Alemania, Hungría, etc. y puesto que esta especie se encuentra usualmente en comunidades de suelos contaminados, se usa como indicadora de contaminación por metales pesados (Bert et al., 2000).

Se ha demostrado que *A. halleri* es capaz de acumular más de 10 000  $\mu g Zn g^{-1}$  en base a su peso seco en la parte aérea de la planta (Zhao et al., 2000). La concentración de Zn en las hojas de *A. halleri* es 100 veces mayor que la que se presenta en otras especies como *A. lyrata* y *A. thaliana*. En *A. halleri* se ha demostrado que el Zn se acumula predominantemente en las vacuolas de células del mesófilo de las hojas y en una zona estrecha en forma de anillo en la base de los tricomas (Küpper et al, 2000).

Para el presente estudio se propone el uso de *A. halleri*, debido a su propiedad hiperacumuladora, pues se puede estudiar el efecto tanto de zinc como de cadmio sobre la expresión de proteínas en el tonoplasto. Además, esta planta es una de las plantas más cercanamente emparentada a *A. thaliana*, según estudios filogenéticos que compararon la variación nucleotídica entre secuencias del gen de la chalcona sintasa codificado por el núcleo y el gen *matK* del cloroplasto (Koch et al., 2001). Similarmente, Weber et al. (2004), reportan

que el análisis y comparación de varios cientos de fragmentos de cDNA en un barrido de cDNA-AFLP de ambas especies *A. thaliana* y *A. halleri* mostró una similitud del 94%.

A pesar de las ventajas al utilizar *A. halleri* como una planta modelo en un estudio proteómico de tolerancia a metales pesados como el presente, hay varios obstáculos significativos que deben ser vencidos antes de que esto sea posible. *A. halleri* es una planta de crecimiento lento y de biomasa pequeña, características típicas de una planta hiperacumuladora de metales pesados, que requiere de la polinización cruzada por insectos para reproducirse sexualmente y cuya viabilidad de semillas es baja (Bert et al., 2000). Así, la disponibilidad de semillas y sobrevivencia de la planta son muy bajas y es difícil obtener suficiente material para un estudio proteómico. Por eso, resulta necesario desarrollar un método para propagar esta planta sin necesidad de reproducción sexual y poder obtener la gran cantidad de biomasa requerida para un estudio proteómico de membrana de tonoplasto.

Se puede argumentar que *A. thaliana* sea un modelo más conveniente para este estudio, pues aunque no acumula metales pesados, sí tiene la capacidad de tolerar ciertas concentraciones de zinc. Además de que muchas proteínas que se han demostrado importantes para la tolerancia a metales, ya se han identificado en *A. thaliana* (Kobae et al., 2004; Weber et al., 2004). Entre estas proteínas se incluyen transportadores que parecen compartirse entre *A. thaliana* y *A. halleri*, si bien se expresan a niveles inferiores en la primera (Krämer, 2005 b). Los beneficios de emplear *A. thaliana* son su capacidad de autopolinizarse, su alta producción de semillas y su ciclo de vida mucho más corto que el de *A. halleri*. Además, con el genoma de *A. thaliana* secuenciado (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) y con la gran cantidad de información y recursos disponibles para esta planta, se facilita de manera considerable la identificación de proteínas.

En todo caso, *A. halleri* como planta hiperacumuladora y *A. thaliana* como planta tolerante al zinc, podrían ser una buena fuente de genes involucrados en fitorremediación.

## 2.10 Ventajas de la electroforesis por flujo libre

La meta final de un análisis proteómico de un compartimento subcelular debería ser la identificación exhaustiva de proteínas residentes, excluyendo proteínas de otros compartimentos celulares. Llegar a esa meta depende de la efectividad y confiabilidad del procedimiento de separación del compartimento de interés.

Un método de separación de endomembranas que permite obtener una fracción pura de tonoplasto para poder asignar inequívocamente proteínas identificadas al tonoplasto es la electroforesis zonal de flujo libre (FFZE). El método se basa en la carga superficial de la endomembrana, que es la carga neta de una membrana en función de su contenido proteico particular. Esta técnica se ha aplicado a la separación exitosa de células intactas, organelos y de sistemas membranales y componentes celulares (Hannig & Heidrich, 1974). Brevemente, las diferentes endomembranas son separadas en una capa delgada de buffer y son colectadas en 96 pozos diferentes por el modo de flujo continuo que presenta esta técnica, además se pueden procesar grandes cantidades de material simultáneamente (Canut et al., 1999).

Después de obtener una fracción pura de tonoplasto, las proteínas son separadas en 2 Dimensiones (2-D), inicialmente por su punto isoeléctrico, separando a las moléculas en un gradiente de pH sujeto a un campo eléctrico, que hace que las proteínas migren al pH al que su carga neta es cero.

El uso de métodos tradicionales de enfoque isoeléctrico en gel o gel “strips” tiene como efecto que proteínas membranales permanezcan insolubles o precipiten. Sin embargo, al manipular las condiciones en las que se corre la muestra se pueden prevenir estos problemas. Se utilizan detergentes neutrales o zwitteriónicos para evitar la precipitación de proteínas membranales durante la electroforesis.

### **3. HIPÓTESIS**

La presencia de la concentración máxima tolerada de zinc cambia la expresión proteica del tonoplasto de células del mesófilo de *Arabidopsis*.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

##### **4.1.1 Propagación de *Arabidopsis halleri***

Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *A. halleri* para obtener suficiente biomasa para un eventual estudio proteómico comparativo en la expresión de proteínas del tonoplasto.

##### **4.1.2 Proteómica de *Arabidopsis thaliana***

4.1.2.1 Realizar un estudio comparativo en la expresión de proteínas del tonoplasto de plantas de *A. thaliana* en ausencia y presencia de zinc.

#### **4.2 Objetivos particulares**

##### **4.2.1 Propagación de *A. halleri***

- Ya que la viabilidad y sobrevivencia de *A. halleri* es baja, se pretende obtener callo de hoja para su propagación *in vitro*
- Formular un medio de cultivo para la diferenciación de brotes adventicios sobre callos de *A. halleri*
- Diseñar un medio de cultivo para el enraizamiento de brotes adventicios.
- Establecer condiciones para el cultivo hidropónico de plantas maduras de *A. halleri*

#### **4.2.2 Proteómica de *A. thaliana***

- Obtener una fracción pura de tonoplasto utilizando la técnica de Electroforesis Zonal de Flujo Libre
- Separar las proteínas del tonoplasto por su punto isoeléctrico y por SDS-PAGE
- Analizar la diferencia en el patrón de proteínas utilizando la técnica de Electroforesis en Gel Diferencial (DIGE)
- Seleccionar las proteínas cuya expresión aumente o disminuya en presencia del metal pesado

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Material vegetal**

Las plántulas de *Arabidopsis halleri* se obtuvieron de semillas otorgadas por la Dra. Ute Krämer del Max-Planck Institute for Plant Molecular Physiology en Golm, Alemania. Las semillas fueron esterilizadas con etanol 100% por un minuto, un tratamiento con hipoclorito de sodio (NaOCl) 15% w/v por 15 minutos y enjuagadas con agua milli-Q estéril para remover la solución de esterilización. Las semillas se conservaron a 4°C por 5 días para vernalizarlas. Las semillas esterilizadas y vernalizadas se cultivaron en Metromix 500 en invernadero a 25°C y con un fotoperiodo de aproximadamente 12 horas luz/oscuridad o se pusieron a germinar en tubos Eppendorf con medio Hoagland 0.25X (Hoagland & Arnon, 1938) y agar 0.8%. Después de seis semanas de crecimiento, las plántulas germinadas *in vitro* que sobrevivieron se transplantaron a contenedores hidropónicos de 15 litros (25 plantas por contenedor) con medio Hoagland al 0.25X (Cosio et al., 2004) se transfirieron a tierra (Metromix 500, Sun Gro Horticulture).

Para *Arabidopsis thaliana* se trabajó con la variedad Columbia, usando semillas del stock del laboratorio, tratadas de la manera descrita y sembradas en sustrato Metromix 500.

### **5.2 Propagación vegetativa de *A. halleri***

La propagación vegetativa de la planta, se intentó usando diferentes métodos descritos a continuación.

#### **5.2.1 Estolones**

*A. halleri* presenta crecimiento vegetativo natural, dando lugar a estolones después de aproximadamente 17 semanas de crecimiento. Con ayuda de una navaja, se separó la planta hija ó ramet, se trató con polvo para enraizar comercial (alfanaftilacetamida 0.12% w/w, ácido indol-3 butírico 0.06% w/w, diluyentes 99.82%; Fax, México) y se sembró en sustrato Metromix 500.

### **5.2.2. Enraizamiento de hoja**

Se tomaron hojas saludables de plantas de 7 semanas, se separaron con cuidado de la base del tallo, procurando que parte del tallo principal o de la raíz forme parte de la hoja, el peciolo se trató con polvo para enraizar y se sumergió en medio Hoagland 0.5 X cubriendo el recipiente con papel aluminio para evitar el crecimiento de algas. Una vez que se observó la formación de la raíz, la planta se transfirió a un contenedor de hidroponía para su crecimiento.

### **5.2.3 Propagación por callo (tejido indiferenciado)**

Para la generación de callo, se cortaron hojas con navaja de diferentes plantas de 13 semanas que lucían saludables. Se esterilizó el tejido con etanol 70% v/v por un minuto y se enjuagó con agua MilliQ estéril, luego se trató con hipoclorito de sodio (NaOCl) 1.6% w/v por 10 minutos y se enjuagó cinco veces con agua estéril. Se cortó cada hoja en cuatro partes y se colocó cada uno de estos pedazos en cajas Petri en dos medios diferentes; 1 y 2. El medio 1 consiste en sales MS (Murashige Skoog) (Murashige & Skoog, 1962; Gamborg et al, 1968) y vitamina B5 suplementado con 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2.26  $\mu$ M), 0.1 mg/L de furfuralaminopurina (kinetina) (0.23  $\mu$ M), sacarosa 3% (w/v) y agar 1% (w/v) a pH 5.70 (Vera-Estrella et al., 1992). El medio 2 es el medio 1 suplementado con dos reguladores adicionales del crecimiento de plantas: 0.05 mg/L de 2,4-D (0.226  $\mu$ M) y 0.05 mg/L de BA (6-Bencilaminopurina) (44.38  $\mu$ M) (Dal Corso et al., 2005). Las cajas se conservaron en la oscuridad a una temperatura promedio de 25°C. Después de dos semanas, se cortaron los callos formados por la mitad y se trasplantaron en condiciones estériles a medios frescos. Cada cuatro semanas los callos se transfirieron a medio nuevo.

Para obtener un cultivo de células en suspensión de *A. halleri*, los callos se transfirieron a medio 1 líquido y se incubaron en la oscuridad con agitación continua (110 rpm, 25°C). Las células se transfirieron a medio fresco cada semana (Vera-Estrella et al., 1992).

Para regenerar plantas, primero tiene que observarse la formación de raíces en el callo (Fig. 5.1). Los callos con raíces se transfirieron a medio de regeneración que consiste en medio MS con 2,4-D 2.26  $\mu\text{M}$  y BA 0.044  $\mu\text{M}$ . Para la regeneración de las raíces en los brotes adventicios, se utilizó medio de enraizamiento que contiene sacarosa 1%, 0.5 vitaminas, 0.5X MS y 2,4-D 1.36  $\mu\text{M}$  (Dal Corso et al., 2005) y medio de enraizamiento 2 que consiste en la base de MS con 2,4-D 9  $\mu\text{M}$  (Vera-Estrella et al., 1992).



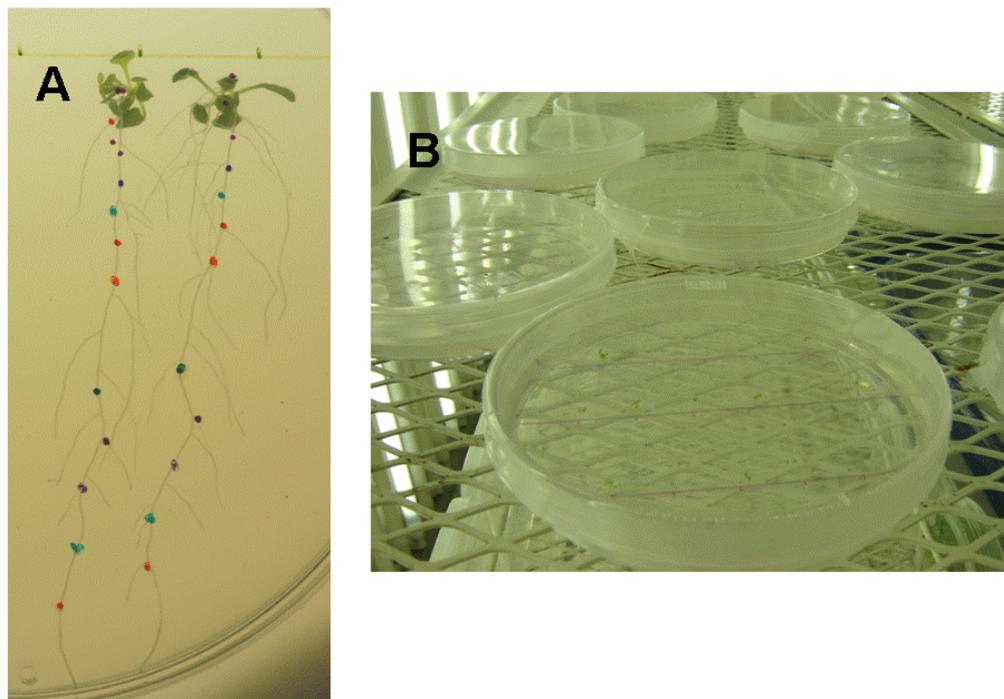
**Figura 5.1** *Formación de raíz en callo de A. halleri.*  
Aparición de raíces con apariencia de pelusa blanca tras crecimiento en medio de regeneración.

### **5.3 Curva de tolerancia a zinc en *A. thaliana***

Se ha determinado que el valor de la tolerancia a un compuesto dado puede asignarse como la concentración más alta a la que todavía se observa alargamiento de la raíz y aumento en la biomasa (Bert et al., 2003). Se germinaron semillas (5 por caja) de *A. thaliana* en agar 1% con 1/10 de medio Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938) sin y con concentraciones crecientes de  $\text{ZnSO}_4$ : 10, 20, 30, 40, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ . Considerando que la concentración real de zinc en una solución compleja depende de la cantidad que esté libre y no de la quelada a ligandos, se determinó la concentración libre de zinc en todos los medios utilizados. Existen reportes de que el EDTA presenta una unión más fuerte al zinc que a otros metales divalentes como  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . El EDTA quela el  $\text{Zn}^{2+}$  libre incluso en la presencia de altas concentraciones de otros cationes divalentes (Nyborg & Peersen, 2004). Como al medio Hoagland se le agrega Fe-EDTA, esto podría afectar la cantidad de zinc libre en solución. Por eso, se utilizó el

programa Geochem 2.0 (Parker et al., 1995), diseñado para calcular equilibrios de especiación para soluciones en sistemas acuosos, en términos de reacciones de formación de pares metal-ligando, es decir, reacciones de asociación de complejos y reacciones de precipitación para sólidos.

Las cajas se mantuvieron en posición vertical en cuarto de crecimiento a 25°C con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad. Diariamente, durante 10 días y entre las 10:00 y 11:00 horas, se midió el largo de la raíz de cada planta (Fig. 5.2 A). Además, se germinaron semillas (16 por caja) en los mismos medios y bajo las mismas condiciones, en cajas Petri en posición horizontal para después de dos semanas de crecimiento obtener el peso fresco de las plantas (Fig. 5.2 B).



**Figura 5.2** Tolerancia de *A. thaliana* a zinc.

- A. Medición diaria del crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* en 0.1X Hoagland, agar 1% y  $\text{ZnSO}_4$  50  $\mu\text{M}$ .
- B. Germinación y crecimiento de *A. thaliana* en 0.1X Hoagland, 1% agar y diferentes concentraciones de  $\text{ZnSO}_4$

Otro método utilizado para analizar el alargamiento de la raíz y así poder confirmar la concentración más alta de  $\text{ZnSO}_4$  que tolera *A. thaliana*, fue el descrito por Schat y Bookum

(1992), para el caso, las raíces de plantas de cuatro semanas de edad transferidas a medio hidropónico, son sumergidas en una solución en agitación constante de carbón activado 2% (w/v) en agua para ser teñidas de negro. Después de la tinción, las plantas se trataron con diferentes concentraciones del metal desde 20  $\mu\text{M}$  a 1.5 mM, evaluando el crecimiento de las raíces nuevas que no tienen una coloración negra. Todos los días entre las 11:00 y 12:00 horas, se midió el largo de la raíz, desde la base hasta la punta. La concentración más alta del metal a la que todavía se observa alargamiento de la raíz se comparó con la determinada por otros métodos para establecer la concentración máxima de tolerancia al zinc (Fig. 5.3).



**Figura 5.3** Raíz de *A. thaliana* tipo silvestre teñida con carbón activado.

Medición diaria del largo de la raíz desde su base hasta la punta. Color negro característico adquirido por la inmersión en carbón activado.

#### 5.4 Aislamiento de membranas microsomales

Como primer paso en la purificación del tonoplasto, se aislaron las membranas microsomales de las hojas de plantas maduras de *A. thaliana*. Las semillas se sembraron en Metromix 500 y después de dos semanas de crecimiento, se trasplantaron a contenedores de hidroponia con

0.5X Hoagland, en el que sobrevivieron más del 80% de las plantas trasplantadas. Independientemente de que hayan sido tratadas con zinc o se hayan mantenido como plantas control, se colectó la parte aérea considerada el lugar donde las plantas hiperacumuladoras secuestran los metales transportados. Las membranas microsomales se aislaron por ultracentrifugación según la metodología propuesta por Barkla y colaboradores (1995). A partir de 30 g de peso fresco (alrededor de 50 plantas) para 300 ml de medio de homogenización para cada preparación microsomal. En total se necesitaron 18 preparaciones microsomales para un solo experimento de separación por FFZE. La parte aérea de las plantas se separó de las raíces con una navaja sobre una placa de vidrio. Se homogenizó en una licuadora Waring por 5 veces en medio de homogenización en intervalos de 20 segundos con descansos de 10 segundos. El medio de homogenización consta de manitol 250 mM, glicerol 10% (w/v), fluoruro de metilfenilsulfonil (PMSF) 1 mM, Tris 30 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0.5% (w/v), EGTA 5 mM, hidroxitolueno butilado (BHT) 1mM, dibucaína 0.05 mM, sulfato de magnesio 5 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, benzamidina 0.9 mM, metabisulfito de potasio 25 mM y polivinilpirrolidona 10 000 (PVP-10) 5% (w/v). El pH se ajusta a 8.0 con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La PVP-10 se adiciona al medio para unir compuestos fenólicos liberados de la vacuola. El EGTA previene la agregación de las membranas y una metales pesados libres. La BSA sirve como sustrato para la actividad de las proteasas. La BHT se adiciona para inhibir la oxidación de lípidos y el PMSF sirve para inhibir la actividad de las proteasas (Barkla et al., 1995).

El homogenizado se pasó por cuatro capas de gasa y se centrifugó a 12 100 g por 20 min en una centrífuga Sorval modelo 5C (Dupont, México) empleando un rotor tipo JA20, para eliminar los restos celulares y los cloroplastos y mitocondrias intactos. El sobrenadante se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman tipo L8-M en un rotor tipo Ti 60 a 100 000 g por 50 minutos a 4° C. Cada pastilla obtenida se resuspendió en 250 µl del buffer de suspensión que consta de manitol 400 mM, glicerol 10% (w/v), Tris/MES (pH 8.0) 6 mM y

DTT 1.3 mM. El pH se ajustó a 8.0 con Tris 6mM. La fracción obtenida de membranas microsomales se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta su uso.

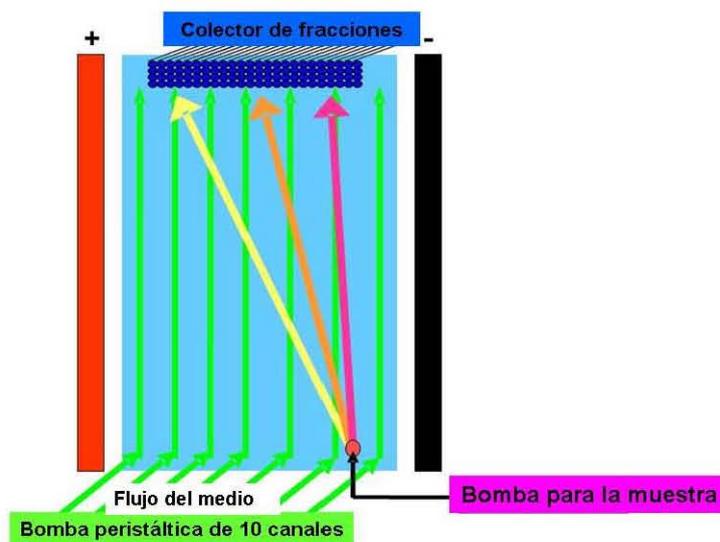
### **5.5 Electroforesis de Zona de Flujo Libre**

La fracción de membranas microsomales se separó por Electroforesis de Zona de Flujo Libre (FFZE) (Becton Dickinson Proteomics, Munich, Alemania) para la obtención del tonoplasto puro, que se ha aplicado exitosamente a la separación de células intactas, organelos y sistemas membranales y componentes celulares (Hannig & Heidrich, 1974).

Para la separación por FFZE, la muestra microsomal se diluyó a la mitad en medio de separación (ver abajo) y se centrifugó a 14 000 g por 20 minutos a 4°C. La muestra (8 mg) se inyectó por flujo continuo (1.2 ml/h) usando la manguera de entrada de muestra anódica. La cámara del FFE tiene 7 mangueras de entrada de medio con las siguientes composiciones de buffer: el buffer de separación TEA 10 mM, ácido acético 10 mM y KCl 2 mM, más sacarosa 250 mM, que se usa en las mangueras 2 a 6 y el medio de estabilización TEA 40 mM, ácido acético 40 mM y KCl 8 mM, más sacarosa 180 mM que es para las entradas 1 y 7. El medio del cátodo para el electrodo negativo está compuesto por TEA 100 mM, ácido acético 100 mM, KCl 20 mM y pH 7.4 con NaOH. El medio del ánodo para el electrodo positivo consiste en TEA 100 mM, ácido acético 100 mM, acetato de potasio 20 mM, formaldehído 0.4% para prevenir la disipación de cloruro por la oxidación anódica y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH. El medio para la contracorriente que es para las entradas C1 a C3 (C es por contracorriente) del aparato, es la misma que el medio de separación.

La electroforesis se llevó a cabo a 750 V (volts) constantes, la tasa de flujo de los medios es de 250 ml/h y la temperatura de la corrida es de 5°C que se mantiene por un flujo continuo de refrigerante debajo de la placa de separación de vidrio de un baño de agua en circulación.

Las fracciones se colectaron continuamente al final de la cámara de separación en un colector de 96 fracciones en placas de ELISA de pozo profundo (4 ml/pozo: ver Figura 5.4), para juntar toda la muestra recolectada y así identificar al tonoplasto, o en placas de ELISA regulares (250  $\mu$ l/pozo), para visualizar y monitorear la separación midiendo la O.D.<sub>280</sub> en un lector de microplacas (Power Wave<sub>x</sub> Select, Bio-Tek Instruments, Inc; Bad Friedrichshall, Alemania).



**Figura 5.4** Representación del método de Electroforesis de Flujo Libre.

Antes de cargar la muestra, se hizo una prueba del equipo usando un colorante, sal trisódica de ácido 2-(4-Sulfofenilazo) 1,8-dihidroxi-3,6-disulfónico de naftaleno (SPADNS) inyectado en las entradas para medio 2, 4 y 6 que debe producir una raya rojiza que no tenga más de 15 pozos poco profundos de ancho con claras líneas de división transparentes entre cada una de las bandas de coloración. Lo anterior confirma el correcto flujo laminar en la cámara de separación y asegura la ausencia de burbujas o fugas dentro de la misma.

Después de la separación, cada fracción colectada en la placa de ELISA de pozo profundo se juntó con la misma fracción de otras placas (en total se colectan las fracciones de 6-7 placas que resultan en un volumen final aproximado de 30 ml por fracción). Las fracciones recolectadas se centrifugaron a 100 000 g por 45 minutos en un rotor tipo 52.2 en

una ultracentrífuga Beckman tipo L8-M. La pastilla se resuspendió en 50 µl de medio de suspensión (ver sección 5.4) y la proteína se congeló a -80°C hasta su uso.

### **5.6 Determinación de proteína y concentración de la muestra**

El contenido proteico de las fracciones se midió por una modificación al método de unión al colorante (Bradford, 1976) en el que la proteína de membrana se solubiliza parcialmente con 0.5 % (v/v) de Tritón X-100 por 5 minutos antes de la adición de la solución Bradford concentrada (Bio-Rad, México). Se utiliza como estándar BSA y se mide la absorbancia a 595 nm.

La proteína (30 µg) se precipitó diluyendo la muestra 50 veces en etanol:acetona 1:1 (v/v) incubándose toda la noche a -30 °C según el método de Parry et al. (1989). Las muestras se centrifugaron a 13 000 g por 20 minutos a 4 °C en un rotor F2402 en una centrífuga de mesa modelo GS-15R (Beckman, México). Las pastillas se secaron al aire y se resuspendieron con buffer de Laemmli (1970) con concentración final de SDS (Dodecil sulfato de sodio) (2.5% [w/v]) para someterse a la electroforesis.

### **5.7 Análisis por western blot de las fracciones separadas por FFZE**

Para identificar las fracciones en donde se encuentra el tonoplasto puro, se hizo un análisis por western blot. La solución de proteína se calentó a 60°C por 2 minutos y se cargaron las muestras (15 µg/pozo) en mini-geles lineales de acrilamida 10% (w/v). La electroforesis se corrió a 200 V por 45 minutos a 4°C en una cámara de electroforesis extra ancha (Scie-Plas Ltd., Warwickshire, U.K.). Los geles se prepararon para la transferencia incubándolos en buffer de transferencia (metanol 25% (v/v), Tris 0.025 mM, glicina 0.192 mM). Las proteínas en el gel se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (ECL, Amersham, U.K.) con un voltaje constante de 100 V por 75 minutos. Después, las membranas se tiñeron con Ponceau S 0.1% en ácido acético 5% (v/v) para visualizar las proteínas y

marcar la posición de los marcadores de peso molecular. Las membranas se bloquearon con TBS (Tris 100 mM, NaCl 150 mM) con azida de sodio 0.02% (w/v) y de leche en polvo libre de grasa (Carnation) 5% (w/v) por 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas bloqueadas se incubaron por un mínimo de 3 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios correspondientes, después se les agregó una dilución 1:5000 de anticuerpos secundarios (de cabra anti-conejo o –ratón) conjugados con peroxidasa de rábano. La inmunodetección se llevó a cabo usando el sistema de análisis ECL de western blotting quimioluminiscente (Amersham).

La fracción que corresponde al tonoplasto se identificó usando proteínas marcadoras para las diferentes endomembranas. Para el tonoplasto, se usó AVP1, la V-PPasa de tonoplasto que trasloca  $H^+$  (Parry et al., 1989). Para membrana plasmática se utilizó la proteína AHA3, una  $H^+$ -ATPasa tipo P (Parets-Soler et al., 1990). El retículo endoplásmico se detectó con calreticulina, CRT1 (Nelson et al., 1997) y el aparato de Golgi con RGP1 (Dhugga et al., 1997), una proteína glicosilada reversible. Las fracciones de FFZE correspondientes al tonoplasto, libres de la presencia de otras membranas, se juntaron para tener toda la muestra correspondiente al tonoplasto puro.

### **5.8 Enfoque isoeléctrico de tonoplasto puro usando tiras de IPG**

La muestra de tonoplasto puro, obtenida por FFZE, se limpió con el ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BioRad, Hercules, CA, USA), para remover sales y compuestos fenólicos siguiendo las instrucciones del proveedor y poder así separar las proteínas según su pI. Si solamente se quiere separar a las proteínas en su primera dimensión, la pastilla proteica se resuspende en 200  $\mu$ L de buffer de rehidratación, que contiene urea 7 M, tiourea 2 M, detergentes CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato) ó ASB-14 (amidossulfobetaina-14) 2% ó 4% (w/v) como se indica, DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lyte 0.2% (w/v) (BioRad, Hercules, CA, USA) y azul de bromofenol 0.002% (w/v). Si la muestra va a ser analizada por

DIGE, la pastilla se resuspende en 30  $\mu$ L del mismo buffer adicionado con Tris (pH 8.5) 10 mM sin el DTT ni los anfolitos, que contienen aminas primarias que interferirían con el marcaje de las proteínas con los fluoróforos. Se marca con los fluoróforos CyDye como se describe en la sección 5.9, se agrega el mismo volumen (30  $\mu$ l) del buffer con la concentración de DTT y anfolitos 2X, para tener la concentración final correcta, y se agregan 140  $\mu$ l del buffer 1X para tener un volumen final de 200  $\mu$ l requerido para rehidratar la tira de IPG.

La muestra se cargó en el pozo para electroforesis de IPG (Protean IEF Cell, BioRad, Hercules, CA, USA) y una tira de 11 cm., pH 3 a 10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) se coloca encima de la muestra con el gel viendo hacia abajo, asegurándose que no queden burbujas de aire atrapadas debajo del gel. Encima de la tira se distribuyeron 1.5 ml de aceite mineral para prevenir la evaporación de la muestra durante la rehidratación. La rehidratación activa de la tira IPG en gel fue de 16 horas a 50V. Antes de realizar el enfoque, un pedacito de papel filtro mojado se insertó entre cada electrodo y la tira IPG, para prevenir la formación de sales en exceso en el electrodo. El enfoque isoeléctrico se llevó a cabo usando un programa de enfoque de 3 pasos que consiste en 250 V por 20 minutos, 10 000 V por 2.5 horas y finalmente 10 000 V por 40 000V/h con una rampa de voltaje rápida. Las tiras del IEF se incubaron en buffer de equilibrio (urea 6M, SDS 2%, glicerol 20%, Tris-HCl, pH 8.8 50 mM), primero adicionándole DTT 2% (w/v) por 10 minutos en agitación para reducir las cisteínas, y después yodoacetamida 2.5% (w/v) por 10 minutos para alquilar las cisteínas y minimizar el barrido vertical en la segunda dimensión. Las tiras se lavaron con buffer de corrida SDS-PAGE (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%).

Las tiras IPG se colocaron por encima de un mini-gel extra ancho de acrilamida 10% (Scie-Plas, U.K.) y la electroforesis en segunda dimensión se hizo como se describió anteriormente. Después del SDS-PAGE, los geles se fijaron en etanol 40% (v/v), ácido

acético glacial 10% (v/v) en un volumen de 125 ml por cada gel y se tiñen con plata Dodeca de BioRad (Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del manual.

## 5.9 Electroforesis en gel diferencial (DIGE)

La fracción pura de tonoplasto, confirmada por el western blot, se etiquetó con marcadores fluorescentes CyDyes (Amersham Biosciences) y se analizó por DIGE según el esquema experimental, presentado en la Figura 5.5.

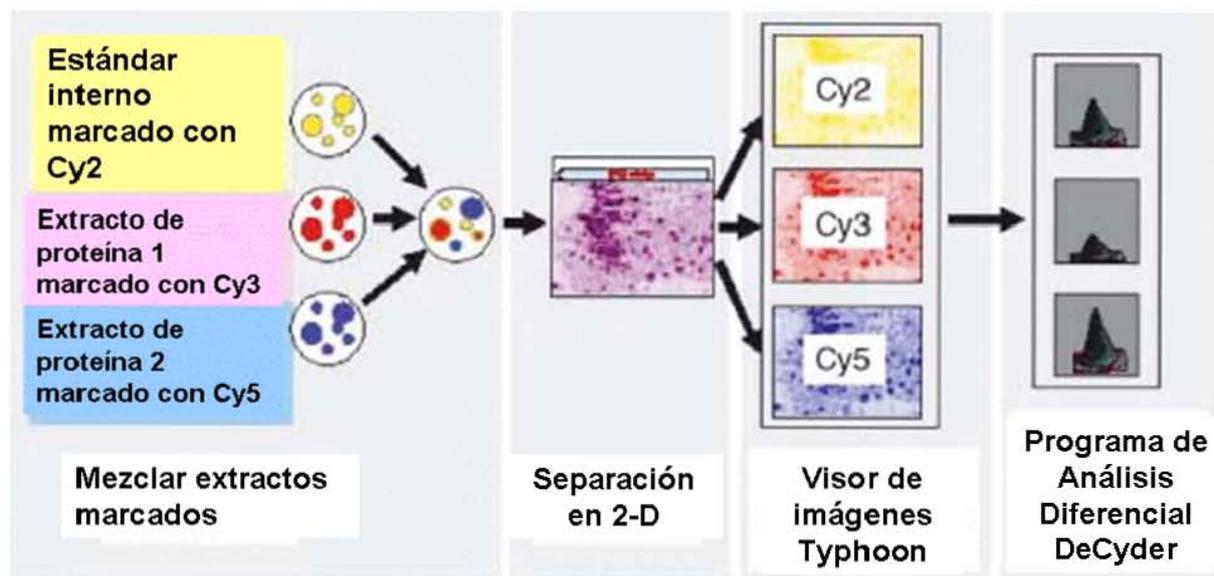


Figura 5.5 Método de 2D-DIGE (Modificado de Hawkins et al., 2005)

### 5.9.1 Reconstitución de los fluoróforos CyDyes y preparación de la solución de trabajo

Los fluoróforos CyDye (Cy2, Cy3 y Cy5) se reconstituyeron en dimetilformamida (DMF). Se agregaron 5  $\mu$ l de DMF al tubo para tener una concentración final de 1 mM de fluoróforo. Se agitó en un "vórtex" por 30 segundos y se centrifugó por 30 segundos a 12 000 g en una microcentrífuga. El fluoróforo debe usarse inmediatamente o almacenarse inmediatamente a -30° C para su uso posterior. Para preparar la solución de trabajo, cada uno de los fluoróforos, se diluyó con DMF, para obtener una concentración final de 300 pmoles/ $\mu$ l.

### 5.9.2 Fluoróforos CyDye para marcaje de proteínas

Las proteínas se marcaron con los fluoróforos CyDye de la siguiente manera: 35 µg de proteína en buffer de lisis (Tris 30 mM, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, ASB-14 2%, pH 8.5) se mezclaron con 210 pmoles del fluoróforo apropiado (Tabla 5.2) para mantener una relación de 1 µg de proteína/6 pmoles de fluoróforo CyDye. Los tubos se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga y se dejaron en hielo por 30 minutos en la oscuridad. Se agregó 1 µl de una solución de lisina 10 mM para detener la reacción porque los marcadores reaccionan con el grupo ε de las lisinas presentes en la proteína y se dejó en hielo por 10 minutos en la oscuridad. Las muestras pueden ser guardadas a -70°C en la oscuridad hasta por 3 meses (Lilley, 2002).

**Tabla 5.1** Diseño experimental para DIGE de 3 muestras independientes de plantas de *A. thaliana* control y plantas tratadas con zinc 200 µM.

Gel #	Fluoróforo		
	Cy3	Cy5	Cy2
1	Control 1 (35 µg)	Zinc 1 (35 µg)	Estándar interno*(35 µg)
2	Zinc 2 (35 µg)	Control 2 (35 µg)	Estándar interno*(35 µg)
3	Control 3 (35 µg)	Zinc 3 (35 µg)	Estándar interno*(35 µg)

\*(5.83µg C1 + 5.83µg C2 + 5.83µg C3 + 5.83µg Z1 + 5.83µg Z2 + 5.83µg Z3)

El estándar interno, presente en todos los geles está hecho de una alícuota equivalente de proteínas de cada uno de las muestras control y tratadas de tres experimentos independientes como se indica en la Tabla 5.1.

Las fracciones marcadas con fluoróforos que corresponden a cada uno de los geles, como se señala en la Tabla 5.2, se colectaron conjuntamente para dar una concentración final de proteína en el gel de 105 µg (35 µg de proteína para cada fluoróforo).

### **5.9.3 2D-PAGE del tonoplasto marcado con fluoróforos CyDye**

Las proteínas de tonoplasto purificadas por FFZE y marcadas con los fluoróforos CyDyes para el DIGE, se sometieron a IEF usando tiras de IPG (Immobilized pH gradient) y la celda BioRad Protean IEF (BioRad, Hercules, CA, USA) de la manera descrita.

Después del enfoque isoeléctrico, las tiras de gel se enjuagaron en buffer de corrida (1X), para remover el aceite mineral, y se llevó a cabo la segunda dimensión en SDS-PAGE en un aparato de electroforesis Ettan Dalt Six (22 cm. x 27 cm.) (Amersham Biosciences, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se prepararon los vidrios de baja fluorescencia lavándolos en 2.5% de KOH en metanol por una hora, se enjuagaron en agua y se secaron con una toalla libre de pelusas. Para asegurar que el gel se adhiriera a la superficie de uno de ellos, los vidrios sin separadores se trataron con una solución de Bind-Silane (8 ml de etanol, 200  $\mu$ l de ácido acético glacial, 10  $\mu$ l de Bind-Silane y 1.8 ml de agua milli-Q) y se secaron al aire por una hora en condiciones libres de polvo.

Las tiras de gel IPG se colocaron sobre geles PAGE para la segunda dimensión y se sellaron con una solución de agarosa de bajo punto de fusión (agarosa 0.2% en buffer de corrida 1X con granos de azul de bromofenol para poder visualizar el frente del gel). Los geles se corrieron por una hora a 10 mA de corriente constante/gel, 80 V y 1 W/gel para permitir que las proteínas en las tiras IPG entren al gel de SDS lentamente, seguido de 5-8 horas a 30 mA/gel a 500 V y 13 W/gel hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel.

### **5.9.4 Adquisición y Análisis de Imágenes**

Para generar las imágenes de los geles se usó el digitalizador Typhoon (GE LifeSciences, USA). Cada gel se escaneó 3 veces a cada una de las longitudes de onda de excitación y emisión que corresponden a cada fluoróforo (Tabla 5.2). Las imágenes se compilaron en un solo archivo para el análisis usando el programa de Análisis de Imágenes DeCyder (Versión 5.0, GE LifeSciences, USA).

**Tabla 5.2.** Longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos CyDyes para DIGE.

<b>CyDye</b>	<b><math>\lambda</math> máxima de excitación nm</b>	<b><math>\lambda</math> máxima de emisión nm</b>
Cy2	480	530
Cy3	540	590
Cy5	620	680

Las imágenes adquiridas se importaron al programa DeCyder, usando primero el módulo DIA o análisis diferencial en gel, para unir las imágenes de los tres fluoróforos de cada gel y para detectar las fronteras de cada spot que corresponde a una proteína. Esta parte del análisis también es útil para sustraer el ruido de fondo y para normalizar el volumen del spot por la abundancia de la proteína, co-detectando los spots marcados con cada uno de los fluoróforos. Primero se hizo un filtrado general donde se buscaron parámetros que correspondieran a las características de la mayoría de los spots y eliminar los que no eran de origen proteico. Después se hizo un filtrado manual, eliminando más finamente fuentes no proteicas como polvo o rayones del gel. El siguiente paso se hizo en el módulo BVA o de análisis de variación biológica del DeCyder, para calcular estadísticamente diferencias cuantitativas entre los diferentes geles. Esto es posible debido a la presencia del estándar interno etiquetado con Cy2 presente en cada uno de las tres réplicas por gel. El empalme de los geles se hizo de forma manual buscando y alineando spots entre las diferentes imágenes de los estándar internos que coincidieron claramente. El análisis estadístico, incluyendo la prueba en pares de t-Student, que indicó cuántas veces cambió la expresión de una proteína, ya sea aumentado o disminuido, con un grado de confiabilidad de alrededor del 90%.

Los spots seleccionados fueron aquellos que se encontraron claramente definidos en el gel y cuya expresión cambió con respecto al control al menos más de una vez con una confiabilidad del 98% ( $p < 0.02$ ), como ha sido reportado (Hajduch et al., 2001). Con los

spots seleccionados se hizo una lista, donde se especifican las coordenadas de cada spot y las de los marcadores de referencia, unas calcomanías redondas que se pegan en el vidrio que se trata con Bind Silane antes de vaciar el gel y donde irá pegado el gel.

Para asegurar que la muestra podrá ser utilizada para espectrometría de masas o por si es necesario hacer un gel preparativo con mayor concentración de proteína para el análisis, el gel desnaturizante de segunda dimensión, se tiñe con el colorante azul de Coomassie de la siguiente manera: se fija el gel en 300 ml de TCA 12% por una hora, se remueve el TCA y se agregan 500 ml/gel de la solución de tinción de Coomassie, en agitación suave toda la noche y se enjuaga por 5 minutos máximo en metanol 25% para limpiar la superficie. El gel se puede guardar en agua desionizada a 4°C.

La solución stock de tinción, se preparó disolviendo 15 g de Coomassie G250 (Serva blue G) en 375 ml de ácido acético 7.5% (v/v) a 70°C. Se agrega lentamente sulfato de amonio en agitación hasta que la solución se vuelve transparente (aproximadamente 30% (w/v) de sulfato). Se deja enfriar a temperatura ambiente, se desecha el sobrenadante y se disuelve el sólido que permanece en la base del recipiente en 150 ml de etanol 50% y ácido acético 10%. Simultáneamente, se prepara una solución salina ácida (ácido ortofosfórico 3% (v/v), sulfato de amonio 6%). La solución stock de Coomassie se diluye en la anterior en una proporción 1:100 se mezcla y se usa inmediatamente.

El gel preparativo también se puede teñir con el colorante fluorescente Sypro Ruby (GE-Amersham), para ser escaneado en el Typhoon y sobrelapado con los geles obtenidos del DIGE. Para ello, se fija el gel en una solución de metanol 40% y ácido acético glacial 10% por una hora, se embebe en la solución de Sypro Ruby (500 ml/gel) en una charola de plástico, al menos por tres horas en agitación leve, se lava el gel en una solución metanol 10%, ácido acético glacial 7% por una hora y si se desea se puede conservar hasta por 6 meses en glicerol 2%.

Las proteínas de interés fueron cortadas con el ETTAN Spot Cutter automatizado (GE-Lifesciences, México) de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología-UNAM. El aparato se calibró siguiendo las instrucciones de proveedor para darle coordenadas en los ejes X, Y y Z, para que el corte sobre el gel sea lo más exacto posible. También se verificó que la cabeza del picador tuviera las coordenadas correctas de la ubicación de las microplacas donde deposita el spot cortado y del anillo de limpieza. Los parámetros utilizados para el picador fueron:

**Tabla 5.3** Parámetros para el picador ETTAN Spot Cutter automatizado

Jazz	1.1 mm
Volumen de Prellenado	150 $\mu$ l
Volumen de Aspirado	50 $\mu$ l
Volumen Eyectado	200 $\mu$ l
Volumen de Enjuague	500 $\mu$ l
Flujo de Aspirado	20 ml/min
Flujo de Eyección	30 ml/min
Veces que se limpia la cabeza del picador entre cada spot	2

La lista de spots para picar del Decyder se cargó en el programa del cortador indicando las coordenadas de cada spot. Cada spot se guardó en un Eppendorf rotulado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la espectrometría de masas, lo que constituye la continuación de este proyecto que está en proceso.

De este análisis subproteómico cuya meta es estudiar el cambio en la expresión de las proteínas del tonoplasto en la presencia de metales pesados, se espera identificar nuevas proteínas que jueguen un papel importante en la tolerancia a metales pesados.

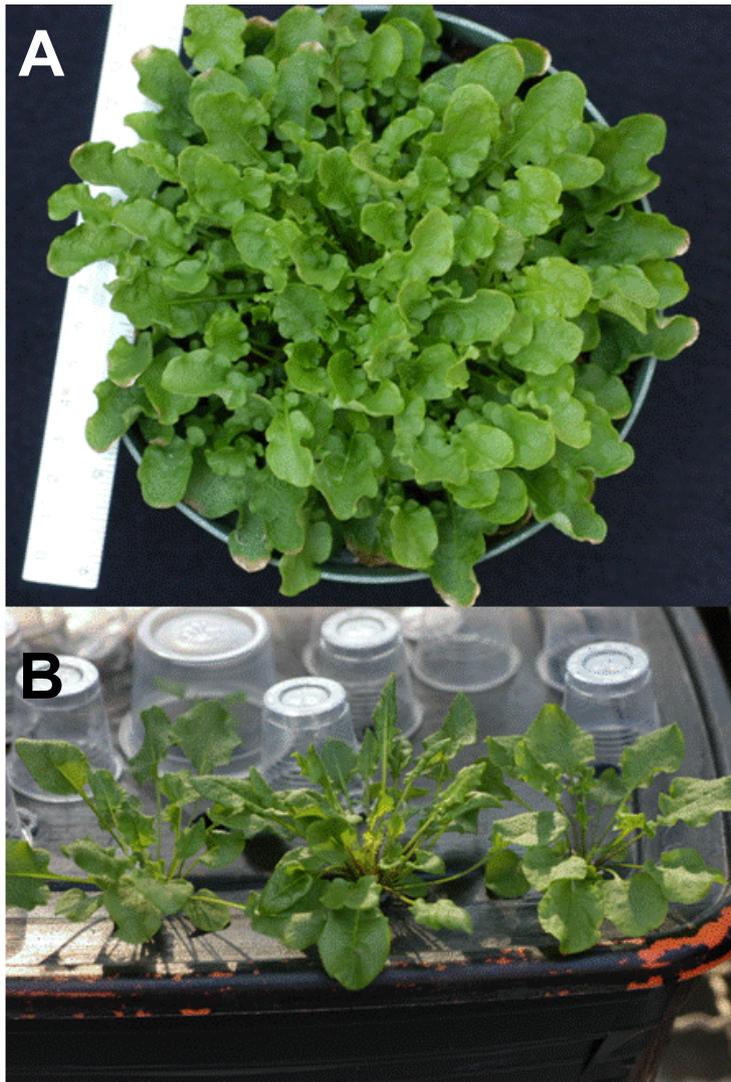
## 6. RESULTADOS

### Sección 1. PROPAGACIÓN DE *Arabidopsis halleri*

*A. halleri* es una planta de crecimiento lento y de biomasa pequeña, características típicas de una planta hiperacumuladora de metales pesados, además, requiere de la polinización cruzada por insectos para reproducirse sexualmente y la viabilidad de semillas es baja. Para la separación de membranas por Electroforesis de Zona de Flujo Libre (FFZE) y el análisis proteómico subsiguiente, se requiere una gran cantidad de material vegetal inicial: para una corrida se usan 8 mg de proteína microsomal que representa alrededor de 480 a 500 plantas. Para poder superar dichos atributos negativos de propagación, se puede explotar la habilidad de esta planta de poder propagarse de manera vegetativa, clonal y así aumentar la producción de material vegetal. En este estudio se analizaron varias técnicas de propagación para determinar cuál de ellas tiene la habilidad de generar la mayor cantidad de material vegetal en el periodo de tiempo más corto.

#### 6.1 Germinación y sobrevivencia de *A. halleri*

Para identificar el métodos de propagación cuya producción de material vegetal fuera suficiente para la continuación del proyecto, como primer método se emplearon semillas esterilizadas y vernalizadas de *A. halleri* sembradas directamente en suelo, las cuales mostraron una tasa de germinación de 70%, por su parte, semillas que germinaron en tubos Eppendorf en 0.25X Hoagland y agar 0.8%, mostraron una tasa de germinación de 93.3%. Esta diferencia podría deberse a la alta humedad relativa que se mantiene dentro del tubo y para todo trabajo futuro, se germinaron las semillas en tubos. Las plántulas germinadas en cualquiera de las dos condiciones, se transfirieron a un medio hidropónico o al suelo después de 7 semanas de crecimiento y sobrevivió el 70% de las plantas transferidas. Las plantas que se cultivaron en suelo, crecieron más rápido y eran más grandes que las que crecieron en hidroponia (Fig. 6.1).



**Figura 6.1.** *Crecimiento de A. halleri en suelo vs. medio hidropónico*

Se muestran plantas de *A. halleri* de 16 semanas de crecimiento germinadas en:

**A** Metromix 500 estéril. **B.** 0.25X Hoagland y 0.8% agar y transferidas después de 8 semanas a cultivo hidropónico.

### 6.1.1 Reproducción por Estolones

Otro de los métodos que se establecieron para la reproducción de *A. halleri* fue la reproducción vegetativa por estolones. Las plantas adultas de *A. halleri* se propagan naturalmente de manera vegetativa a través de la producción de pequeños estolones que emergen del tallo principal y que pueden ser observados dentro del follaje maduro de la planta donadora después de 17 semanas de crecimiento (Fig. 6.2 A). Estas pequeñas plantas son clones de la planta adulta que pueden ser removidas y plantadas directamente en tierra. Cada planta madura produce de 4 a 5 estolones y su sobrevivencia es del 60% (Fig. 6.2 B).

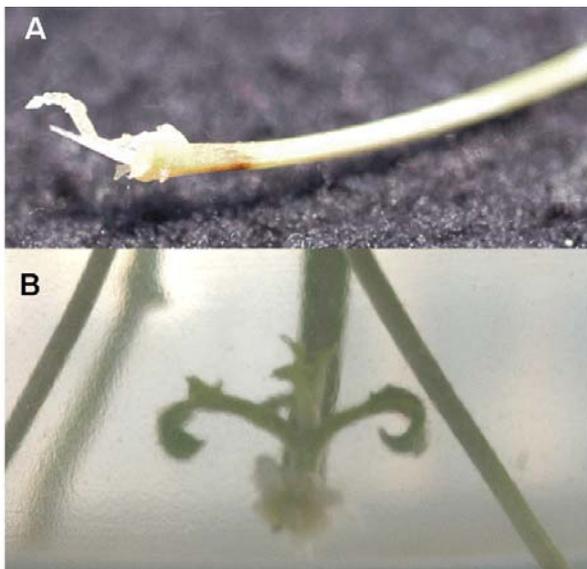


**Figura 6.2.** Propagación de *A. halleri* por enraizamiento de estolones.

**A.** Brote lateral sobre la planta donadora. **B.** Planta hija obtenida por la remoción del estolón y enraizamiento en Metromix 500.

### 6.1.2 Enraizamiento de hoja

Otra manera de generar plantas de forma vegetativa fue removiendo hojas maduras de la base del tallo principal e induciendo la formación de raíces a través de la aplicación de reguladores de crecimiento de plantas en la base de la hoja. Las hojas tratadas de esta manera se cultivaron en hidroponía hasta que emergieron raíces de la planta (Fig. 6.3 A), seguida de la generación de pequeñas plántulas en la base del tallo de la hoja. Este método fue el menos exitoso con un porcentaje de enraizamiento de hoja del 20% y una sobrevivencia del 10% (Fig. 6.3 B).

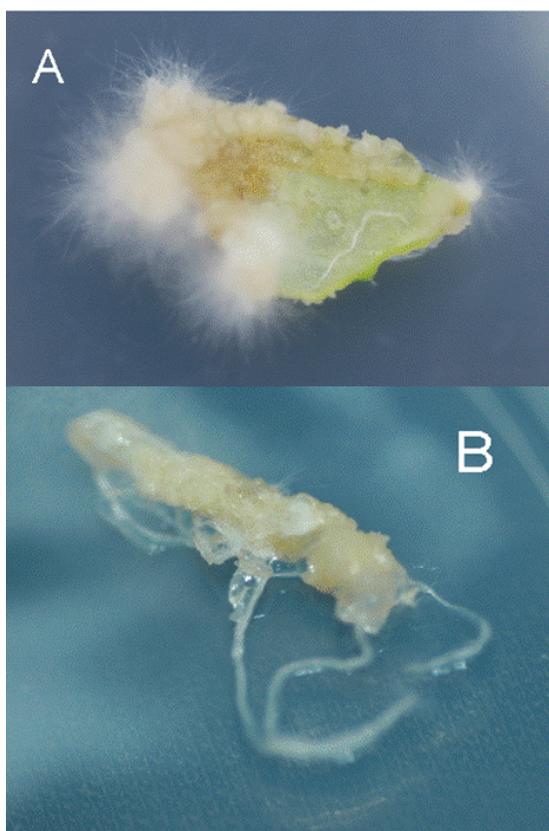


**Figura 6.3** Regeneración de plantas de *A. halleri* a partir de hojas adultas.

**A.** Hoja de *A. halleri* con desarrollo de raíz por tratamiento con medio para enraizar como se describe en Metodología. **B.** Planta que se desarrolló en la base de la hoja tratada para enraizar.

### 6.1.3 Propagación *in vitro*

Una cuarta manera de generar más plantas de *A. halleri* fue a través de la regeneración *in vitro* a partir de callos derivados de la hoja y la subsiguiente diferenciación del callo para formar raíces y brotes. Explantes de hojas de plantas adultas fueron esterilizados superficialmente y sembrados en dos medios diferentes para inducir la formación de callo. Ambos medios fueron exitosos en la formación de callo, después de 2 semanas de incubación aproximadamente el 80% de los explantes de hoja produjeron callo. Sin embargo, el medio con 2,4-D y BA (Sección 5.2.3) produjo callos más friables, que pudieron usarse para obtener cultivo de células en suspensión de *A. halleri*. El callo lució suave y fragmentado con una coloración amarilla pálida y presentó primordios de raíz después de 4 semanas (Fig. 6.4 A), que 5 semanas más tarde se diferenciaron claramente en raíces (Fig. 6.4 B).

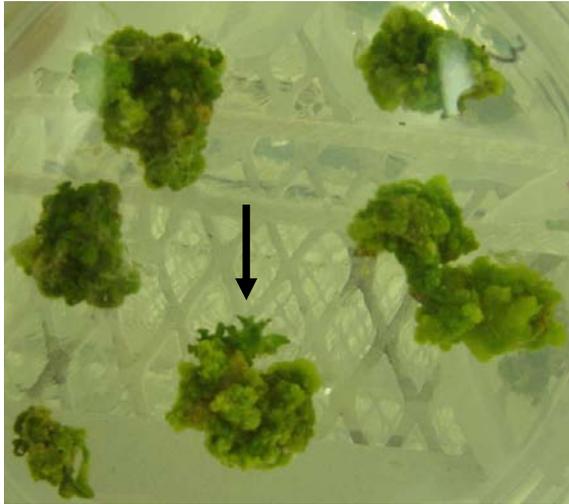


**Figura 6.4** Cultivo *in vitro* de callos foliares de *A. halleri*.

**A.** Crecimiento de callo y aparición de raíces después de 4 semanas de cultivo en medio con 2,4-D y kinetina a 25°C en la oscuridad. **B.** Diferenciación de raíces después de 9 semanas de haber inducido los callos.

Después de ocho semanas de cultivo, los callos friables se transplantaron a medio de regeneración y se mantuvieron en el cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 8/16 horas luz/oscuridad, para inducir el desarrollo de brotes fotosintéticos. Después de quince días, el

60% de los callos presentó pequeños brotes (3 por callo) e incluso algunos presentaron hojas, como se muestra con una flecha en la Figura 6.5.



**Figura 6.5** Callos de *A. halleri* en medio de regeneración

Callos de color amarillento y apariencia fragmentada, se expusieron a luz en medio de regeneración (MS, agar 1%, sacarosa 3%, 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D y 0.044  $\mu\text{M}$  de BA). Se obtuvieron callos de coloración verde con pequeñas plántulas en desarrollo (flecha).

Después de 4 semanas de cultivo, los brotes se transfirieron a medio de enraizamiento (Fig. 6.6), para estimular el desarrollo de raíces. El 90% de los brotes enraiza con éxito.



**Figura 6.6** Brotes adventicios de *A. halleri* en medio de enraizamiento.

Medio MS sólido (agar 1.5%) con sacarosa 1% y 1.36  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

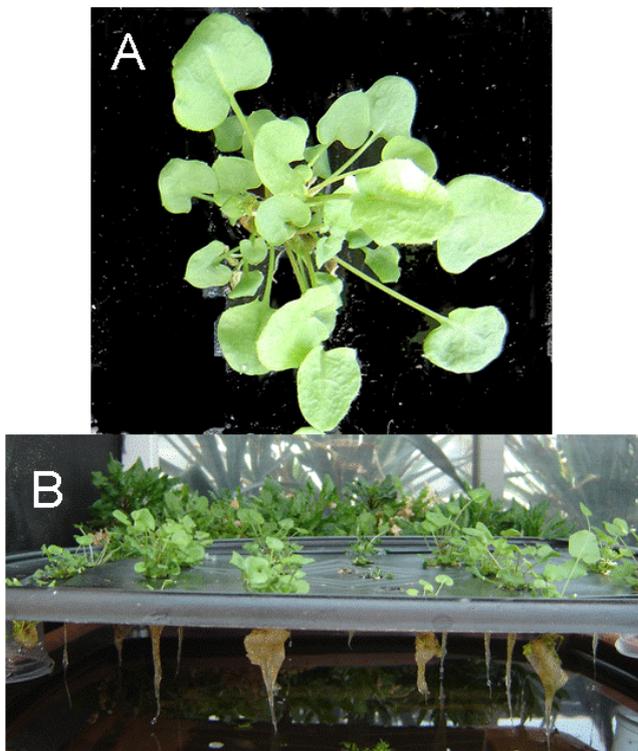
El mejor método de propagación de plántulas de *A. halleri* resultó el uso secuencial de los siguientes medios:

1. Sales de MS, complementado con vitamina B5, sacarosa 3%, agar 0.7% y 2.26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 0.23  $\mu\text{M}$  de kinetina por cinco semanas.
2. Sales de MS complementado con vitamina B5 con 2.26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 0.044  $\mu\text{M}$  de BA por ocho semanas.

3. 0.5X medio sales de MS, 0.5X vitaminas, 1% sacarosa y 1.36  $\mu$ M de 2,4-D por cuatro semanas.

Para su mantenimiento *in vitro*, los callos son transferidos a medio fresco cada 4 semanas.

Las plántulas regeneradas *in vitro* de *A. halleri* fueron transferidas a cultivos hidropónicos, sobreviviendo el 65% de ellas, donde han tenido un desarrollo y crecimiento favorable (Fig. 6.7).



**Figura 6.7.** *Plantas regeneradas in vitro de A. halleri.*

**A.** Planta regenerada *in vitro* en cultivo hidropónico con 0.5X Hoagland después de 2 semanas de transplante.

**B.** Plantas de *A. halleri* regeneradas *in vitro* en cultivo hidropónico, se muestra el desarrollo de un extenso sistema radicular.

A la fecha, una de las plantas regeneradas *in vitro* ha producido una inflorescencia (Figura 6.8), demostrando la viabilidad de la técnica de propagación *in vitro*. Desafortunadamente, como *A. halleri* es una especie de polinización cruzada, no se obtuvieron semillas de esta plántula.



**Figura 6.8.** *Planta madura de A. halleri regenerada in vitro.*

Los resultados muestran que la reproducción de *A. halleri* a través de la generación de callos derivados de hojas es un método exitoso que nos permitirá continuar con el estudio proteómico de su tonoplasto y la posible identificación de proteínas de transporte involucradas en el secuestro de metales pesados dentro de la vacuola de los órganos aéreos de la planta. Si bien el método de propagación *in vitro* es viable, debe puntualizarse que es un proceso extremadamente lento, tomó desde el comienzo hasta el final aproximadamente 14 meses.

## Sección 2. PROTEÓMICA DE *Arabidopsis thaliana*

### 6.2 *A. thaliana* como planta sustituta

Ya que el desarrollo de *A. halleri* es muy lento y no se ha obtenido suficiente material para el aislamiento del tonoplasto, se decidió emplear a *A. thaliana*, como especie sustituta. Aunque *A. thaliana* no es una hiperacumuladora de metales, se ha demostrado que presenta cierta tolerancia al zinc y que expresa varios transportadores reportados para conferir tolerancia a metales en *A. halleri* (Krämer, 2005 b). Además, *A. thaliana* puede cultivarse fácilmente en cultivo hidropónico, alcanzando la madurez en 6 semanas comparada con 18 semanas para *A. halleri* (Fig. 6.9) y se reproduce sexualmente por autopolinización produciendo un gran número de semillas en un periodo de tiempo corto.



**Figura 6.9** Crecimiento de *A. thaliana* en cultivo hidropónico.

Plantas de 4 semanas en un contenedor hidropónico con 0.5X Hoagland, transplantadas después de 4 semanas de crecimiento en Metromix 500.

### 6.3 Tolerancia de *A. thaliana* al zinc

El objetivo de este estudio es la identificación de proteínas del tonoplasto que son importantes para la tolerancia a metales pesados. Fue necesario determinar la máxima concentración de un metal pesado que aún permitiera el crecimiento de *A. thaliana*. Por ello se determinó la cantidad de zinc libre se hizo con el programa GeoChem 2.0 (Parker et al., 1995), los valores que se obtuvieron se presentan en las Tablas 6.1 y 6.2, según la dilución del medio Hoagland empleada en los experimentos.

**Tabla 6.1.** Cálculo del zinc libre en solución en un medio 1/10 Hoagland suplementado con concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub> con el uso del software GeoChem-PC Versión 2.0 (Parker et al., 1995).

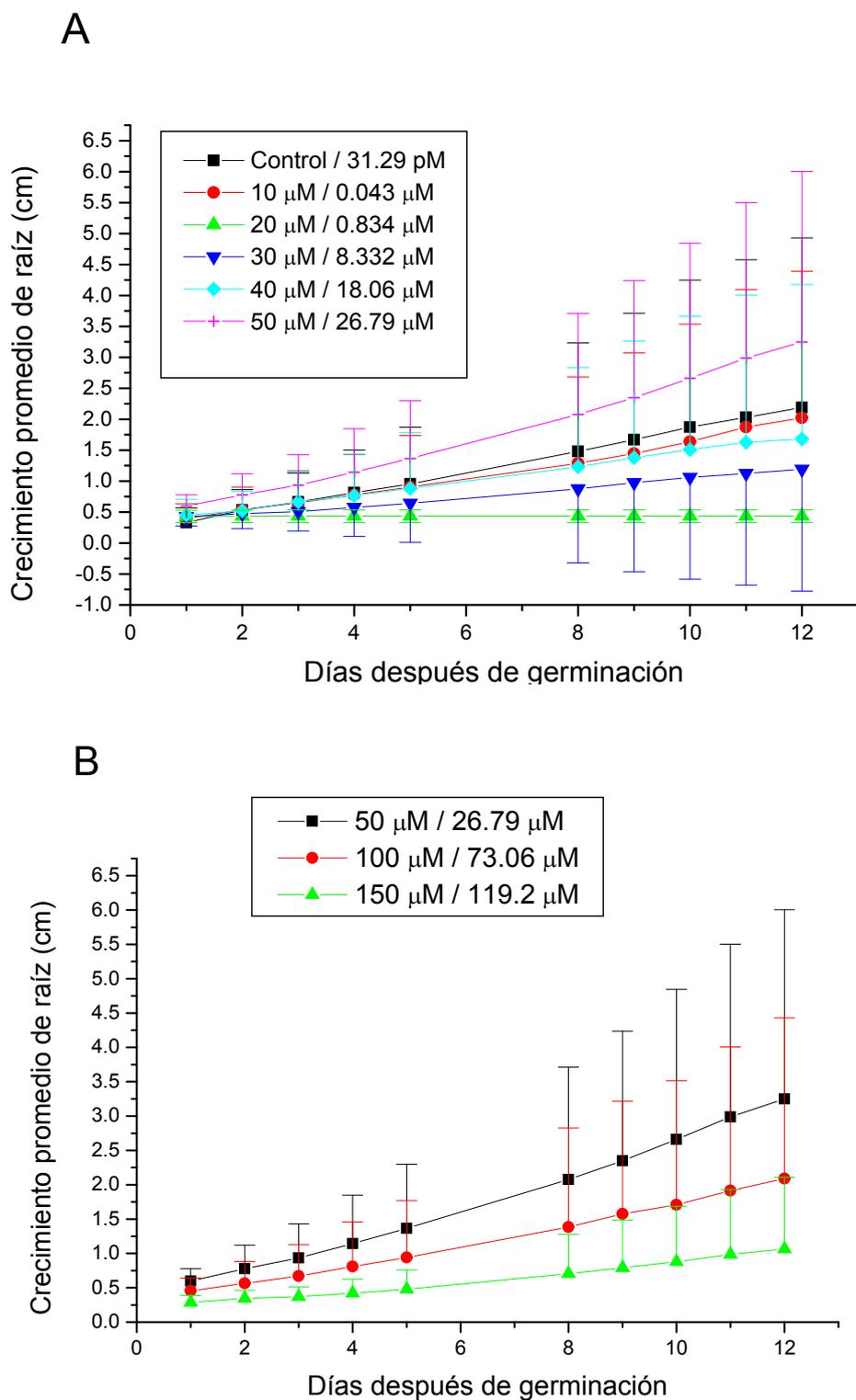
Concentración de ZnSO <sub>4</sub> agregada al medio (μM)	Zn <sup>2+</sup> libre (μM)	Zn <sup>2+</sup> libre (%)
00	31.29 × 10 <sup>-5</sup>	0.04
10	0.047	0.47
20	0.834	4.16
30	8.33	27.59
40	18.06	44.34
50	26.79	53.45
100	73.06	73.06
150	119.2	79.33
200	164.8	82.19
500	426.8	85.32
1000	833.9	83.20

**Tabla 6.2.** Cálculo del zinc libre en solución en un medio 1/2 Hoagland suplementado con concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub> con el uso del software GeoChem-PC Versión 2.0 (Parker et al., 1995).

Concentración de ZnSO <sub>4</sub> agregada al medio (μM)	Zn <sup>2+</sup> libre (μM)	Zn <sup>2+</sup> libre (%)
00	0.00663	0.065
10	0.176	1.74
50	1.534	3.06
150	32.480	21.61
200	65.880	32.87
350	168.000	47.74
500	269.000	53.73

De aquí en adelante, las concentraciones de zinc se darán tanto de zinc libre como del zinc total agregado a la solución referido como  $\text{ZnSO}_4$  o se especificará a que concentración se refiere el comentario. Los efectos en el crecimiento de *A. thaliana* al ir aumentando la concentración de zinc se determinaron por tres parámetros: el crecimiento de la raíz primaria en semillas germinadas en cajas Petri, el crecimiento de la raíz en plantas crecidas en medio hidropónico y teñidas con carbón activado y el peso fresco total de plantas germinadas en cajas Petri. Inicialmente, las plantas se germinaron en ausencia de zinc y plántulas de 7 días de crecimiento se transfirieron a los tratamientos de zinc. Sin embargo, debido al daño mecánico causado durante la transferencia se obtuvieron mediciones con una variabilidad muy alta (datos no mostrados). Por eso, en lo subsiguiente, las semillas se germinaron directamente en el medio con concentraciones crecientes de zinc, midiendo el crecimiento de la raíz por un periodo de 12 días después de su germinación registrando a los 18 días el peso fresco de las plantas. El  $\text{Zn}^{2+}$  no tuvo efectos evidentes en la germinación de las semillas, excepto a las concentraciones más altas utilizadas.

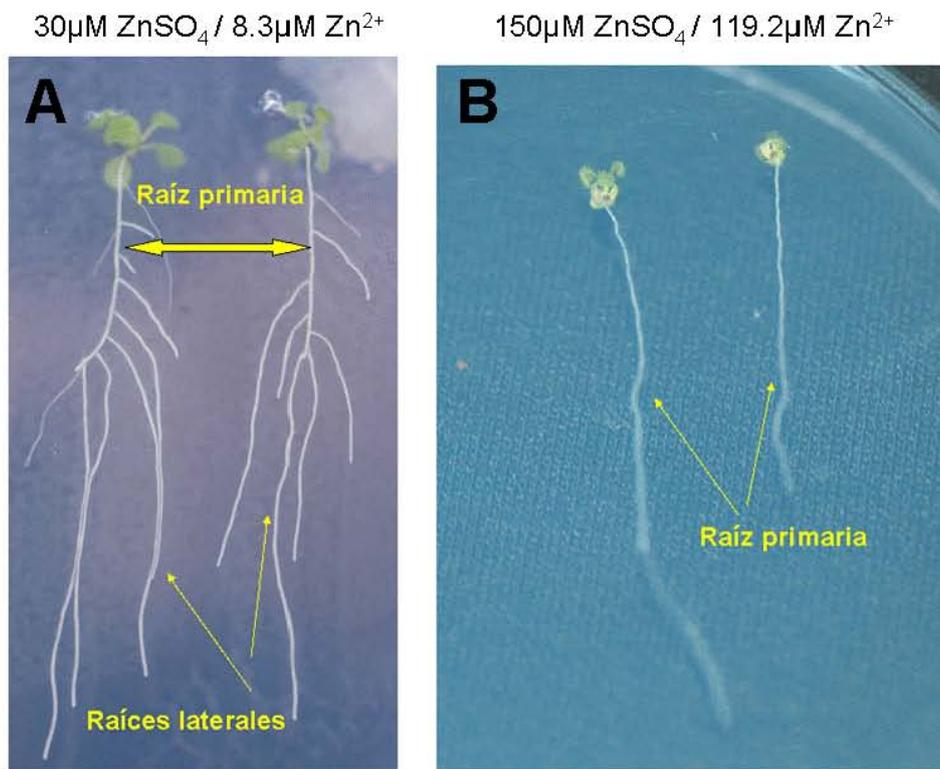
El efecto del zinc en el crecimiento de la raíz primaria presenta una tendencia clara. A concentraciones menores y mayores de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$  se observa crecimiento de la raíz primaria aunque menor al control y menor al óptimo de  $50 \mu\text{M}$ . (Fig. 6.10 A y B). El cálculo del zinc libre a bajas concentraciones de zinc indica que la mayoría del metal pesado estaba quelado (Tablas 6.1 y 6.2). Como el zinc es un micronutriente y es requerido para el crecimiento de la planta, los resultados sugieren que  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , que corresponden aproximadamente a  $27 \mu\text{M}$  de zinc libre, parecen óptimos para la elongación de la raíz. A concentraciones por arriba de  $50 \mu\text{M}$ , el crecimiento de la raíz primaria podría ser inhibido por la presencia del metal (Fig. 6.10 B). Sin embargo, la concentración más alta de zinc ( $150 \mu\text{M}$  de zinc total,  $119.2 \mu\text{M}$  de zinc libre) no inhibió completamente el crecimiento de la raíz, sugiriendo que el estudio debería repetirse usando concentraciones más altas, como: 200, 500 y  $1000 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ .



**Figura 6.10** Crecimiento promedio de la raíz primaria de plantas de *A. thaliana* germinadas en diferentes concentraciones de  $\text{ZnSO}_4$

Las semillas se germinaron en 0.1X Hoagland, agar 1% en la presencia de la concentración indicada de zinc. Los valores son medias  $\pm$  S.E. de 10 plantas diferentes. En el cuadro se muestra concentración agregada de  $\text{Zn}^{2+}$ /concentración real de  $\text{Zn}^{2+}$  libre calculada usando el software GeoChem. **A.** Semillas de *A. thaliana* germinadas a bajas concentraciones de  $\text{ZnSO}_4$  **B.** Semillas de *A. thaliana* germinadas a las concentraciones de  $\text{ZnSO}_4$  más altas

Entre los efectos del zinc en la elongación de la raíz de *A. thaliana* se observaron diferencias morfológicas claras dependientes de las concentraciones de zinc (Fig. 6.11). A bajas concentraciones de zinc (8.3  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 6.11 A), se observó la inducción de raíces laterales con un pequeño aumento en la longitud de la raíz primaria. A altas concentraciones de zinc (119.2  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 6.11 B), no se desarrollaron raíces laterales porque probablemente esté afectado su meristemo apical. Estos resultados resaltan una fuente de error que podría ser relacionada a la medición del crecimiento de la raíz, sugiriendo que este método puede no ser el más exacto para determinar la tolerancia a metales pesados. Sin embargo, el efecto que altas concentraciones de zinc tienen sobre el desarrollo de las raíces laterales, es claro.

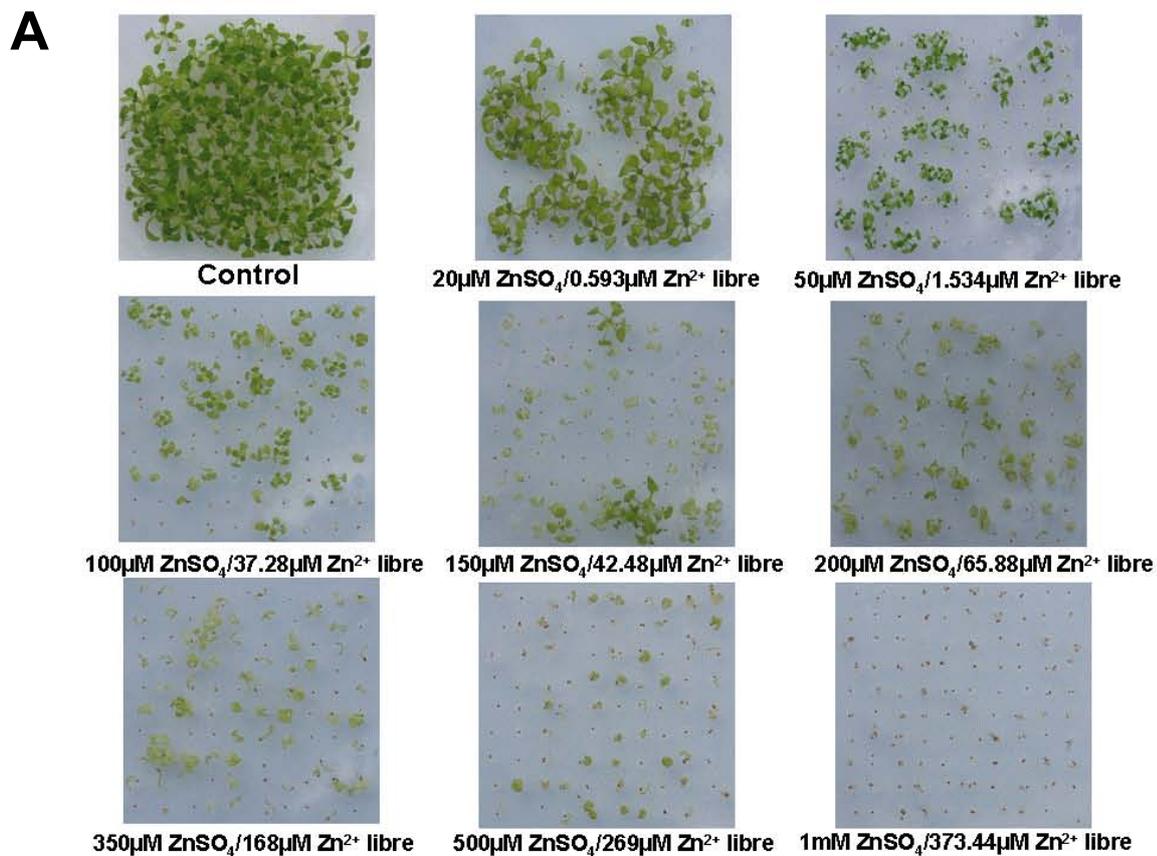


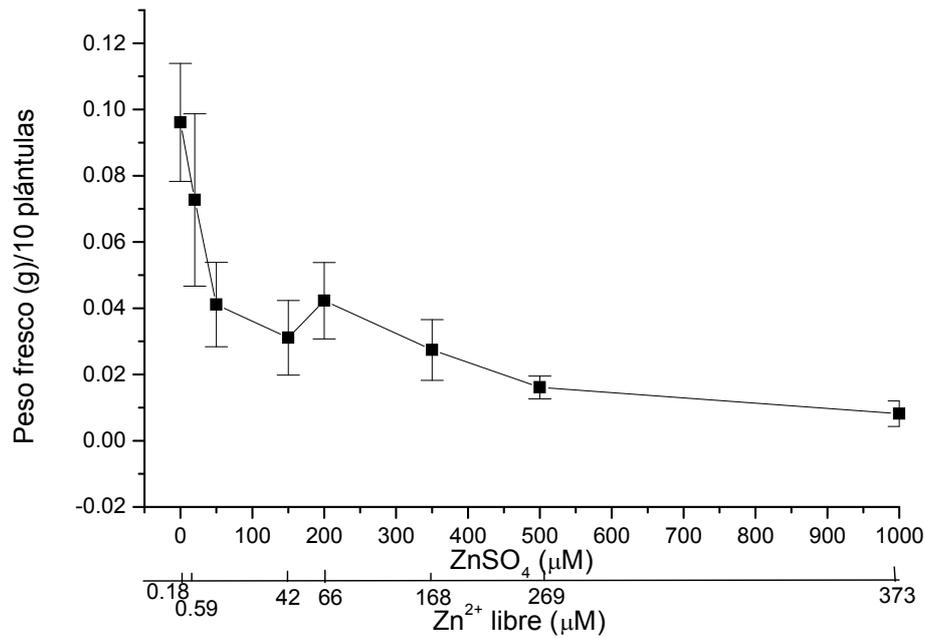
**Fig. 6.11.** Efecto del zinc en la morfología de la raíz.

Plantas de *A. thaliana* cultivadas en 0.1X de medio Hoagland, 1% agar y suplementadas con la cantidad de ZnSO<sub>4</sub> indicada. Es notorio el desarrollo de raíces laterales a la concentración menor de Zn<sup>2+</sup> (A) y el nulo desarrollo de raíces laterales que presentan las plantas a la concentración mayor de Zn<sup>2+</sup> (B).

El peso fresco de las plantas en la presencia de distintas concentraciones crecientes de zinc, también mostró diferencias que dependen de la concentración del metal; una para

concentraciones bajas de zinc y otra para las concentraciones altas. Entre 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , se encuentra un pico de peso fresco que representa el crecimiento máximo que presentan las plantas y que probablemente se deba a la concentración óptima del metal ya mencionada (Fig. 6.12 A). A partir de 66  $\mu\text{M}$  de zinc libre, el peso fresco de las plantas disminuye considerablemente. Además, como se muestra en la Figura 6.12 A, a partir de la misma concentración de zinc, las plantas lucen cloróticas y tienen una menor biomasa. El error estándar alto en el tratamiento control podría deberse a que las plantas se desarrollan bien y limitan el crecimiento de otras creando un hacinamiento en la caja Petri, que limita probablemente la obtención de recursos. Este efecto se observa claramente, las plantas en el borde que son mucho más grandes que plantas en el centro (Figura 6.12 A). A la concentración más alta de zinc (1M) se observa un retraso en la germinación que provoca una reducción en el número de plántulas.



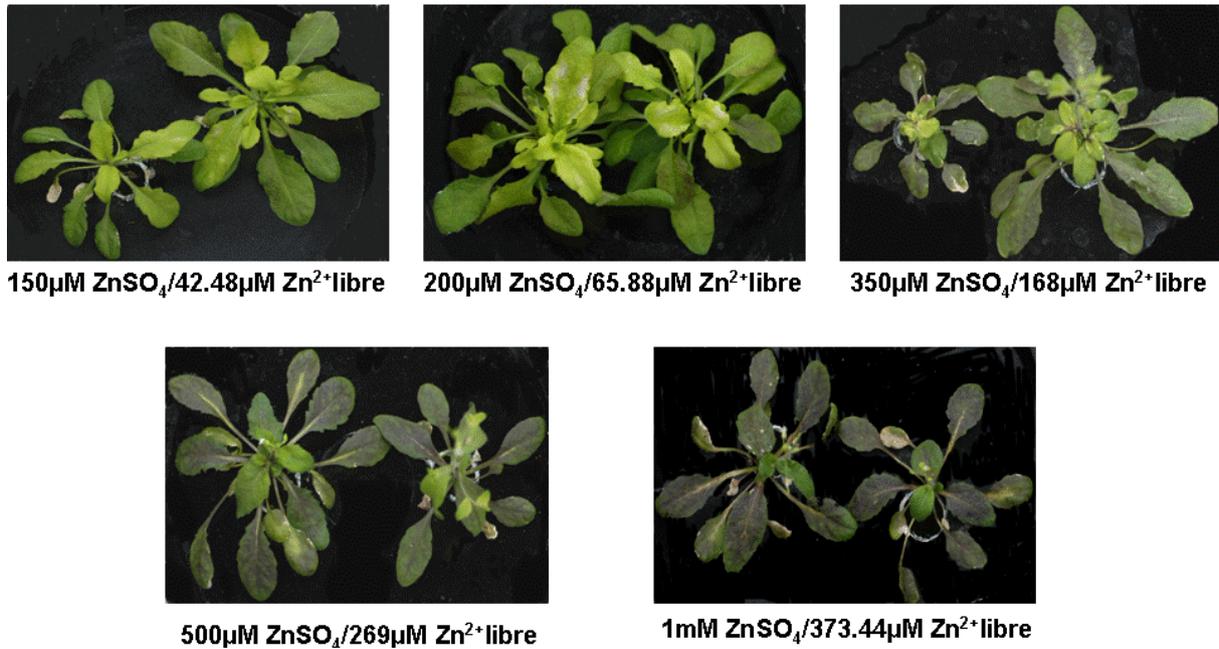
**B**

**Figura 6.12.** Fenotipo y peso fresco de plántulas de *A. thaliana* que germinaron a concentraciones crecientes de zinc.

**A.** Las plantas se germinaron y mantuvieron por 18 días de semillas en cajas Petri con 0.5X Hoagland y agar 1.0% suplementado con la cantidad indicada de zinc.

**B.** Las plantas se pesaron en una balanza de precisión y los valores representan la media ± S.E: (n=15) para cada concentración de zinc.

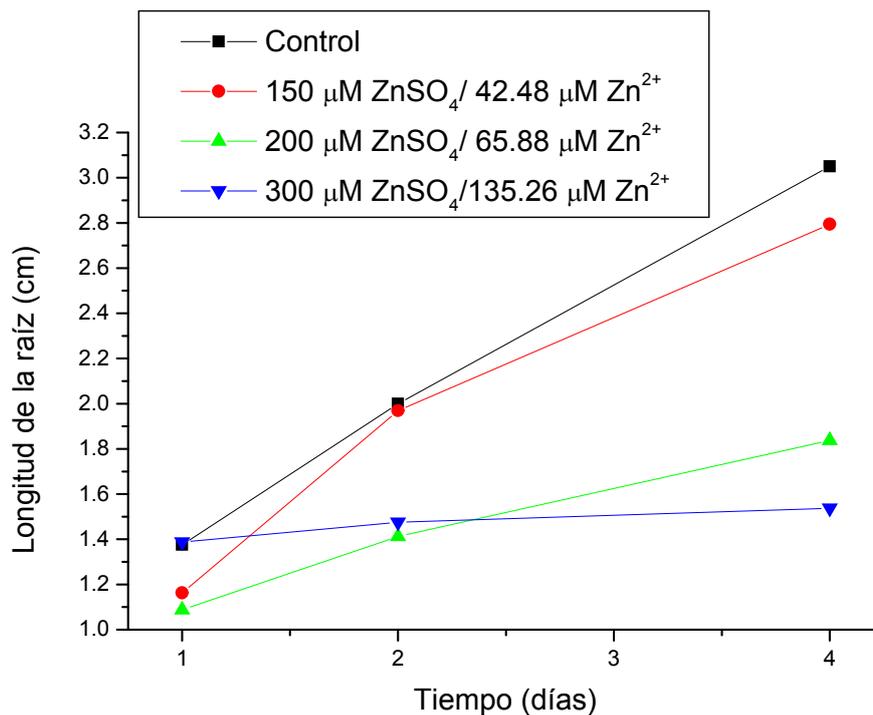
Para evaluar el efecto del Zn<sup>2+</sup> sobre el crecimiento de las raíces en hidroponía se usó el método de tinción con carbón activado (Schat & Bookum, 1992), inicialmente, se hizo una pre-selección de las concentraciones de zinc a utilizarse, para hacer después un tratamiento más fino. Se analizó cualitativamente el crecimiento de las raíces de *A. thaliana* en presencia de 150, 200, 350, 500 y 1000 µM de ZnSO<sub>4</sub>, así como los cambios aparentes en la parte aérea de las plantas. Como se muestra en la Figura 6.13, a partir de 200 µM las hojas mostraron clorosis, poco desarrollo de la roseta y mostraron una coloración violácea característica de la presencia de antocianinas, por tanto de estrés oxidativo (Steyn et al., 2002). Finalmente, se decidió medir las raíces de plantas tratadas con 150, 200 y 300 µM de ZnSO<sub>4</sub>, ya que a concentraciones más altas las plantas mostraron signos indiscutibles de estrés, que pudieran interferir con nuestro interés en identificar mecanismos y proteínas relevantes para la tolerancia a los metales pesados.



**Figura 6.13** Cambios en la coloración, morfología y tamaño de la roseta de plantas de *A. thaliana* tratadas con diferentes concentraciones de  $ZnSO_4$ .

Plantas de cuatro semanas cultivadas en hidroponía fueron tratadas por 4 días con las concentraciones de  $ZnSO_4$  indicadas. Imágenes representativas de ocho plantas para cada tratamiento.

En la gráfica que se muestra en la Figura 6.14 A, se observa que el crecimiento de las raíces no se vio afectado después de un día de tratamiento con las diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ . Sin embargo, el  $Zn^{2+}$ , a concentraciones de 200 y 300  $\mu M$  causó una disminución importante en el crecimiento de la raíz, que fue casi total a 300  $\mu M$  a los dos y cuatro días de exposición al metal pesado. La concentración de 150  $\mu M$  de  $ZnSO_4$  también causó una inhibición en el crecimiento de la raíz pero de menor magnitud (Fig. 6.12 A). En la Figura 6.14 B se observa el crecimiento de raíces hasta 200  $\mu M$  de  $ZnSO_4$ , donde la punta se ve transparente, indicando crecimiento y desarrollo de la misma.

**A****B**

	Control	150	200	300
ZnSO <sub>4</sub> (μM)	0.38	150	200	300
Zn <sup>2+</sup> libre (μM)	0.00663	42.48	65.88	135.12

**Figura 6.14** Análisis del crecimiento de las raíces de *A. thaliana* en cultivos hidropónicos en la presencia de ZnSO<sub>4</sub>.

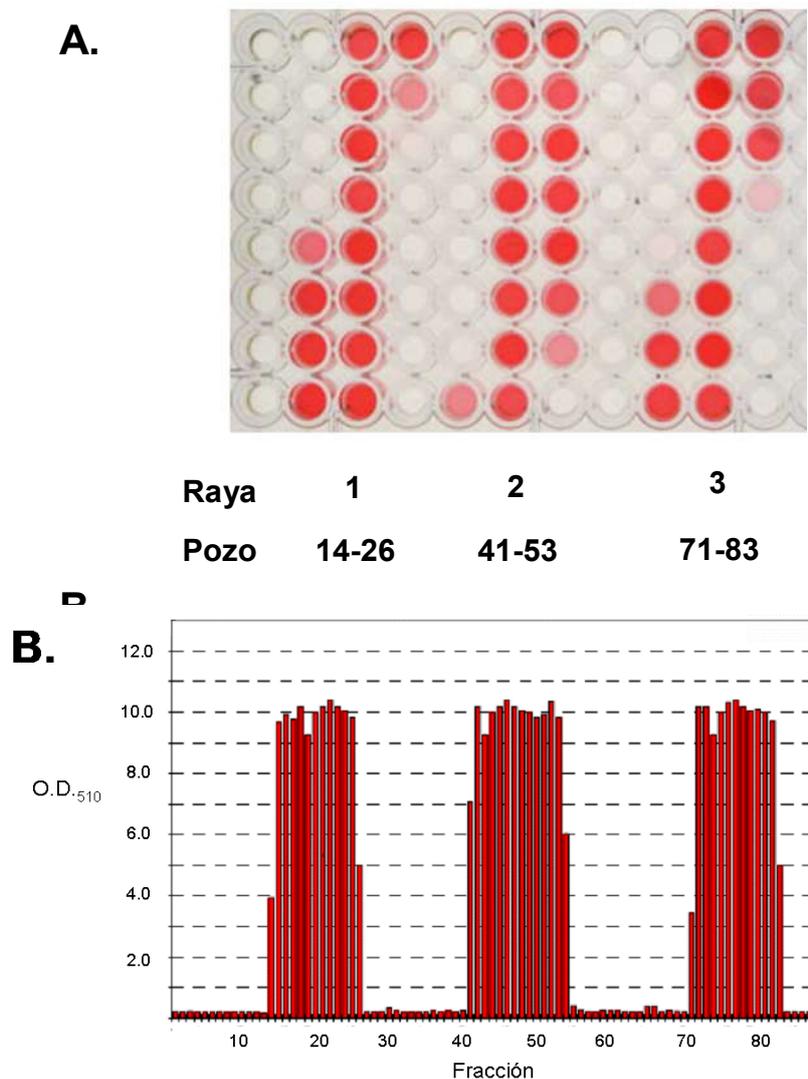
Las plantas fueron cultivadas 4 semanas en hidroponia en 1/2 Hoaglands. Las raíces de cada planta se remojaron en una solución de carbón activado (2%) y se regresaron al cultivo hidropónico para el tratamiento con ZnSO<sub>4</sub>. **A.** Diferencia en la longitud de las raíces de *A. thaliana* teñidas con carbón activado y tratadas con las concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> señaladas por 4 días. **B.** Plantas de *A. thaliana* tratadas con diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> en medio hidropónico. El corchete (I) indica la zona de crecimiento de la raíz después de cuatro días.

En base a estos análisis preliminares (Figs. 6.12, 6.13 y 6.14), se decidió que la concentración de zinc, sería de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$  que corresponde a una concentración libre de 65.88  $\mu\text{M}$ . También se decidió que el tiempo de tratamiento sería de 4 días, a los que aún se observa un aumento en la biomasa de las plantas, con muy ligeros signos de estrés.

#### **6.4 Purificación del tonoplasto de *A. thaliana* por FFZE**

La Electroforesis de Zona de Flujo Libre es un método versátil de alta tecnología que se emplea para separar grandes cantidades de membranas/endomembranas y se utilizó para aislar al tonoplasto altamente puro a partir de fracciones microsomales de membrana de *Arabidopsis* para su posterior estudio proteómico.

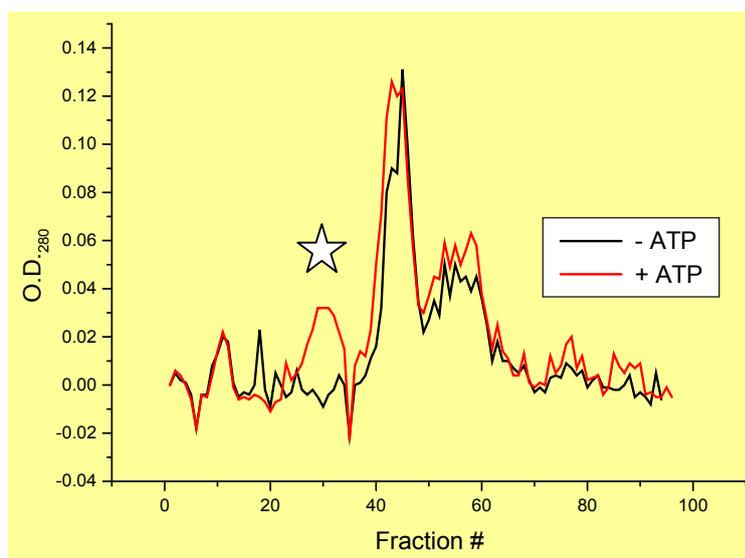
Antes de correr la muestra de microsomas, se probó el funcionamiento del equipo con un colorante, que típicamente debe producir unas tiras de color rojizo con un patrón definido. El colorante SPADNS (sal trisódica de ácido 2-(4-Sulfofenilazo) 1,8-dihidroxi-3,6-disulfónico de naftaleno), tiene una absorbancia máxima entre 505-510 nm, es inyectado en las entradas para medio 2, 4 y 6 y debe producir tres rayas rojizas en la cámara de FF y que no ocupen más de 15 pozos de ancho con claras líneas de división transparentes cuando las fracciones se colectan en una microplaca de ELISA (Fig. 6.15 A). El haber obtenido este patrón de separación confirmó el correcto flujo laminar en la cámara de separación, asegurando la ausencia de burbujas o fugas dentro de la misma (Fig. 6.15 B).



**Figura 6.15** *Calibración del FFZE.*

El SPADNS es inyectado en los puertos de entrada 2, 4 y 6 permitiendo su circulación a lo largo de la cámara bajo flujo continuo por 15 minutos, la muestra se colecta en una microplaca de ELISA (250  $\mu$ L/pozo) y se determina la O.D.<sub>510</sub> con un lector de microplacas. **A.** Las fracciones son colectadas en la microplaca mostrando la localización del colorante. **B.** La medición de la O.D.<sub>510</sub> de las fracciones muestra 3 picos con una resolución clara de 16 fracciones de ancho, con una brecha de 15 fracciones entre cada pico.

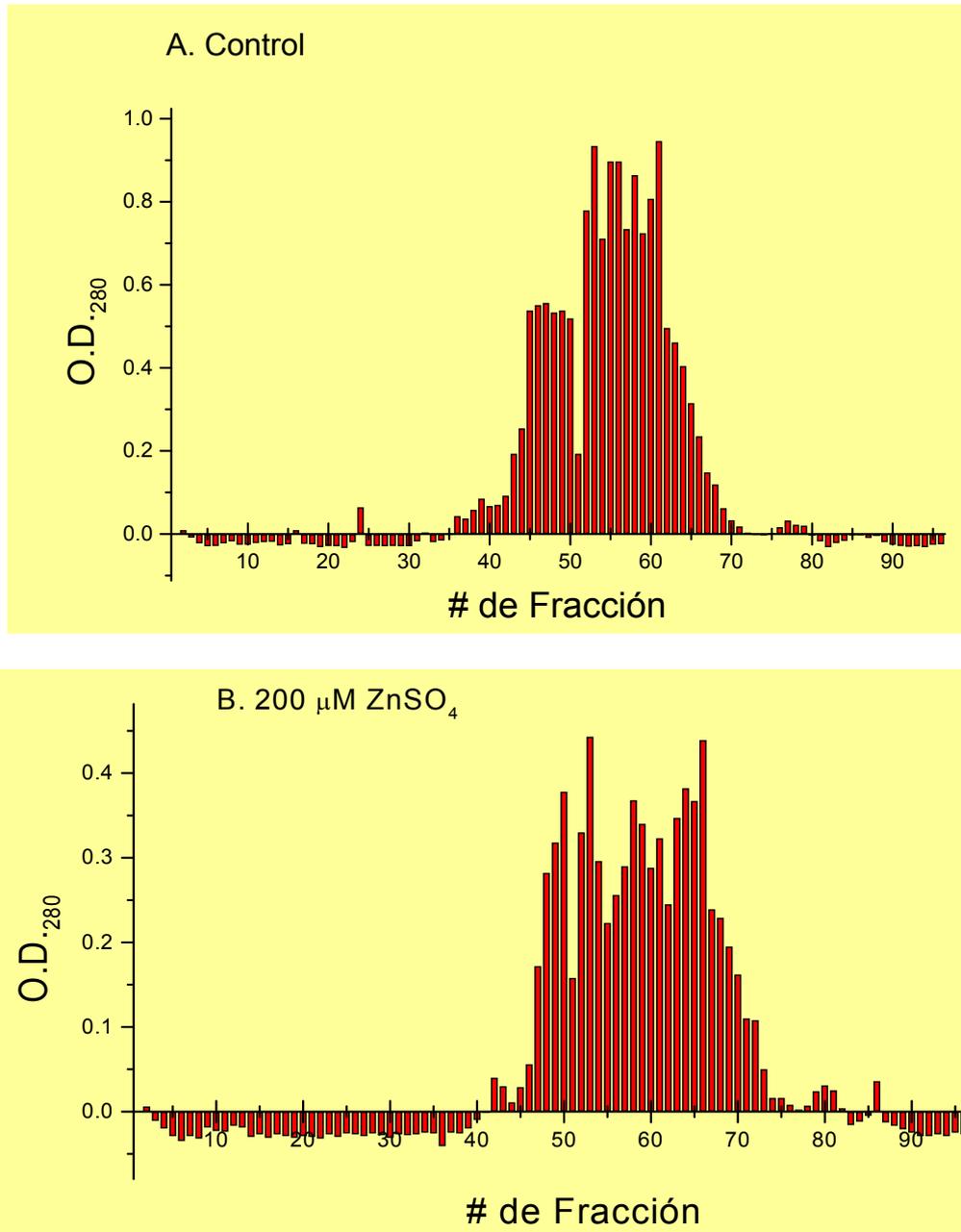
La preincubación de la fracción microsomal con ATP (6mM) ha sido reportada (Barkla et al., 2007) como adecuada para el enriquecimiento de la fracción tonoplástica. En nuestro caso, la adición de ATP a las muestras previamente a su resolución en FFZE, demostró la aparición de un pico (estrella blanca, Fig. 6.16) de proteína dependiente de ATP, que puede ser atribuida al tonoplasto. Por lo tanto, se decidió hacer la FFZE de microsomas de *A. thaliana* con una preincubación de la fracción microsomal con 6 mM de ATP.



**Figura 6.16.** Efecto de la preincubación de la fracción microsomal de *A. thaliana* con ATP en sobre la separación de membranas por FFZE.

Membranas microsomas (3 mg) fueron incubadas en la presencia (línea roja) o ausencia (línea negra) de 6 mM de ATP de su separación por FFZE. La O.D.<sub>280</sub> de cada fracción se midió usando un lector de microplacas (Power Wave<sub>x</sub> Select, Bio-Tek Instruments). Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

La separación de fracciones por FFZE se realizó a partir de 8 mg de proteína de muestras control y plantas tratadas con 200  $\mu$ M de ZnSO<sub>4</sub>, correspondiente a 6 preparaciones y alrededor de 500 plantas adultas. En el medio de homogenización, se utilizó el sustrato para proteasas BSA para prevenir la degradación proteica observada en separaciones preliminares (no mostrados). Se utilizó a pesar de que se tiene evidencia de que el BSA es una de las proteínas contaminantes más frecuentemente encontradas cuando se analizan las proteínas por espectrometría de masas (Ephritikhine et al., 2005). El perfil de separación de las endomembranas que corresponden a ambas condiciones se muestran en la Figura 6.17.

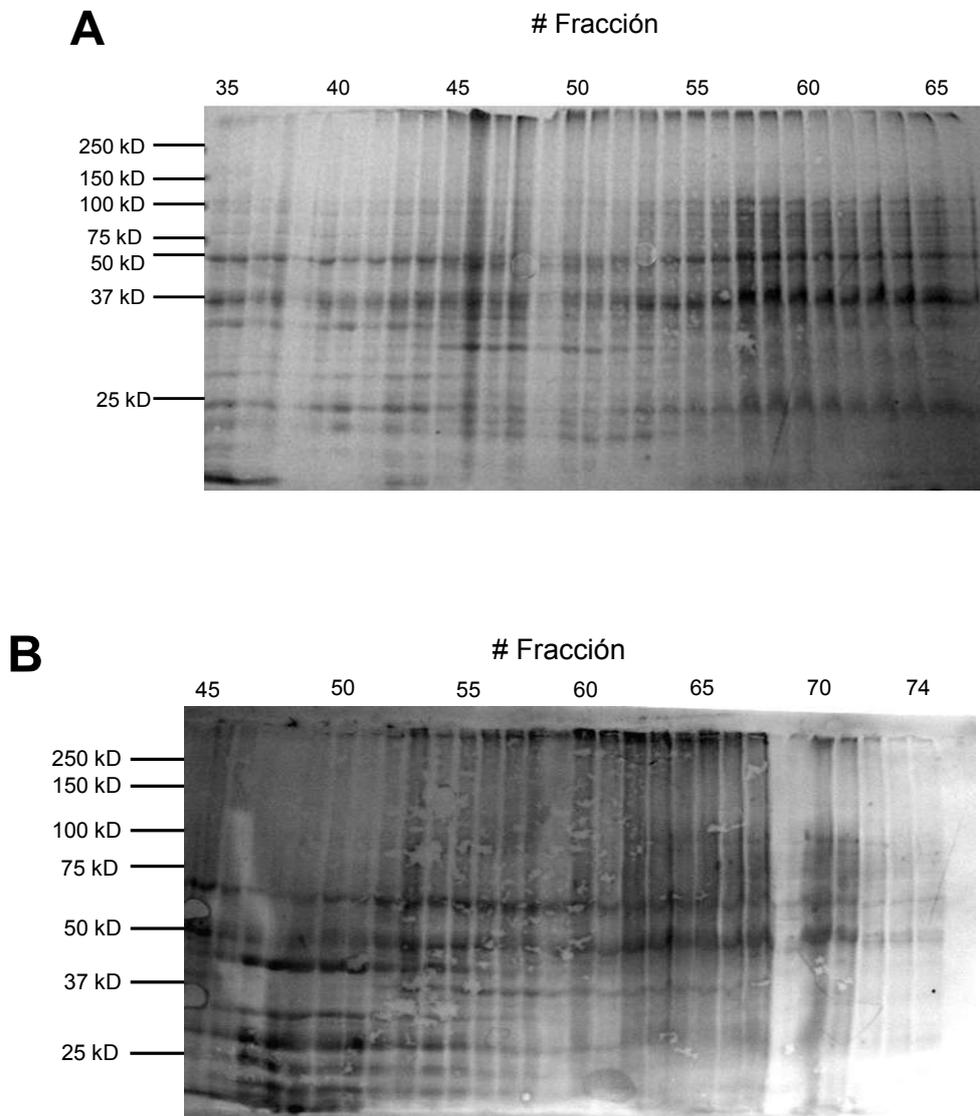


**Figura 6.17** Determinación de proteína en las fracciones de FFZE de las membranas microsomales de *A. thaliana*.

Un volumen pequeño de proteína del colector de fracciones se colocó en placas de ELISA y se midió la cantidad de proteína por O.D.<sub>280</sub> usando un lector de placas (Power Wave<sub>X</sub> Select, Bio-Tek Instruments). Las fracciones que mostraron la presencia de proteína se colectaron individualmente para el análisis por SDS-PAGE y western blot. A. Control. B. Muestra tratada con zinc.

Para ambos tratamientos, se colectaron las fracciones que mostraron una O.D.<sub>280</sub> positiva, se centrifugaron, prepararon y resolvieron independientemente en un gel de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana que fue teñida con la técnica reversible del colorante Ponceau S,

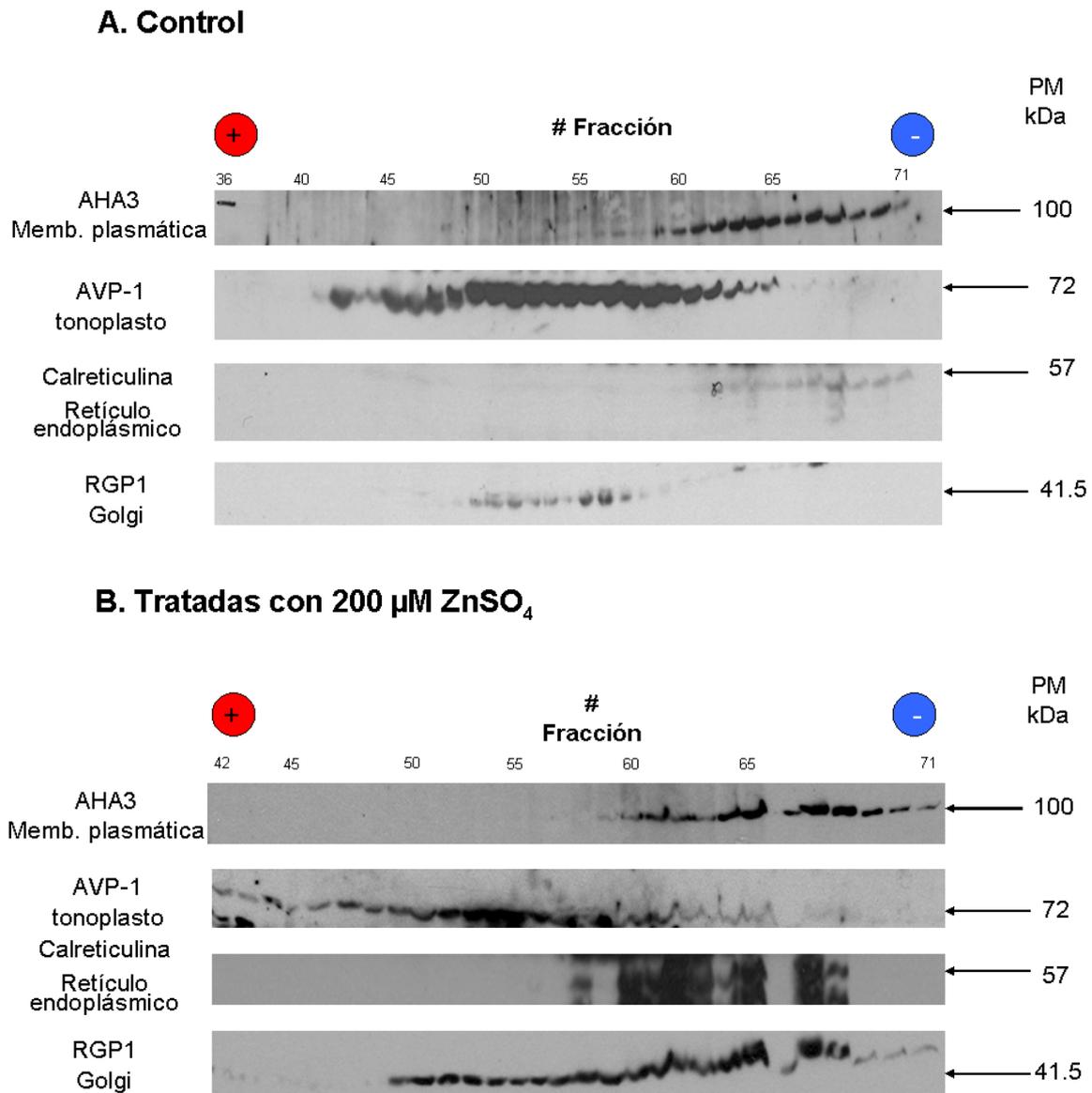
para verificar la eficiencia de transferencia y asegurarse que las proteínas no estuvieran degradadas. Se muestra en la Figura 6.18, el perfil de las proteínas de endomembranas de *A. thaliana* tanto en las plantas control, como en las tratadas con 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ .



**Figura 6.18.** Membrana con fracciones microsomales de *A. thaliana* separadas por FFZE que mostraron valores positivos de  $O.D._{280}$ . Después de la SDS-PAGE los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se tiñeron con Ponceau S. **A.** Fracciones de las plantas control. **B.** Fracciones de plantas tratadas con 200  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ .

Sobre las membranas se hizo el análisis por western blot de las fracciones usando los anticuerpos marcadores de endomembranas: AHA3, una P-ATPasa marcadora de membrana plasmática con un peso estimado de 100 kDa (Parets-Soler et al., 1990); AVP1, una PPasa

localizada en el tonoplasto con una masa molecular de 72 kDa (Parry et al., 1989); CRT1, Calreticulina proteína marcadora del Retículo endoplásmico con una masa de 57 kDa (Nelson et al., 1997); y RGP1, marcadora de Golgi de 41.5 kDa (Dhugga et al., 1997). Las inmunodetecciones realizadas se muestran en la Figura 6.19.

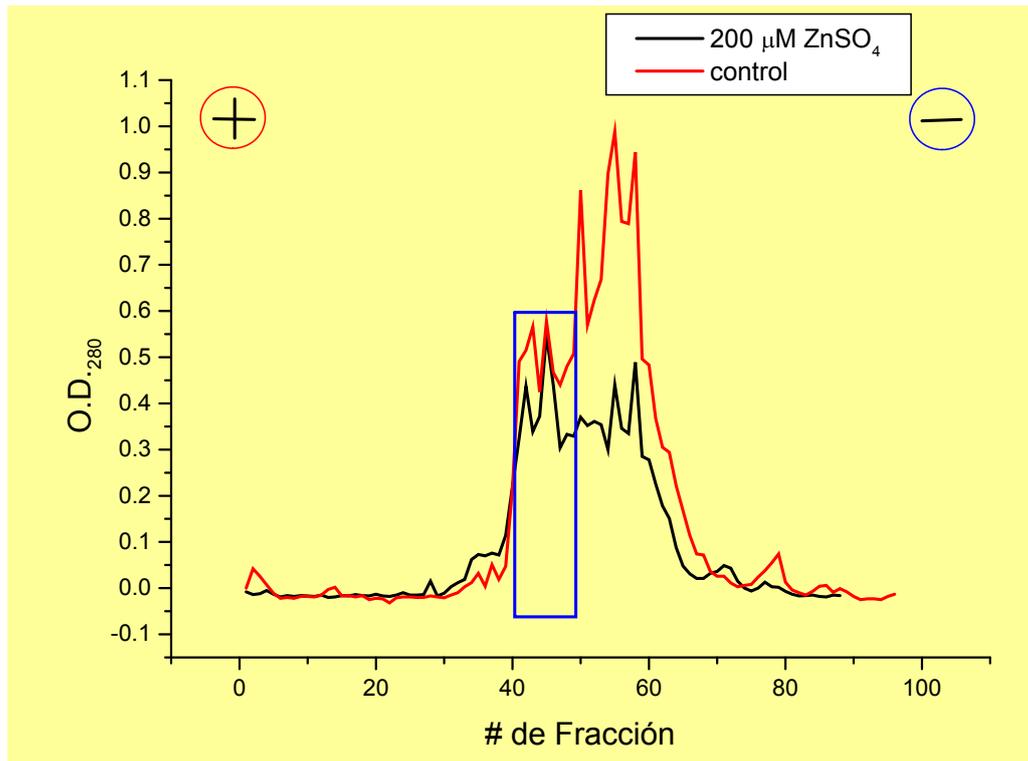


**Figura 6.19.** Análisis por western blot de membranas microsomaes de *A. thaliana* separadas por FFZE y SDS-PAGE.

AHA3, una P-ATPasa marcadora de membrana plasmática con un peso esperado de 100 kDa; AVP1, una PPasa que marca el tonoplasto de aproximadamente 72 kDa; CRT1, Calreticulina marcadora para Retículo endoplásmico de 57 kDa; y RGP1, marcadora de Golgi de 41.5 kDa. Se muestra el número de fracciones y la localización del ánodo y del cátodo de la cámara de FFE. **A.** Fracciones de las plantas control. **B.** Fracciones de plantas tratadas con 200  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$ .

Del análisis de western blot de la muestra control, se puede concluir que la membrana plasmática presenta una movilidad mayor hacia el cátodo en las fracciones 65 a 70. La calreticulina, marcador del retículo endoplásmico se encuentra puro en la fracción 71 y el marcador del Golgi coincide en 8 de las 23 fracciones (fracciones 49 a 57 de la muestra control) donde está presente el tonoplasto, sin embargo, en aquellas fracciones del tonoplasto con una movilidad mayor hacia el ánodo causada por la presencia de ATP, no existe coincidencia. En el caso del western que corresponde a las fracciones de plantas tratadas con zinc (Fig. 6.19 B), las fracciones que corresponden a la membrana plasmática, Golgi y Retículo se encuentran traslapadas, lo cual nos habla de un cambio en el contenido proteína/lípido de las membranas que se refleja en un cambio de la carga superficial de las membranas cuando las plantas debe contender con el metal pesado.

Las fracciones que corresponden a la fracción pura de tonoplasto son aquellas que mostraron únicamente la presencia de la proteína marcadora de esta endomebrana. En la muestra control, el tonoplasto puro correspondió a las fracciones 42 a 47 y en las membranas tratadas con zinc a las fracciones 42 a 49 (Fig. 6.19). En la Figura 6.20, se muestra el empalme (rectángulo azul) de las fracciones correspondientes a tonoplasto puro en las dos condiciones analizadas, mostrando que se mantiene la migración del tonoplasto hacia el ánodo, bajo las dos condiciones y en presencia de ATP (Fig. 6.20).



**Figura 6.20.** Perfil de separación por FFZE de las membranas microsomales de plantas control (línea roja) y tratada con Zn<sup>2+</sup> (línea negra). Se indica (recuadro azul) el traslape de las fracciones correspondientes al tonoplasto puro.

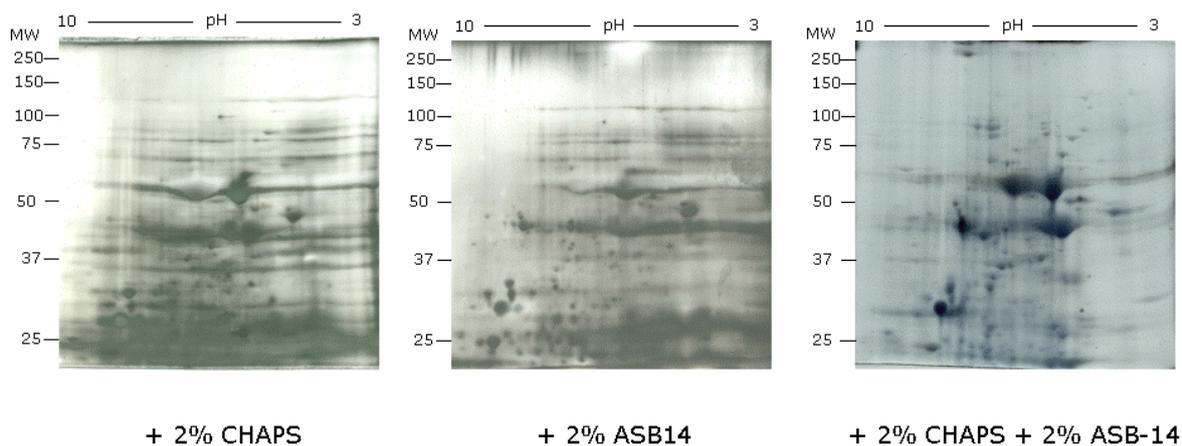
Las fracciones de tonoplasto puro tanto de los dos tratamientos, separadas por FFZE, se juntaron para obtener una fracción única de cada tratamiento. Estas fracciones que representan tonoplasto puro, se utilizaron para el análisis por DIGE.

### 6.5 Solubilidad mejorada de proteínas del tonoplasto con detergentes para su separación por IEF.

El análisis de proteínas hidrofóbicas de membrana por métodos basados en gel de IEF, incluyendo el uso de tiras de IPG, es problemático debido a la dificultad inherente de la baja solubilidad de estas proteínas y la tendencia que presentan de precipitar durante el enfoque. Para optimizar este procedimiento para el tonoplasto, se probó la adición de detergentes iónicos neutros a la muestra proteica para hidratar las tiras de IPG (Churchward et al., 2005). Dentro de los detergentes zwitteriónicos o iónicos neutros, dos han demostrado ser eficientes

en la solubilización de proteínas de membrana de plantas, son el CHAPS y ASB14 (Luche et al., 2003).

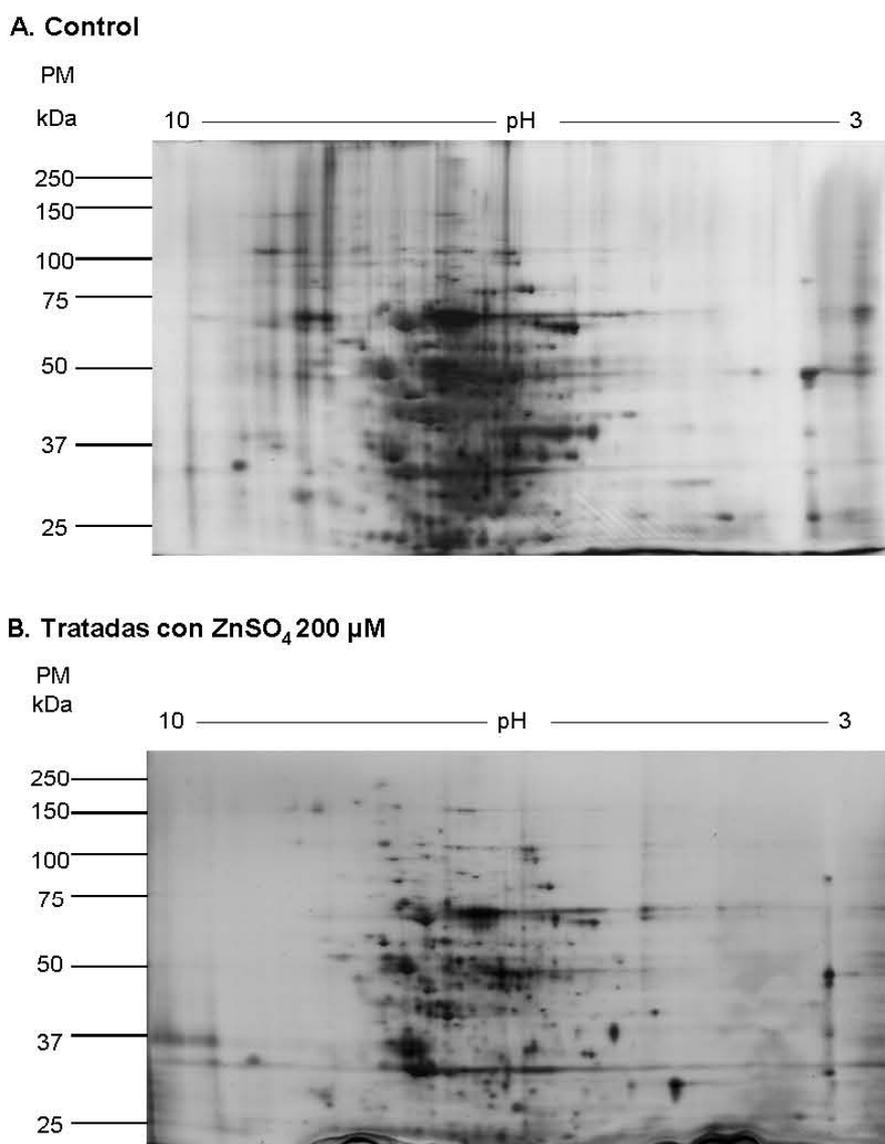
Para la optimización de la resolución de los geles, minimizando el barrido y posible precipitación de proteínas de membrana que comúnmente se observa en geles de 2-D tradicionales, se probaron diferentes buffers de rehidratación de tiras IPG con diferentes detergentes iónicos neutros comparándose los geles respectivos. Estos experimentos se llevaron a cabo con tonoplasto de la halófito *M. crystallinum*, aislado de la misma manera que el de *A. thaliana* de la que se obtiene mayor cantidad de membranas microsomales para hacer las pruebas. El primer buffer de rehidratación recomendado contenía urea 7 M, tiourea 2 M, detergente CHAPS 2% (w/v), DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lyte 0.2% (w/v) y azul de bromofenol 0.002% (w/v). En otro buffer se reemplazó al detergente CHAPS por 2% (w/v) de ASB-14 y un tercer buffer contenía 4% total de detergentes, cada uno al 2% (w/v). Un mejor número y definición de los spots de proteína con un barrido menor tanto vertical como horizontal se obtiene cuando se hace una combinación de los dos detergentes (Fig. 6.21). De manera que este buffer se continuó usando para los análisis posteriores.



**Figura 6.21.** *Electroforesis 2-D de tonoplasto de M. crystallinum*

Comparación entre los geles 2-D de tonoplasto de *M. crystallinum* usando diferentes detergentes, incluidos directamente en el buffer de rehidratación de la tira IPG.

La Figura 6.22 muestra geles 2D-PAGE del tonoplasto purificado por FFZE de *A. thaliana* usando las condiciones descritas, incluyendo 2% de CHAPS y 2% de ASB-14 en el buffer de rehidratación de la tira IPG. Ambos geles muestran la presencia de muchas proteínas claramente definidas con un amplio de abundancia amplio como lo indica la intensidad de cada una de las manchas.

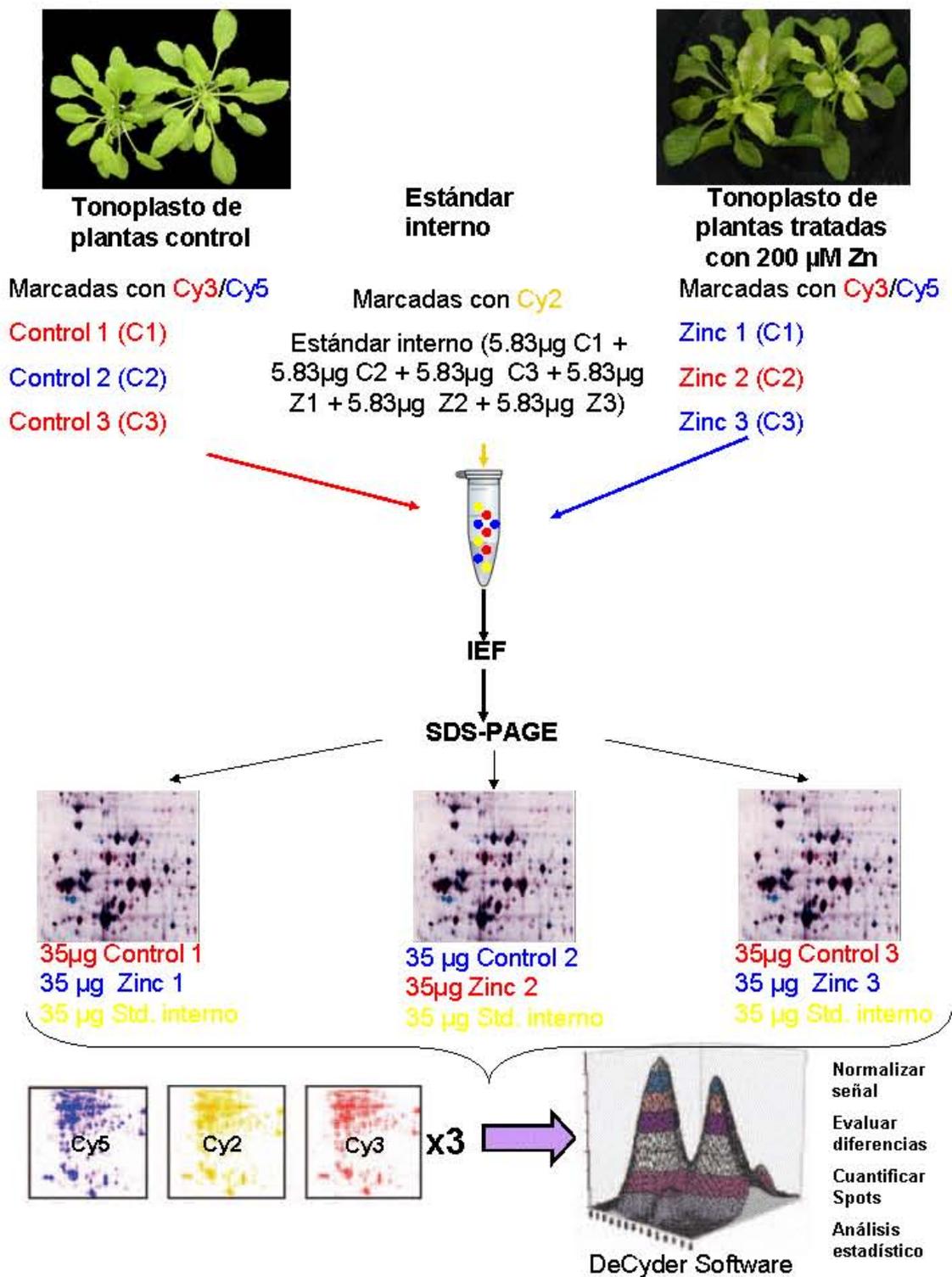


**Figura 6.22** Geles de 2-D de tonoplasto puro aislado por FFZE

La electroforesis de 2-D y la tinción con plata se llevaron a cabo como se describe en la Metodología. **A.** Control. **B.** Tratadas con ZnSO<sub>4</sub> 200 μM.

## **6.6 Electroforesis en Gel Diferencial del tonoplasto de *A. thaliana***

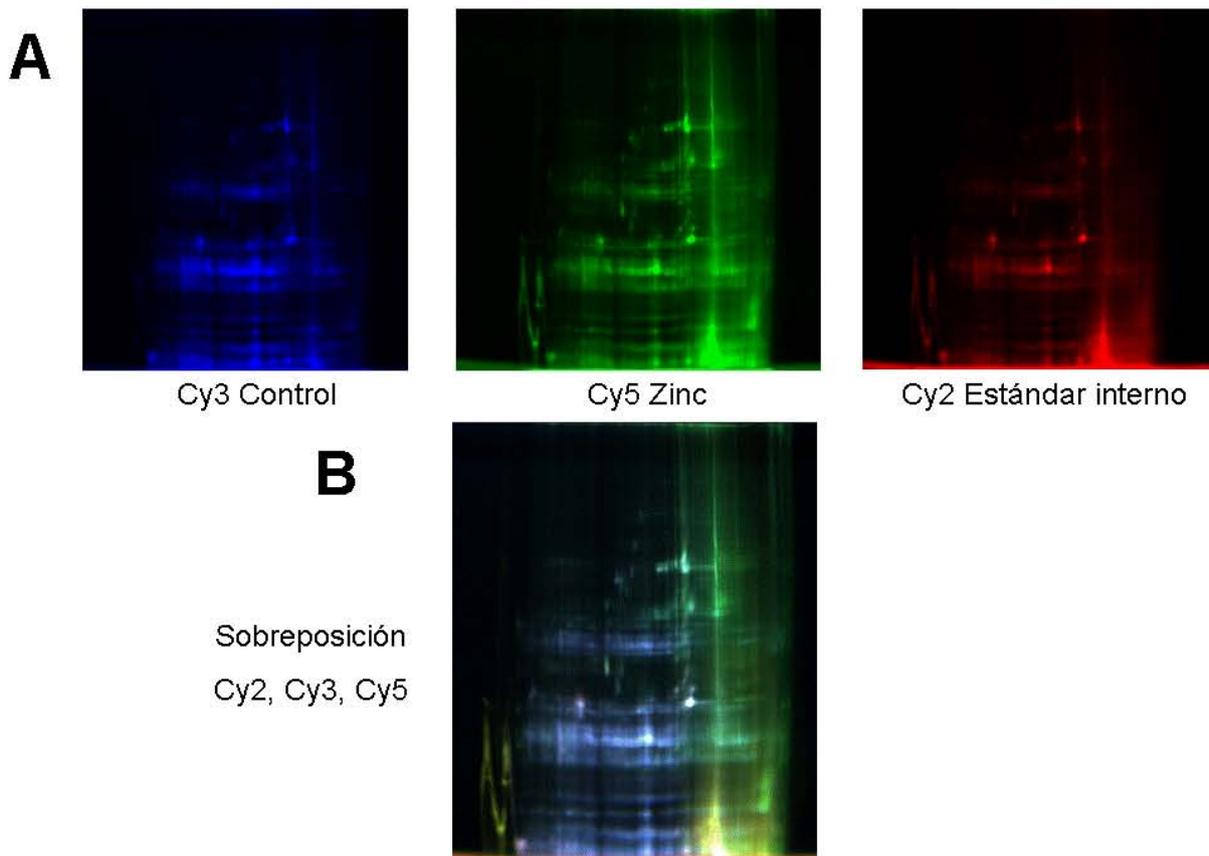
Proteína purificada de tonoplasto de plantas de *A. thaliana* control y tratadas con zinc, fueron etiquetadas con fluoróforos CyDyes según el esquema experimental presentado en la Figura 6.23 y descrito en la Tabla 5.2 (Metodología). Empleando una estrategia de intercambio del fluoróforo como se muestra para el experimento 2 en comparación con los experimentos 1 y 3, se asegura que cualquier efecto específico del fluoróforo debido a marcaje preferencial o a características diferenciales en la fluorescencia de la acrilamida a diferentes longitudes de onda de excitación, esté controlado (Lilley & Friedman, 2004).



**Figura 6.23.** Diagrama de trabajo para la etiquetación con fluoróforos CyDye de la muestra control y la tratada con zinc hasta el análisis bioinformático de las mismas.

Se corrieron tres geles representando 3 experimentos independientes. Cada gel fue escaneado a las 3 longitudes de onda específicas para cada fluoróforo CyDye (Tabla 4.1). Con el uso del escáner Typhoon (GE LifeSciences, USA) usando las longitudes de onda y filtros apropiados

para coleccionar la luz emitida. Cada digitalización genera una imagen de cada muestra individualmente marcada con cada fluoróforo. La Figura 6.24 A muestra imágenes representativas de uno de los geles, donde la muestra control está marcada con el Cy3, la tratada con zinc con Cy5 y el estándar interno con Cy2. La imagen superpuesta de las tres imágenes de este gel se muestra en la Figura 6.24 B.



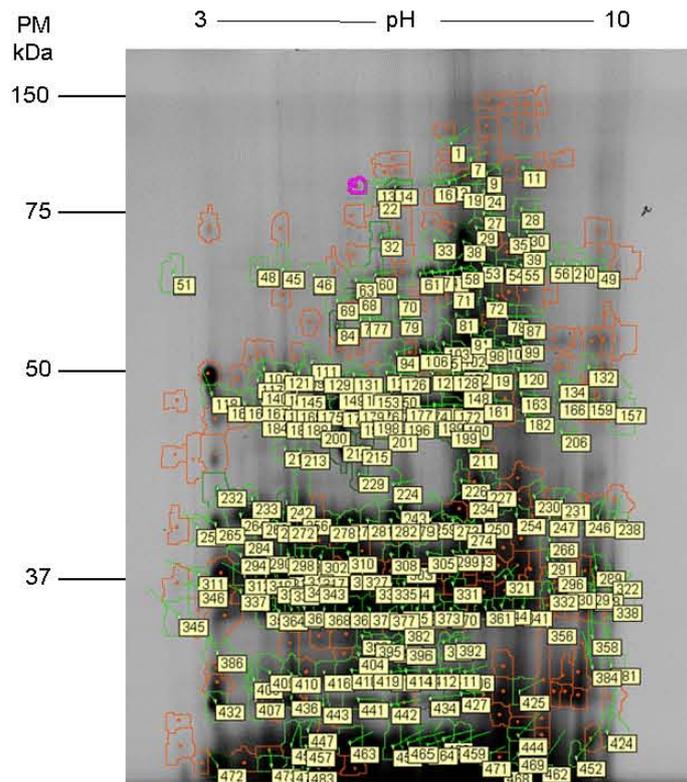
**Figura 6.24** *Imágenes de geles representativas de DIGE.*

**A.** Imágenes de Cy2, Cy3 y Cy5 con colores falsos de las imágenes digitalizadas del gel 2D del experimento 3 del esquema de trabajo para DIGE. El gel fue escaneado tres veces, con  $\lambda$  para cada uno de los fluoróforos. **B.** Imagen superpuesta de las tres imágenes en A.

En los tres geles con las proteínas marcadas con los fluoróforos CyDyes, se observó un barrido vertical que dificulta la definición de los spots (Fig. 6.24), que no estaba presente en los geles 2D de *A. thaliana* utilizados para probar el uso de detergentes (Fig.6.22). Creemos puede deberse a que el Tris utilizado en el buffer de corrida no es lo suficientemente puro y para futuros trabajos, se recomienda filtrar el buffer con un equipo de filtración Millipore,

equipado con filtros de nitrocelulosa de 0.22 micrones, (California, USA) antes de ser usado. Otra causa posible del barrido es que debe haber una separación absoluta en la cámara de corrida del Ettan Dalt Six del buffer de corrida con una concentración 3X y el 1X que es con el que está en contacto el gel. Si la concentración de SDS llega a ser menor en la cámara de arriba, se puede obtener barrido vertical y perder definición de los spots.

Las imágenes digitalizadas de los 3 geles experimentales fueron analizadas con el software DeCyder. En el módulo DIA después de filtrar alrededor de 900 spots identificados automáticamente por el programa, se filtraron manualmente los geles para evitar tener falsos positivos. Especialmente, las partículas de polvo tienen una forma característica con un pico agudo que resulta en una pendiente alta y valores de área bajos. En contraste, un pico claramente redondeado y suave corresponde a un verdadero spot de proteína. La filtración manual también elimina spots seleccionados que no son de origen proteico pero se deben a irregularidades localizadas en el gel. Mediante el filtrado manual, el número de spots se redujo a alrededor de 500 (Fig. 6.25), un valor similar al que se ha publicado anteriormente para estudios proteómicos del tonoplasto (400 a 600) (Carter et al., 2004 a; Sazuka et al., 2004; Shimaoka et al.; 2004; Szaponarski et al., 2004; Endler et al., 2006, Jaquinod et al, 2007).



**Figura 6.25.** Gel representativo analizado por DIGE, se indican los spots numerados después del filtrado automático y manual utilizando el módulo DIA del programa Decyder.

Los geles se analizaron en el módulo DIA del programa DeCyder usando un filtro de exclusión que excluye los spots considerados artefactos con base en la pendiente, área, volumen y altura del pico. Esto se repite para los geles de los 3 experimentos independientes, todas las imágenes de CyDye/gel se usan para determinar los parámetros de filtración y confirmar los artefactos.

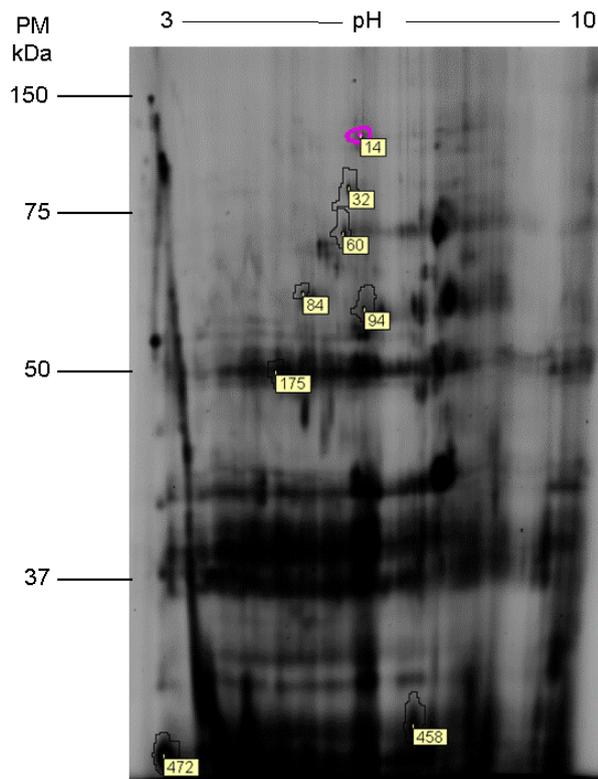
El volumen de los spots para cada una de las tres imágenes del mismo gel se cuantificó y se expresó como la proporción normalizada en relación al estándar interno, que puede ser usada para la comparación de su abundancia entre geles. Lo anterior se repitió para cada uno de los tres geles de manera individual. Los datos se transfieren al módulo BVA (Análisis de Variación Biológica) del programa Decyder para el análisis comparativo entre geles. Los geles se superponen al realizar un traslape de sus imágenes. El gel con el mayor número de spots se designa como master y se buscan entre cinco y diez proteínas que coincidan entre el master y los dos geles restantes. Una vez empalmados los geles, se hizo el análisis estadístico con una prueba de t-Student entre los grupos control y tratamiento con zinc. El análisis estadístico arroja un valor para cada spot que indica la probabilidad (p) de que no exista

diferencia entre la expresión de la proteína en el control y la muestra tratada con zinc. Como consecuencia, un spot con una probabilidad baja,  $p < 0.05$ , representa una diferencia significativa en abundancia relativa. Se encontraron 60 proteínas que cumplen este criterio, sin embargo, como el valor de probabilidad de 0.05 representa 50 falsos positivos por cada 1000 spots de proteína, finalmente se decidió usar un intervalo de confianza más estricto ( $p < 0.03$ ). Los spots que cayeron dentro de este rango se escogieron de acuerdo a su representación en 3-D, verificándose que el spot tuviera forma de una curva de distribución normal, sobretodo, para asegurar que se tratara de una sola proteína sin contaminación de proteínas aledañas. Además, se estudió la gráfica de comparación de la abundancia de cada spot entre la muestra control y la muestra tratada con  $Zn^{2+}$  para asegurar que el spot estuviera presente en cada uno de los tres geles y en los tres siguiera la misma tendencia. De las 60 proteínas identificadas inicialmente, se escogieron ocho como candidatas ideales cuya ubicación en cada uno de los tres geles se muestra en la Figura 6.26. De estas ocho proteínas, cuatro aumentaron su expresión significativamente  $p \leq 0.03$  (60, 175, 458, 472) y cuatro disminuyeron su expresión significativamente  $p \leq 0.03$  (14, 32, 84, 94) en la muestra tratada con zinc (Tabla 6.3; Fig. 6.27).

**Tabla 6.3.** Spots de proteína escogidos para su identificación por espectrometría de masas.

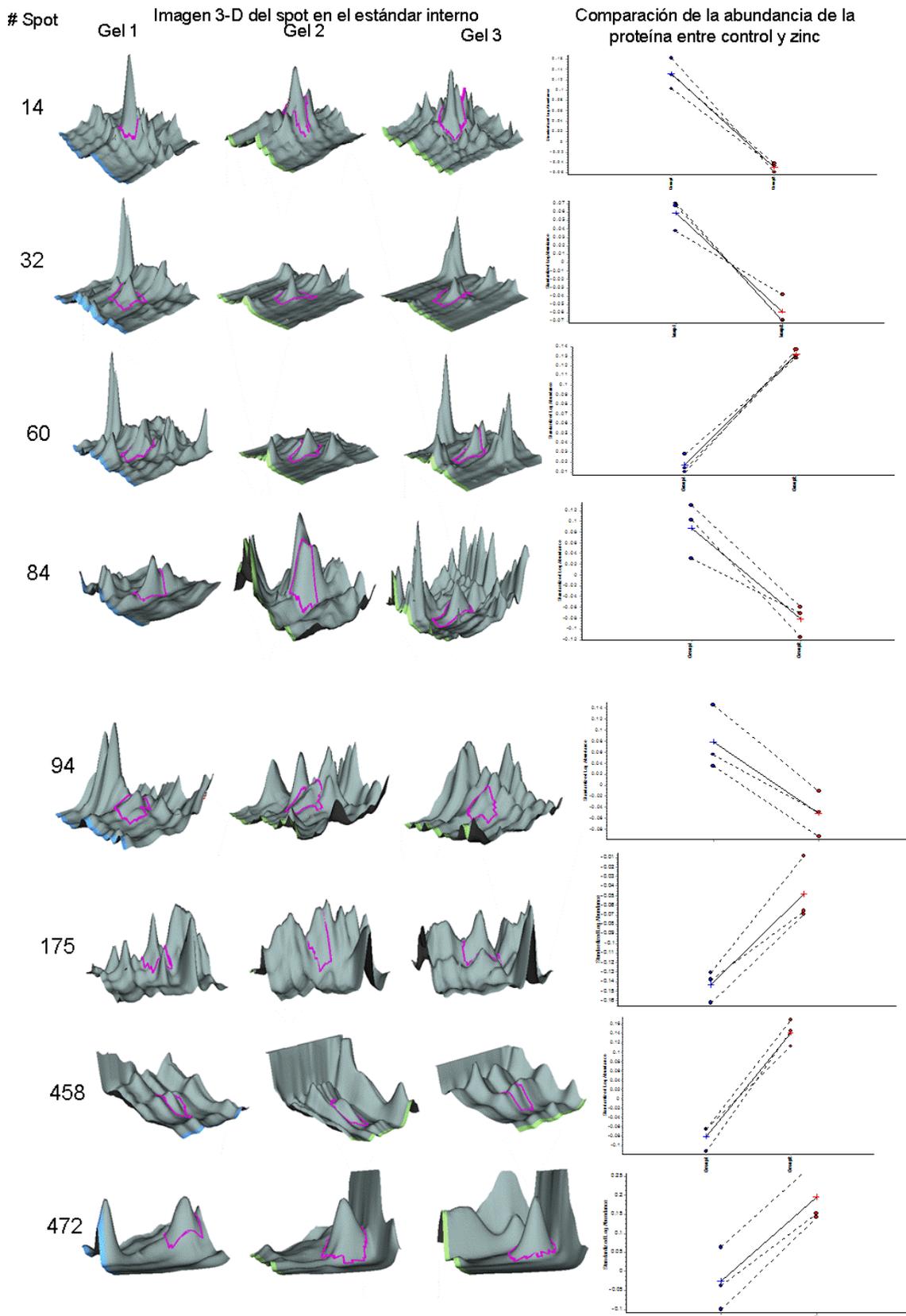
# Spot	t-Test Student (p)*	Diferencia promedio en expresión
14	0.00052	-1.52
32	0.0014	-1.31
60	0.000051	1.30
84	0.0075	-1.48
94	0.03	-1.35
175	0.012	1.25
458	0.00059	1.67
472	0.03	1.66

\* Probabilidad de exclusión  $\leq 0.03$



**Figura 6.26** Imagen de Cy2 del gel master. Se muestra la localización de cada uno de los spots que aumentaron (60, 175, 458, 472) y disminuyeron (14, 32, 84, 94) su expresión significativamente ( $p \leq 0.03$ ) entre el control y la muestra tratada con zinc.

En la Figura 6.27, se muestra una representación tridimensional (3-D) de las variaciones de los niveles de expresión de cada spot en cada uno de los geles y una gráfica de la expresión diferencial de cada spot entre el control y en tratamiento con zinc.



**Figura 6.27** Representaciones en 3-D y tendencia de expresión de cada spot. Representaciones en 3-D en cada uno de los spots en los tres gels usando la imagen del estándar interno (Imagen Cy2). La línea morada muestra la delimitación de cada spot.

A la derecha, gráficas que muestran la expresión diferencial del mismo spot en el grupo control (círculos azules) y en el grupo de zinc (círculos rojos) en cada uno de los tres experimentos independientes.

Los ocho spots marcados en la Figura 6.26, fueron aislados de cada uno de los tres geles con un cortador automatizado y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior secuenciación e identificación mediante un análisis de espectrometría de masas.

## 7. DISCUSIÓN

El tonoplasto de las células vegetales es residencia de muchas proteínas de transporte esenciales para el funcionamiento de la vacuola, incluyendo aquellas proteínas responsables de la compartimentalización y almacenamiento de iones tóxicos, como los metales pesados (McGrath & Zhao, 2003). El progreso en la identificación de las proteínas responsables para estas actividades ha sido lento y hay muchos procesos para los que los transportadores responsables han permanecido desconocidos (Jaquinod, 2007). Por eso, con la idea de identificar proteínas cuya expresión responda a la presencia de metales pesados, se planteó el presente estudio para analizar cambios en el proteoma del tonoplasto cuando las plantas son tratadas con zinc.

Un aspecto crítico de este trabajo fue el uso de fracciones de tonoplasto puro como material inicial para el estudio proteómico. Para la obtención de dichas fracciones puras, se utilizó la técnica de Electroforesis Zonal de Flujo Libre, cuyas ventajas en este tipo de estudios, se discuten a continuación.

### **Electroforesis Zonal de Flujo Libre (FFZE)**

Para fraccionar las proteínas de membrana con base en sus características físico-químicas, es decir, según la carga superficial de la endomembrana (Rolland et al., 2006), se usó la técnica de Electroforesis Zonal de Flujo Libre.

En el laboratorio se estandarizaron las condiciones para la FFZE que permitieran aislar tonoplasto observándose que cuando la muestra se resuelve en el aparato en presencia de ATP<sup>4-</sup>, se tiene una migración de la fracción del tonoplasto hacia el ánodo, lo cual indica que el tonoplasto ha sido cargado negativamente, neutralizando las cargas positivas en la membrana como se demostró en el laboratorio (Barkla et al., 2007). La optimización de la técnica para determinar las condiciones en las que se corre la muestra y obtener la separación máxima de endomembranas asegurará un rendimiento alto y reproducible de tonoplasto muy puro. Previamente, hemos demostrado que la presencia de 6mM de ATP durante la

electroforesis zonal de microsomas de la planta halófito *M. crystallinum*, resulta en un migración del tonoplasto lejos del pico principal de membrana hacia el cátodo, como lo reporta Morré et al. (1994) para la separación de compartimentos acídicos de células de mamífero. Esto se debe probablemente a la unión del ATP<sup>4-</sup> a la membrana y por lo tanto, al aumento de la carga negativa en la superficie de la misma debido al escrutinio de cargas positivas en la membrana como lo demuestran Barkla y colaboradores (2007). La fracción correspondiente al tonoplasto de *A. thaliana* también muestra una clara migración hacia el ánodo en presencia del nucleósido (Fig. 6.16), tanto en plantas control como en plantas tratadas con zinc (Fig. 6.20). El tonoplasto se encuentra puro en las fracciones 42 a 47 de ambas condiciones, como se confirmó por western blot (Fig. 6.19), lo cual demuestra que la electroforesis por flujo libre fue capaz de separar a la fracción del tonoplasto de las demás endomembranas obteniéndose una fracción altamente pura. Como se muestra en la Figura 5.19, el marcador del Golgi sobrelapa en 8 de las 23 fracciones donde está presente el tonoplasto. El sobrelape podría deberse al papel del Golgi en la biogénesis de la vacuola y a la similitud en las propiedades de membrana entre estos compartimentos, así como el transporte vesicular del Golgi hacia la vacuola y una comunicación extensa entre estas dos endomembranas (Bo Jin et al., 2001; Carter et al., 2004).

Métodos tradicionales para la separación de membranas, como gradientes de sacarosa, no son tan eficientes para la obtención de tonoplasto o de alguna otra endomembrana de forma pura. Se observa en trabajos publicados, que marcadores para Golgi o retículo endoplásmico traslapan con fracciones marcadas para el tonoplasto (Vera-Estrella et al., 2004). Otros estudios proteómicos han reportado el aislamiento del tonoplasto después de una digestión enzimática de células en suspensión, seguida por un gradiente de Ficoll o de Percoll, pero han identificado proteínas contaminantes de retículo endoplásmico, mitocondria y cloroplasto (Jaquinod et al., 2007, Shimakoa et al., 2004). Carter y colaboradores (2004) reportan contaminación de mitocondria, cloroplasto y retículo endoplásmico y el

enriquecimiento de su fracción del tonoplasto es pobre, ya que solamente el 11.4% del total de proteínas encontradas son transportadores, el 23.9% son proteínas de membrana y el resto son proteínas solubles. Jaquinod y colaboradores (2007) obtienen a través de un gradiente de Ficoll de cultivos celulares de *Arabidopsis*, 416 proteínas como pertenecientes al tonoplasto y de ellas el 46.5% se consideran proteínas de membrana por la presencia de uno o más dominios transmembranales predichos. Utilizando un gradiente de Percoll, Shimaoka y colaboradores (2004) caracterizaron 163 proteínas como pertenecientes al tonoplasto y sólo 17 (10.43%) fueron identificados como transportadores de 39 proteínas que poseen más de dos dominios transmembranales. Por lo tanto, no se puede confiar en la pureza de estas fracciones y tampoco designar con certeza a una proteína como perteneciente a esta membrana. En cambio, con una fracción purificada por FFZE de tonoplasto, se puede tener confianza en su localización (Ephritikhine et al., 2004). Además, es importante recalcar que en estos trabajos se trabajó con células en suspensión, cultivos celulares, excepto Carter et al (2004), que para fines prácticos de fitorremediación y de este proyecto, fue necesario aislar el tonoplasto de la parte aérea de plantas de *A. thaliana*.

## **2D-PAGE**

Una de las dificultades que presentan proteínas hidrofóbicas de membrana para su aislamiento y posterior identificación es su limitada solubilidad en agua. Para obtener geles de 2-D, las proteínas deberán separarse por su punto isoeléctrico y su peso molecular. Para la separación por su punto isoeléctrico evitando los problemas que presentan las proteínas de membrana mencionados anteriormente, se optimizó el uso de tiras de gel IPG que aumentan la solubilidad de las proteínas. Se probó la adición de detergentes a la muestra proteica para hidratar las tiras de IPG (Churchward et al., 2005) y así determinar las mejores condiciones para el electroenfoque. Aunque el SDS se utiliza de manera rutinaria para solubilizar proteínas de membrana durante la 2D-PAGE, este detergente no es compatible con el enfoque isoeléctrico de la primera dimensión, ya que el grupo cargado que posee y alteraría el pI de la

proteína a la que estuviera unido (Churchward et al., 2005). Por eso, es esencial utilizar detergentes eléctricamente neutros, para la solubilización. Un análisis sistemático de las propiedades de solubilización de detergentes iónicos neutros y no-iónicos, ha demostrado que los primeros son más exitosos porque no resultan en la agregación de proteínas (Hjelmeland, 1980). En este estudio se probó la efectividad de dos detergentes comercialmente disponibles, CHAPS y ASB-14, en la solubilización de proteínas de tonoplasto durante el IEF. Con el uso independiente de cada uno de los detergentes a una concentración del 2%, se pudo observar un barrido horizontal en los geles, que pudo deberse a una solubilización incompleta de proteínas de membrana por la tendencia de proteínas hidrofóbicas a precipitar fuera de solución en el gel. El barrido dificulta la definición de un spot porque sus límites se ven difusos, además spots de concentración baja, se pierden en el barrido y no es posible ubicarlos.

Se concluyó que el uso combinado de dos detergentes iónicos neutros (CHAPS y ASB-14) a una concentración final de 4%, mejora la solubilidad de las proteínas de membrana en las tiras IPG evitando su precipitación y permitiendo la obtención de geles de 2-D con spots de proteínas claramente definidos y minimizando el barrido (Fig. 6.22).

En los geles de 2-D de proteínas del tonoplasto que se obtuvieron de ambas condiciones experimentales, (control y tratamiento con zinc), se observaron a simple vista spots cuya expresión cambió, siendo clara la ausencia de algunas proteínas en el gel con los extractos provenientes de las plantas tratadas con zinc (Fig. 6.22). Esto sugiere que la presencia del zinc puede alterar la expresión de proteínas del tonoplasto. Para descartar que las diferencias se deban a variaciones experimentales se recurrió a la técnica de DIGE, que permite la comparación cuantitativa de la expresión de proteínas bajo dos condiciones diferentes, en este caso plantas control y plantas tratadas con zinc en un mismo gel.

## **Electroforesis en Gel Diferencial (DIGE)**

La técnica de Electroforesis en Gel Diferencial (DIGE) es una herramienta cuantitativa poderosa en experimentos proteómicos e involucra a la electroforesis en dos dimensiones (2-D) utilizando fluoróforos específicos para marcar las proteínas. DIGE permite la detección de cambios sutiles en la abundancia de proteínas con validez estadística, controlando la variación entre geles, así como variaciones adicionales de origen no biológico, como son por ejemplo, errores en la preparación de la muestra, variación normal en el sistema, etc. (Lilley & Friedman, 2004).

Ya que se han publicado artículos donde el estándar interno no contiene una porción representativa de todas las muestras experimentales, lo que dificulta enormemente la interpretación de resultados (Amme et al., 2006), para hacer un análisis exitoso por electroforesis en gel diferencial y asegurar que las diferencias encontradas en la expresión proteica son confiables, se realizó un diseño experimental cuidadoso (Figura 6.23 y Tabla 5.2), en el que se puso énfasis en cargar la misma cantidad de proteína (35  $\mu\text{g}$  por fluoróforo/105  $\mu\text{g}$  en total) e incluir al estándar interno, compuesto por una parte representativa de todas y cada una de las muestras en experimentación (Fig. 6.23) (Ndimba et al., 2005). Para poder realizar un análisis estadístico válido de los 3 experimentos independientes, en cada uno hay una muestra control y una tratada, el estándar interno se constituyó con una parte de las 6 muestras experimentales (5.83  $\mu\text{g}$  cada uno). En algunos estudios proteómicos publicados, donde no utilizan el fluoróforo Cy2 como estándar interno (Hu et al., 2003), hay fallos experimentales que anulan la ventaja de la acción normalizadora de este control, poniéndose en duda si la variación proteica observada proviene de diferencias experimentales o biológicas, lo que conlleva a un aumento en el número de geles necesarios para tener un resultado significativo.

Con el uso correcto del estándar interno, se pudo normalizar la expresión de las proteínas del tonoplasto en los tres experimentos independientes y hacer un análisis

estadístico que reveló a las proteínas que mostraron una diferencia biológica significativa en su expresión entre la condición control y la tratada con zinc. El análisis estadístico arrojó 60 proteínas cuya expresión cambia significativamente con una  $p < 0.05$ , ya sea aumentando o disminuyendo su expresión respecto a la condición control. Estas proteínas representan el 12.42% de las proteínas consideradas en el análisis, lo cual es una indicación indirecta de que el análisis es de buena calidad, ya que un buen porcentaje de proteínas mantuvieron su nivel a pesar de la presencia del zinc y formarían parte de las proteínas que participan en mantener el metabolismo celular en las células vegetales. El uso de un intervalo de confianza más estricto ( $p \leq 0.03$ ) permitió disminuir la selección de falsos positivos. Se escogieron ocho proteínas que cumplieron con el nivel de confianza, de las cuales cuatro (spots 60, 175, 458, 472) aumentaron y cuatro disminuyeron (spots 14, 32, 84, 94) (Tabla 5.3; Fig. 5.26) su expresión significativamente. Este resultado confirma la hipótesis de este trabajo, porque en la presencia del metal pesado, hubo una diferencia en la composición proteica del tonoplasto de *A. thaliana*.

La mayoría de los spots se ubicaron en un intervalo de pH entre 5 y 9, lo cual es común para el pI de proteínas de membrana en *A. thaliana* (Ephritikhine et al., 2004), sólo una proteína elegida (spot 472) posee un pI más ácido,  $4 \geq \text{pH} \leq 5$ . En cuanto a la masa molecular de las proteínas seleccionadas, casi todas cayeron dentro del intervalo entre 30 y 100 kDa, que presentan la mayoría de las proteínas de membrana en *A. thaliana* (Ephritikhine et al., 2004), las excepciones fueron los spots 458 y 472 que poseen un peso molecular entre 25 y 30 kDa respectivamente. De forma interesante varias de las proteínas membranales previamente identificadas en el tonoplasto poseen pesos moleculares en este intervalo, incluyendo muchas isoformas de canales de agua (Johansson et al., 2000).

Todas las proteínas elegidas aumentaron o disminuyeron su expresión al menos una vez, pero en proporciones diferentes específicas del spot. La que más aumentó su expresión fue la 458 (1.67 veces) y la que más disminuyó es la 14 (-1.52 veces). Las proteínas 60 y 175

parecen tener una expresión muy baja en el control, pero el tratamiento con zinc aumentó su expresión 1.3 y 1.25 veces respectivamente, si bien, su expresión continúa siendo baja en comparación al resto de las proteínas (Tabla 6.3; Figura 6.27). Las proteínas 84 y 94 mostraron una expresión relativamente alta en la condición control, disminuyendo 1.48 y 1.35 veces cuando las plantas son fueron expuestas al zinc (Tabla 6.3; Fig. 6.27).

Confirmada la hipótesis propuesta, ya que se pudo observar que la expresión de varias proteínas fue alterada por la exposición de las plantas de *A. thaliana* al zinc, queda pendiente profundizar en el estudio de los polipéptidos elegidos y para tratar de comprender el papel de cada una de estas proteínas en el metabolismo de la planta y eventualmente manipularlas biotecnológicamente para diseñar plantas útiles en fitorremediación.

Aunque se puede ganar información muy útil de este estudio proteómico diferencial usando a *A. thaliana* como organismo modelo, no se puede ignorar la relevancia de usar *A. halleri* que es una especie mucho más tolerante a metales pesados y muestra las características deseadas de una planta hiperacumuladora de metales. Sin embargo, para usar a *A. halleri* como organismo modelo se requiere del diseño de estrategias de propagación alternativas que no dependan de la germinación de semillas, cuya disponibilidad y viabilidad es limitada. Además en nuestro caso, aquellas plantas que se obtuvieron de semillas no desarrollaron inflorescencia. En este estudio se usaron varias técnicas de propagación, incluyendo enraizamiento por estolones (Fig. 6.2) y hojas (Fig. 6.3) y regeneración in directa *in vitro* por la generación y rediferenciación de callo (Figs. 6.4 a 6.7). La técnica más exitosa fue la el cultivo *in vitro* con una tasa de regeneración del 80% en 17 semanas de callo a producción de plántula. Nuestro método resultó ser mucho más eficiente que un reporte anterior para la regeneración de *A. halleri* (Dal Corso et al., 2005), en este trabajo sólo pudieron obtener estructuras embriogénicas de callo de raíces, con una tasa de regeneración de 40%. Además, su callo de tejido foliar, se oxidó después de dos semanas de crecimiento (Dal Corso et al., 2005). En resumen, se propone una nueva técnica muy exitosa de propagación *in vitro* de *A.*

*halleri* para la producción de plantas capaces de alcanzar la madurez y producir inflorescencia (Fig. 6.8). El haber logrado esto, nos permitirá continuar con el estudio proteómico del tonoplasto de *A. halleri* con el objetivo de identificar aquellas proteínas responsables de la acumulación de diferentes metales en la vacuola de las partes aéreas de la planta. Esta metodología también abre la posibilidad de producir en gran escala plantas de *A. halleri* para su empleo en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

## 8. CONCLUSIONES

Conocer el tipo de proteínas presentes en el tonoplasto que funcionan en la tolerancia a metales pesados, ayudará a comprender los procesos por los que las plantas contienden con la presencia de concentraciones tóxicas de estos contaminantes, ya sea almacenándolo, quelándolo o regulando a otras proteínas para que lo hagan. En este sentido, las conclusiones más relevantes derivadas de este trabajo son:

- La exposición de las plantas a un metal pesado, zinc, altera la expresión proteica del tonoplasto de células de mesófilo de *A. thaliana*.
- La electroforesis de flujo libre es una estrategia adecuada para aislar tonoplasto altamente puro.
- Por electroforesis en gel diferencial (DIGE), se identificaron 8 proteínas cuya expresión se altera en respuesta al tratamiento con zinc.
- El diseño de una técnica de propagación *in vitro* exitosa de *A. halleri* permitió tener suficiente material para el aislamiento de la fracción microsomal.

## 9. PERSPECTIVAS

Para continuar estudiando la dinámica de la vacuola en respuesta a metales pesados, en el caso particular de *A. thaliana* es necesario:

- Identificar las proteínas que presentaron una expresión diferencial significativa para contextualizar su papel en la tolerancia a metales pesados.
- Hacer un estudio comparativo de la expresión de proteína del tonoplasto de *A. halleri* en la presencia y ausencia de metales pesados.
- Realizar un estudio comparativo de la respuesta a metales pesados para entender las diferencias en los mecanismos de tolerancia a metales entre una planta tolerante (*A. thaliana*) y una hiperacumuladora (*A. halleri*).

El conocimiento generado de este tipo de estudios, eventualmente puede ser aplicado en el diseño de plantas que puedan ser útiles en fitorremediación, el enriquecimiento nutritivo de plantas ó biofortificación, en fitominería, entre otros.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alkorta I., Hernández-Allica, J., Becerrill J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C. 2004. **Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Metals and Metalloids Such As Zinc, Cadmium, Lead and Arsenic.** *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3: 71-90.

Alonso-Blanco, C, Korneef, M. 2000. **Naturally occurring variation in Arabidopsis: and underexploited resource for plant genetics.** *Trends in Plant Science.* 5: 22-29.

Amme, S.; Matros, A., Schleiser, B., Mock, H-P. 2006. **Proteome analysis of cold stress response in Arabidopsis thaliana** using DIGE-technology. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1737-1546.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. **Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana.** *Nature*, 408: 796-815.

Arrivault, S., Senger, T., Krämer, U. 2006. **The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply.** *The Plant Journal.* 46: 861-879.

Barbier-Brygoo, H., Joyard, J. 2004. **Focus on plant proteomics.** *Plant Physiology and Biochemistry.* 42: 913-917.

Barkla, B.J., Pantoja, O. 1996. **Physiology of Ion Transport Across the Tonoplast of Higher Plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 47: 159-184.

Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Pantoja, O. 2007. **Enhanced Separation of Membranes during Free Flow Zonal Electrophoresis in Plants.** *Analytical Chemistry.* 79: 5181-5187.

Barkla, B.J., Zingarelli, L., Blumwald, E. & Smith J.A.C. 1995. **Tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport Activity and its Energization by the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the Halophytic Plant Mesembryanthemum crystallinum.** *Plant Phys.* 109: 549-556.

Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2005. **Cadmium toxicity in plants.** *Braz J. Plant Physiol.* 17: 21-34.

Bert, V., MacNair M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D. 2000. **Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of Arabidopsis halleri (Brassicaceae).** *New Phytol.* 146 : 225-233.

Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N. 2003. **Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in Arabidopsis halleri.** *Plant and Soil.* 249 : 9-18.

Beyer, W.N., Pattee, O.H., Sileo, L., Hoffman, D.J., Mulhern, B.M. 1985. **Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters.** *Environmental Pollution (Series A)* 38: 63-86.

- 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.
- Canut, H., Bauer, J., Weber, G. 1999. **Separation of Plant Membranes by Electromigration Techniques.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 722: 121-139.
- Carter C.J., Bednarek, S.Y., Raikhel, N.V. b. 2004. **Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches.** *Current Opinion in Plant Biology.* 7:701-707.
- Carter, C.J., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., Raikhel, N.V. a. 2004. **The Vegetative Vacuole Proteome of *Arabidopsis thaliana* Reveals Predicted and Unexpected Proteins.** *The Plant Cell.* 16 : 3285-3303.
- Chaney, R.L. 1993. **Zinc phytotoxicity. In: Zinc in soil and plants.** 135-150. Robson, A.D., ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Neatherlands.
- Chaney, R.L., Li, Y.M., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chin, M. 2000. **Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress.** En: Terry, N, and Bañuelos G Eds. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water.* Lewis Publishers, Boca Raton. 129-159.
- Churchward, M.A., Butt, R.H., Lang, J.C., Hsu, K.K., Coorssen, I.R. 2005. **Enhanced detergent extraction for analysis of membrane proteomes by two-dimensional gel electrophoresis.** *Proteome Science.* 3: 5-16.
- Clark, R.B. 1992. **Marine Pollution.** 3<sup>rd</sup> Edition. 135-136. Clanedon Press Oxford.
- Clemens, S. 2001. **Molecular Mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.** *Planta.* 212 : 475-486.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U. 2002 julio. **A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation.** *TRENDS in Plant Science.* 7: 309-315.
- Cobbett, C.S. 2000. **Phytochelatin and Their Role in Heavy Metal Detoxification.** *Plant Physiology.* 123: 825-832.
- Cosio, C., Martinoia E., Keller, C. 2004. **Hyperaccumulation of Cadmium and Zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level.** *Plant Physiology.* 134 : 716-725.
- Costa, G., Morel. J.L. 1994. **Water relations, gas Exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce.** *Plant Physiol. Biochem.* 32 : 59-64.
- Dal Corso, G, Borgato, L., Furini, A. **In vitro plant regeneration of the heavy metal tolerant and hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 82: 267-270.

David-Assael, O., Saul, H., Mizrachy-Dagri, T., Berezin, I., Brook, E., Shaul, O. **Expression of AtMHX, an Arabidopsis vacuolar metal transporter, is repressed by the 5' untranslated region of its gene.** *Journal of Experimental Botany*. 56 : (413) : 1039-1047.

Desbrosses-Fonrouge, A-G., Voigt, K., Schröder, A., Arrivault, S., Thomine, S., Krämer, U., 2005. **Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation.** *Federation of European Biochemical Sciences*. 579: 4165-4174.

Dhugga, K.S., Tiwari, S.C., Ray, P.M. 1997. **A reversibly glycosylated polypeptide (RGP19 possibly involved in plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans-Golgi localization.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7679-7684.

Dietz, A.C. & Schnoor, J.L. 2001. **Advances in Phytoremediation.** *Environmental Health Perspectives Supplements* Suppl1: 109.

Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge A-G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou- Laprade P., Krämer, U. 2004. **Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels.** *The Plant Journal*. 39: 425-439.

Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peter S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E., Schmidt, U.G. (2006). **Identification of vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis Mesophyll Cell by a Tonoplast Proteomic Approach.** *Plant Physiology*. 141: 196-207.

Ephritikhine, G., Ferrob, M., Rolland, N. 2004. **Plant membrane proteomics.** *Plant Physiol. Biochem.*42:943-962

Fosmire, GJ. 1990. **Zinc toxicity.** *Am J Clin Nutr*. 51 : 225-7.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Okima, K. **Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.** *Experimental Cell Research*. 50: 151-153.

Graves, P.R., Haystead, T.A.J. 2002. **Molecular Biologist's Guide to Proteomics.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 39-63.

Guerinot, M.L. 2000. **The ZIP family of metal transporters.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465 : 190-198.

Hadjuch, M., Rakwal, R., Kumar Agrawal, G., Yonekura, M., Pretova, A. 2001. **High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins.** *Electrophoresis*. 22 : 2824-2831.

Hall, J. L., Williams, L.E. 2003. **Transition metal transporters in plants.** *Journal of Experimental Botany*, 54 (393): 2601-2613.

Hall, J.L. 2003. **Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance.** *Journal of Experimental Botany*. 53 (366) : 1-11.

Hannig, K., Heidrich, H.C. 1974. **The use of continuous preparative free-flow electrophoresis for dissociating cell fractions and isolation of membranous components.** *Methods in Enzymology*. 31:746-761.

Hawkins, E. & David, O.E. 2005. **2-D Difference Gel Electrophoresis-an accurate quantitative method for protein analysis.** . En: Jorde, L.B., Little, P.R.R., Dunn, M.J., Subramaniam, S. (Eds.). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, Hoboken, NJ John Wiley & Sons.

Hirschi, K.D. 1999. **Expression of Arabidopsis CAX1 in Tobacco: Altered Calcium Homeostasis and Increased Stress Sensitivity.** *The Plant Cell*. 11 : 2113-2122.

Hirschi, K.D., Korenov, V.D., Wilganowski, N.L., Wagner, G.J. 2000. **Expression of Arabidopsis CAX2 in Tobacco. Altered Metal Accumulation and Increased Manganese Tolerance.** *Plant Physiology*. 124 : 125-133.

Hirschi, K.D., Zhen, R-G., Cunningham, K.W., Rea, P.A. & Fink, G.R. 1996. **CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from Arabidopsis.** *Plant Biology*. 93 : 8782-8786.

Hjelmeland, L.M. 1980. **Nondenaturing Zwitterionic Detergent for Membrane Biochemistry: Design and Synthesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 6368-6370.

HMRC, The Heavy Metals Remediation Committee. 2000. **Cleaning up: Suggestions for Homeowner's Heavy Metal Remediation.** Disponible en: [www.iere.org/Vashon/cleaning-up.html](http://www.iere.org/Vashon/cleaning-up.html). Accesado: 2005 marzo 4.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1938. **The water culture method for growing plants without soil.** *Calif Exp Stn*. 347 : 1-39.

IARC. Internacional Agency for Research on Cancer. 1999. Disponible en: <http://www.iarc.fr/> y en: <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/indexes/vol11index.html>. Accesado: 2005 febrero15.

Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugovieux, V., Bruley, C., Garin, J., Bourguignon, J. 2007. **A Proteomics Dissection of Arabidopsis thaliana Vacuoles Isolated from Cell Culture.** *Molecular & Cellular Proteomics*. 6: 394-412.

Järup, L. 2003. **Hazards of heavy metal contamination.** *British Medical Bulletin*. 68 : 167-182.

Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W., Hwang, I. 2001. **A New Dynamin-Like Protein ADL6, is involved in Trafficking from the trans-Golgi Network to the Central Vacuole in Arabidopsis.** *The Plant Cell*. 13: 1511-1526.

Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., Kjellbom, P. 2000. **The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 324-342.

Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T., Maeshima, M.(2004. **Zinc transporter of Arabidopsis thaliana AtAMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis.** *Plant Cell Physiology*. 45: 1749-1758.

- Koch, M., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. 2001. **Molecular Systematics of the Brassicaceae: evidence from coding plastidic *MATK* and nuclear *CHS* sequences.** *Am. J. of Botany*. 88: 534-544.
- Krämer, U. & Chardonnens, A.N. 2001. **The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements.** *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 661-672.
- Krämer, U. a. 2005. **Phytoremediation: novel approaches to clearing up polluted soils.** *Current opinion in Biotechnology*. 16 : 133-141.
- Krämer, U. b. 2005. **MTP1 mops up excess zinc in Arabidopsis cells.** *Trends in Plant Science*. 10: 313-315.
- Krämer, U., Talke, I. N., Hanikenne, M. **Transition Metal Transport.** *FEBS Letters*. 581 : 2263-2272.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F-J., McGrath, S.P. 2000. **Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*.** *Planta*. 212 : 75-84.
- Laemmli, U.K. 1970. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature* 227: 680-685.
- Lambert, M., Leven, B.A. & Green, R.M. 2001. **New Methods of Clearing Up Heavy Metal In Soils and Water.** *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens*. Hazardous Substance Research Centers. Disponible en: <http://www.engg.ksu.edu/HSRC/Tosc/metals.pdf>. Accesado: 2005 marzo 5.
- Lasat, M.M. **Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues.** *Journal of hazardous substance research*. Kansas State University. Volume 2. 5: 1-25.
- Lees, Z.M. & Senior, E. 1995. **Bioremediation: A practical solution to land pollution.** En: Kirkwood RC, Longley AJ, editors. *Clean Technology and the Environment*. London: Glasgow: Blackie Academic & Professional. p 120-121.
- Lilley, K. 2002. **Protein Profiling using Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE).** *Current Protocols in Protein Science*. Gel-Based Proteome Analysis. 22.2.1-22.2.14.
- Lilley, K., Friedman, D.B. 2004. **All about DIGE: quantification technology for differential display 2-D gel proteomics.** *Expert Rev. Proteomics* 1 : 401-409.
- Lim, T-T., Tay, J-H. & Wang, J-Y. 2004 January. **Chelating-Agent-Enhanced Heavy Metal Extraction from a Contaminated Acidic Soil.** *J. Eviron. Engrg.* 130 : 59-66.
- Liu G., Sánchez-Fernández, R., Li, Z-S., Rea, A.P. 2001. **Enhanced Multispecificity of Arabidopsis Vacuolar Multidrug Resistance-associated Protein-type ATP-binding Cassette Transporter, AtMRP2.** *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 8648-8656.

Lu, Y-P., Li, Z-S., Drozdowicz, Y.M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P.A. **AtMPR2, an Arabidopsis ATP Binding Cassette Transporter Able to Transport Glutathione S-Conjugates and Chlorophyll Catabolites: Functional Comparisons with AtMRP1.** *The Plant Cell*. 10: 267-282.

Luche, S., Santoni, V., Rabilloud, T. 2003. **Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis**. *Proteomics*. 3: 249-253.

Maeshima, M. 2001. **Tonoplast Transporters : Organization and Function.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 : 469-497.

McGrath, S.P. & Zhao, F-J. 2003. **Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils.** *Current Opinion in Biotechnology*. 14 : 277-282.

Meagher, R.B. 1998. **Phytoremediation: an affordable, friendly technology to restore marginal lands in the twenty-first century.** Colloquium de la Conferencia en el Beckman Center of the Nacional Academy of Sciences, UC Irving; 1998 diciembre 5-6; USA. Disponible en: <http://www.lsc.psu.edu/nas/Panelists/Meagher%20comment.html>. Accesado: 2005 marzo 4.

Ministry of Environment, Japan. (2002) Soil and Groundwater Contamination Survey and Countermeasure Technologies. **Cleaning Contaminated Soil Using the Steam Heating Method.** Disponible en: [http://nett21.gec.jp/SGC\\_DATA/EN/html/sgce-054.html](http://nett21.gec.jp/SGC_DATA/EN/html/sgce-054.html). Accesado: 2005 marzo 3.

Moctezuma, J.M. 1995. **Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de Cadmio, Arsénico, Plomo, Estaño, Cobre, Fierro, Zinc y Mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.** *Diario Oficial de la Federación*. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/117ssa14.html>. Accesado: 2006 abril 8.

Morré, D.J., Lawrence, J., Safranski, K., Hammond, T., Morré D.M. 1994. **Experimental basis for separation of membrane vesicles by preparative free-flow electrophoresis.** *Journal of Chromatography A*, 668: 201-213.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.** *Physiol Plant*.15:473-497.

Ndimba, B. K., Chivasa, S., Simon, W.J., Slabas, A.R. 2005. **Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Proteomics*: 5: 4185-4196.

Nelson, D.E., Glausinger, B., Bonhert, H.J. 1997. **Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of Arabidopsis thaliana.** *Plant Physiology*. 114: 29-37.

Neuhaus, J-M., Martinoia, E. 2001. **Plant Cell Vacuoles.** of life sciences [monografía en línea]. Disponible por: Nature, [http://www.els.net/els/public/search/search\\_public.asp](http://www.els.net/els/public/search/search_public.asp).

Nevo, Y., Nelson, N. 2006. **The NRAMP family of metal-ion transporters**. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763: 609-620.

NRCS, Natural Resources Conservation Service. United States Department of Agriculture. USA. 2000. **Heavy Metal Soil Contamination**. Soil Quality Urban Technical Note No.3 (septiembre). Disponible en: [http://www.il.nrcs.usda.gov/technical/engineer/urban/tech\\_notes/technote3.html](http://www.il.nrcs.usda.gov/technical/engineer/urban/tech_notes/technote3.html). Accesado: 2005 marzo 3.

Nriagu, J.O. 1996. **A History of Global Metal Pollution**. *Science* (272) : 223-224.

Nyborg, J. K., Peersen, O.B. (2004). **That zincing feeling : the effects of EDTA on the behaviour of zinc-binding transcriptional regulators**. *Biochem J*. 381: e3-e4.

Parets-Soler, A, Pardo, J.M., Serrano, R. 1990. **Immunocytolocalization of plasma membrane H1-ATPase**. *Plant Physiol*. 93: 1654–1658.

Parker, D.R., Norvell, W.A., Chaney, R.L. 1995. **GEOCHEM-PC: A chemical speciation program for IBM and compatible computers**. En: RH Loeppert, AP Schwab, S Goldberg, eds, Chemical Equilibrium and Reaction Models, Special Publication 42. *Soil Science Society of America*, Madison, WI. 253–269.

Parry, R.V., Turner, J.C., Rea, P.A. 1989. **High purity preparations of higher plant vacuolar H1-ATPase reveal additional subunits: revised subunit composition**. *J Biol Chem* 264: 20025–20032.

Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. 1999. **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry**. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.

Pilon-Smits, E, Pilon, M. 2002. **Phytoremediation of Metals using Transgenic Plants**. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21: 439-456.

Pilon-Smits, E. 2004. **Phytoremediation**. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 15-39.

Pollard, A.J., Dandridge Powell K., Harper, F.A. & Smith J.A.C. 2002. **The Genetic Basis of Metal Hyperaccumulation in Plants**. *Critical Reviews in Plant Sciences*. (21) : 539-566.

Reuss, L. 2001. **Ion Transport Across Nonexcitable Membranes**. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. 2-4.

Robinson, E., Fernández, J-E., Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M., Green, S., Clothier, B. **Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability**. *Plant and Soil*. 249: 117-125.

Rogers, E.E., Eide D.J., Guerinot, M.L. 2000. **Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter**. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 97 : 12356-12360.

Rolland, N, Ferro, M., Ephritikhine, A.M., Ramus, C., Brugiere, S., salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Bourguignon, J., Barbier-Brygoo, H., Joyard, J., Garin, J. 2006. **A versatile**

**method for deciphering plant membrane proteomes.** *Journal of Experimental Botany*. 57: 1579-1589.

Ryan C. A. & Walker-Simmons M. (1983). **Plant vacuoles.** *Methods Enzymol* 96: 580-589.

Salt, D.E., Smith, R.D. & Raskin, I. 1998. **Phytoremediation.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49 : 643-668.

Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann J-L., Traverse, A., Marcus M.A., Manceau, A. 2002. **Forms of Zinc Accumulated in the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*.** *Plant Physiology*. 130 : 1815-1826.

Sazuka, T., Keta, S., Shiratake, K., Yamaki, S., Shibata, D. 2004. **A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* for peptide sequencing.** *DNA Research*. 22: 101-113.

Schat, H., Ten Bookum W.M., 1992. **Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*.** *Heredity*. 68 : 219-229.

SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. 2000 **Informe de la situación del medio ambiente en México.** Suelos. 2002. Disponible en: [http://www.semarnat.gob.mx/estadisticas\\_2000/informe\\_2000/img/cap3.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/estadisticas_2000/informe_2000/img/cap3.pdf). Accesado: 2004 febrero.

Shi, H., Zhu, J-K. 2002. **Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid.** *Plant Molecular Biology*. (50) 3 : 543-50.

Shigaki, T., Barkla, B.J. Miranda-Vergara, M.C. Zhao, J. Pantoja, O. Hirschi, K. D. 2005. **Identification of a crucial histidine involved in metal transport activity in the *Arabidopsis* cation/H<sup>+</sup> exchanger *CAX1*.** *J Biol Chem*. 280 : 30136-30142.

Shimakoa, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K-I., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K-I., Mimura, T. 2004. **Isolation of Intact Vacuoles and Proteomics Analysis of Tonoplast from Suspension-Cultured Cells of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiology*. (45) 6 : 672-683.

Shmaefsky, B.R. 2002. **Heavy Metal Tolerant Transgenic Plants.** Disponible en: [http://www.plantstress.com/Articles/up\\_toxicity\\_files/Phytorem.htm](http://www.plantstress.com/Articles/up_toxicity_files/Phytorem.htm). Accesado: 2005 marzo 3.

Schmidt, U.G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A., Schnell, M., Neuhaus, H.E., Marty-Mazars, D., Marty, F., Baginsky, S., Martonoia, E. 2007. **Novel Tonoplast Transporters Identified Using a Proteomic Approach with Vacuoles Isolated from Cauliflower Buds.** *Plant Physiology*. 145: 216-299.

Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Hocroft, D.M., Jacobs, G. 2002. **Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection.** *New Phytologist*. 155: 349-361.

Stohs, S.J., Bagchi, D. 1995. **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** *Free Rad. Biol. Med*. 18 : 321-336.

- Szaponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J-C., Rossignol, M., Gibrat, R. 2004. **Large-scale characterization of integral proteins from *Arabidopsis* vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography.** *Proteomics*. (4) : 397-406.
- Theodoulou, F.L. 2000. **Plant ABC Transporters.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 79-103.
- Thomine, S., Lelièvre, S., Debarbieux, E., Scröder, J.I., Barbier-Brygoo H., 2003. **AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency.** *The Plant Journal*. 34 : 685-695.
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, M., Martinoia, E. 1998. **An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity.** *The Plant Journal*. 13: 773-780.
- Tyler, G., Pahlsson, A.M., Bengtsson, G, Baath E., Tranvik, L. 1989. **Heavy metal ecology and terrestrial plants, microorganism and invertebrates: a review.** *Water, Air. Soil Pollut.* 47 : 189-2150.
- US Army Environmental Center. 2003. Restoration Technology. **In Situ Elektrokinetic Remediation for Metal Contaminated Soils.** Disponible en: <http://aec.army.mil/usaec/technology/cleanup04a.html>. Accesado el 2005 2 marzo.
- Vara Prasad M.N., de Oliveira Freitas H.M. 2003. **Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology.** *Electronic Journal of Biotechnology*. 6 (3) : 285-321.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., Pantoja, O. 2004. **Novel Regulation of Aquaporins during Osmotic Stress 1.** *Plant Physiology*. 135: 2318-2329.
- Vera-Estrella, R., Blumwald, E., Higgins, V.J. (1992). **Effect of Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum* on Tomato Suspensión Cells.** *Plant Physiology*. 99: 1208-1215.
- VKI, Insititute for the Water Environment. 2003. **Analytical review of soil contaminated by heavy metals.** Disponible en: <http://www.mst.dk/udgiv/Publikationer/1998/87-709-133-4/html/default.htm>. Accesado: 2005 marzo 3.
- Watanabe, M.E. 1997. **Phytoremediaton on the brink of commercialization.** *Environmental Science & Technology/News*. 31 : 182-186.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., v. Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S. 2004. **Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotinamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potencial metal hyperaccumulation factors.** *The Plant Journal*. 37 : 269-281.
- Williams, L.E., Mills, R.F. 2005. **P<sub>1B</sub>-ATPases- an ancient family of transition metal pumps with diverse function in plants.** *Trends in Plant Science*. 10: 491-502.
- Willliams, L.E., Pittman, J.K., Hall.. J.L. 2000. **Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465 : 104-126.

Woolhouse, H.W. **Toxicity and tolerance in the responses of plant to metals.** In: O.L. Lange; P.S. Nobel; C.B. Osmond; H. Ziegler (Ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology*, Berlin, New Series, v.12C, p.245-300, 1983.

World Health Organization. 1992. **Cadmium.** Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization. Volumen 134.

Zhao, F.J., Lombi, E., Brendon, T., McGrath, S.P. 2000. **Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*.** *Plant, Cell and Environment*. 23 : 507-514.

## 11. APÉNDICE

### Medio Hoagland 0.5x

0.5 mM Fosfato de amonio  
3 mM Nitrato de potasio  
2 mM de Nitrato de calcio  
1 mM Sulfato de magnesio  
12  $\mu$ M Ácido bórico  
6.15  $\mu$ M Cloruro manganeso  
0.38  $\mu$ M Sulfato de zinc  
1.76  $\mu$ M Sulfato de cobre  
0.041  $\mu$ M Ácido molíbdico  
0.11 mM EDTA disódico  
0.1 mM Sulfato de fierro

### Murashige-Skoog (1962)

370 mg/l Sulfato de magnesio heptahidratado  
440 mg/l Cloruro de calcio dihidratado  
1,900 mg/l Nitrato de potasio  
1,650 mg/l Nitrato de amonio  
170 mg/l Fosfato diácido de potasio  
27.8 mg/l Sulfato de fierro heptahidratado  
37.3 mg/l EDTA de sodio  
22.3 mg/l Sulfato de manganeso tetrahidratado  
0.025 mg/l Sulfato cúprico pentahidratado  
0.025 mg/l Cloruro de cobalto hexahidratado  
0.83 mg/l Yoduro de potasio  
6.2 mg/l ácido bórico  
0.25 mg/l Molibdato de sodio  
30,000 mg/l sacarosa y glucosa  
100 mg/l Mioinositol  
0.5 mg/l Ácido nicotínico  
0.5 mg/l Piridoxina HCl  
0.1-1 mg/l Tiamina HCl