



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

Facultad de Química

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana* Y SU  
RESPUESTA A CONDICIONES DE ESTRÉS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO

PRESENTA

LUIS RAMÓN PERALES BAÑOS



México D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

***A mis padres Arturo y  
Victoria, por haberme hecho  
lo que soy ahora***

# Agradecimientos I

A CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto 43896Q con título “Identificación y caracterización de pirofosfatasas relacionadas con la respuesta a la deficiencia de fosforo en frijol común (*Phaseolus vulgaris*)” y por la beca otorgada dentro del marco del proyecto.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por el presupuesto otorgado por PAIP con clave 6290-09.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado un espacio donde viví grandes experiencias y por la formación integral que encontré en sus aulas y jardines.

## Agradecimientos II

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por haberme permitido llegar hasta donde he llegado y haber puesto en mi camino a todas las personas que hicieron posible la realización, no solo de ésta tesis, sino de toda mi vida estudiantil. Le doy gracias también por haberme otorgado la capacidad y la oportunidad de estudiar ésta carrera tan bonita y que me ha llenado de múltiples satisfacciones.

A mis padres Arturo Perales Quesada y Victoria Marcela Baños Clavel, por haber sido mi sustento, mi apoyo y mi luz guía en todos los proyectos que he emprendido y a quienes, sobre todo, debo el haberme dado el empuje y la fuerza necesarios para decidirme a estudiar esta carrera que me ha llenado de satisfacciones. A mi hermano Arturo Román Perales Baños por haber siempre estimulado mi formación profesional con el ejemplo. Mil gracias por sus múltiples consejos y por haber sido mis cimientos en los momentos de estrés, debilidad y de frustración que fueron en los que más los necesité. Los adoro. Esta tesis es para ustedes.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por haberme brindado la oportunidad de trabajar a su lado y haber aportado sus siempre útiles consejos para la realización de éste proyecto. Gracias por haber compartido conmigo una pequeña parte de sus vastos conocimientos, no solo en el aspecto académico, sino en una gran variedad de temas pero sobretodo por su calidez y su gran valor humano.

Agradezco también a la Q.F.B María Elena Cruz Núñez, por haberme enseñado el lado del mundo que desconocía y por haberme brindado siempre su infinita confianza y cariño. Mami, gracias por ayudarme a levantarme cada vez que estuve en el suelo y por ser capaz de ver más allá que el resto de la gente, sabes que siempre has ocupado un lugar muy especial en mi corazón aún en los momentos más difíciles para mí, gran parte de este trabajo fue posible gracias a todo lo que he aprendido de ti y contigo. Gracias por tu apoyo, tu paciencia y por aventurarte a hacer el viaje conmigo. Te amo mi princesita hermosa.

A mis grandes amigos de toda la vida el Ing. Alejandro Espinosa, la Q.A. Erika Reyes, el Ing. Christian Cortés, el Ing. Adrián Angeles, la Lic. Lorena Rosas y la Lic. Sandra Arroyo, por

nunca haberme abandonado en mi camino y haber contribuido, desde que los conocí, a mi formación humana compartiendo conmigo un sinúmero de experiencias que ayudaron a forjar nuestro carácter único y que forma parte de lo que soy actualmente. Saben que les tengo un lugar muy especial en mi corazón.

A mis amigos de la Facultad, Adriána Martínez, Arlene Calderón, Carolina Razo, Priscila Serrano, Alma Flores, Mariana Valdéz y Fernando Rodríguez, todos ellos, de un invaluable sentido moral y sobretodo una inmensa paciencia, por haber compartido su tiempo conmigo a lo largo de la carrera y más allá, con los cuales formé excelentes equipos de trabajo y de los cuales nunca dejé de aprender ni en el aspecto académico ni en el humano. Gracias por sus valiosos consejos, por haberme considerado digno de su amistad y por aguantarme durante tanto tiempo. Los quiero mucho.

A la familia Cruz Núñez, por haberme permitido formar parte de sus vidas y haberme contagiado de su gran valor humano. Por brindarme la oportunidad de compartir a su lado experiencias que han tocado mi vida y por su apoyo tan sincero en los momentos difíciles.

A todos mis compañeros y amigos de la facultad: Adriana Álvarez, Eric Aburto, Aurora Arroyo, Beleguixaiba Bazán, Daniel Bonnet, Armando Carrillo, Angélica Chicas, Alejandra Cortés, Lorena Espinosa, Juan Carlos Gómez, Laura Guzmán, Oscar Illescas, Fabiola Lemus, Sofía León, Iván Martínez, Elizabeth Mosqueda, Mabel Pallás, Dorys Ramos, Mariana Servín, Monserrat Torres, Adriana Vázquez, Oliver Walls, Gerardo Zavaleta y Nahúm Zepeta con los que también trabajé y compartí experiencias o que al menos tuve la oportunidad de conocer, pues aportaron su granito de arena en mi aprendizaje académico.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio 115 del Conjunto E de la Facultad de Química. A la M. en C. Lilián Valencia Turcotte, el M. en C. Eric Hernández Domínguez y al M. en C. Ernesto Navarro de la Sancha por haberme ayudado desde el principio a realizar de manera adecuada todas las técnicas utilizadas en este proyecto, por haberme aceptado cálidamente en su grupo de trabajo y haber hecho las arduas horas de trabajo mucho más amenas.

# Índice de contenido

Agradecimientos I.....	4
Agradecimientos II.....	5
Resumen.....	9
Abreviaturas.....	11
ANTECEDENTES.....	15
1.- La nutrición de las plantas.....	15
2.- El transporte de Pi en las plantas.....	18
3.- El pirofosfato (PPi) en los sistemas biológicos y las PPiasas.....	19
3.1.- Las PPiasas en las plantas superiores.....	23
4.- Respuesta de las plantas a estrés abiótico.....	24
4.1.- Estrés térmico.....	24
4.2.- Estrés osmótico.....	25
4.3.- Estrés salino.....	26
4.4.- Respuesta de las plantas a la deficiencia de fósforo.....	27
5.- Arabidopsis thaliana como modelo de estudio.....	28
6.- La clonación de plantas.....	29
6.1 Los vectores de clonación.....	29
6.2.- Uso del T-DNA como mutágeno.....	29
6.3.- Transformación de las plantas utilizadas en este trabajo.....	30
PLANTEAMIENTO PROBLEMA.....	32
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVOS.....	35
Objetivo general.....	35
Objetivos particulares.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Material.....	36
Sustancias.....	36
Material Biológico.....	36
Material para Biología Molecular y Microbiología.....	36
Medios para pruebas de estrés y crecimiento de las semillas.....	37
Métodos.....	38
Germinación de las semillas y crecimiento de las plantas.....	38
Extracción del RNA total.....	39
Cuantificación de RNA.....	40
Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	40
Ensayos de estrés.....	41
Estrés térmico a 4°C.....	41
Estrés térmico 45°C.....	42
Estrés osmótico.....	42
Estrés salino.....	42
Estrés por exceso de fosfato.....	42
Estrés por deficiencia de fosfato.....	43
Análisis de las características foliares de las plantas y análisis estadístico.....	43
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	44
Resultados.....	44
Fenotipo de las plantas.....	44

Selección de plantas con fenotipo distinto.....	46
Extracción de RNA.....	47
Cuantificación de RNA.....	47
RT-PCR.....	47
Pruebas de estrés.....	50
Estrés Térmico 4°C.....	50
Estrés Térmico 45°C.....	52
Estrés Osmótico.....	53
Estrés Salino.....	55
Estrés por exceso de fosfato.....	58
Estrés por deficiencia de fosfato.....	59
Análisis de resultados.....	62
CONCLUSIONES.....	66
PERSPECTIVAS.....	66
REFERENCIAS.....	67

## Resumen

La nutrición de las plantas depende de diversos factores que por su disponibilidad y accesibilidad del suelo son determinantes en su desarrollo. Uno de los nutrientes más destacados y que ha demostrado sin duda limitar en el crecimiento de las plantas es el fósforo. Lo anterior, aunado al amplio papel del fosfato inorgánico (Pi) en el metabolismo de macromoléculas y en la regulación metabólica, invitan a pensar que las pirofosfatasa, enzimas que hidrolizan el pirofosfato, juegan un papel importante en el mecanismo de reciclaje y utilización del fosfato, y por tanto, en el crecimiento y capacidad de las plantas de responder a condiciones de estrés.

Por su lado, las plantas, han desarrollado una amplia variedad de adaptaciones fisiológicas y bioquímicas que les permiten tener una concentración de Pi de varios órdenes de magnitud por encima de la concentración de fósforo asimilable del suelo. Además las plantas responden a la disminución del fósforo disponible en el suelo con el remodelado de la raíz, una utilización de Pi más eficiente y la activación de enzimas y genes que promueven su reciclaje.

En el proyecto actual se realizaron estudios sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* que poseen mutaciones en algunos de los genes que se han identificado que codifican para isoenzimas de pirofosfatasa, causando así la ausencia de la isoenzima correspondiente. Por medio de la utilización de técnicas de biología molecular ha sido posible estudiar y demostrar la presencia de dichas mutaciones y se ha estudiado entonces el efecto que la disfunción tiene sobre el desarrollo de la planta y sobre su capacidad de respuesta a condiciones de estrés tales como: estrés osmótico, salino, térmico y de exceso y deficiencia de fósforo. Los resultados muestran que la ausencia de la pirofosfatasa AtPPa1 resulta en plantas con notable tolerancia al estrés por calor, en tanto que la disminución en la expresión de la pirofosfatasa AtPPa4 resulta en plantas con notable tolerancia al estrés salino y mediana tolerancia al estrés por calor. Estos resultados indican que las isoformas de las pirofosfatasa juegan un papel muy relevante en el control de las respuestas al estrés y que no cumplen

papeles totalmente equivalentes en la planta, por lo que es valido pensar que no resultan de la simple redundancia genética. En esta primera etapa, los estudios se limitan a la observación del crecimiento y los cambios en la morfología. Lo que sienta las bases para trabajos posteriores de caracterización más detallada.

## Abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
AnF	Ancho foliar
ArF	Área foliar
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosín trifosfato fosfatasa
AtPPa1	Pirofosfatasa inorgánica soluble isoenzima 1
AtPPa4	Pirofosfatasa inorgánica soluble isoenzima 4
AtPPa1onA	Oligonucleótido izquierdo para amplificación del gen de pirofosfatasa isoenzima 1
AtPPa4onA	Oligonucleótido izquierdo para amplificación del gen de pirofosfatasa isoenzima 4
AtPPa1onB	Oligonucleótido derecho para amplificación del gen de pirofosfatasa isoenzima 1
AtPPa4onB	Oligonucleótido derecho para amplificación del gen de pirofosfatasa isoenzima 4
AtPPa1 <sup>ΔΔ</sup>	Mutante homóciga para la enzima AtPpa1
AtPPa4 <sup>Δ+</sup>	Mutante heteróciga para la enzima AtPpa4
At <sup>Δ</sup> <sub>Ppa1</sub>	Plantas con inserción de T-DNA en el gen que codifica para AtPpa1
At <sup>Δ</sup> <sub>Ppa4</sub>	Plantas con inserción de T-DNA en el gen que codifica para AtPpa4
BP	Pirmer central
C	Concentración
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico circular

CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DI	Distancia de la punta de la hoja al internodo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Dinucleósidos trifosfatados
EMS	Etilmetanosulfonato
F <sub>D</sub>	Factor de dilución
FeEDTA	Complejo hierro-ácido etilendiamintetracético
H <sup>+</sup> -ATPasa	Adenosin trifosfato fosfatasa dependiente de protones
H <sup>+</sup> -PPasa	Pirofosfatasa dependiente de protones
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico
hrs	Horas
iPPiase	Pirofosfatasa inorgánica
isPPiase	Pirofosfatasa inorgánica soluble
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato ácido de potasio
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio
kpb	Kilopares de bases
/	Longitud de la celda de cuarzo
LF	Largo foliar
LP	Primer izquierdo
mA	Miliamperes
MES	Ácido 4-morfolinetanosulfónico
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
mM	Milimolar

MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de manganeso
M <sub>x</sub>	Perteneiente a la generación "x" de un organismo mutante.
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO <sub>4</sub>	Hipoclorito de sodio
NaMoO <sub>4</sub>	Molibdato de sodio
NDP	Nucleósido difosfato
NMP	Nucleósido monofosfato
NTP	Nucleósido trifosfato
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrógeno
Pi	Fosfato inorgánico u ortofosfato
PPi	Pirofosfatasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
<i>qtr</i>	Quartet referente a un defecto en la tétrada de polen
RNA	Ácido ribonucléico
RP	Primer derecho
SiO <sub>2</sub>	Dióxido de silicio
T-DNA	Ácido desoxirribonucléico de transferencia
TAIL-PCR	Reacción Térmica-Asimétrica-Entrelazada en cadena de la polimerasa
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
Ti	Plásmido inductor de tumor
Triosa-P	Triosa fosfato
tRNA	Ácido ribonucléico de transferencia
V	Volts
WT	Especie Silvestre (wild type)

$\Delta p$	Gradiente de potencial
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
$^{\circ}\text{C}$	Centígrados

# ANTECEDENTES

## **1.- *La nutrición de las plantas.***

La agricultura es una de las actividades de mayor importancia para la subsistencia de la especie humana, pues de ella depende directamente que la demanda alimenticia mundial sea satisfecha. La producción de granos a nivel mundial aumentó de 700 a 1500 millones de toneladas por año entre 1950 y 1984 [12]. Sin embargo, en la actualidad la producción agrícola se encuentra en una etapa de decadencia debido al rápido aumento de la población mundial, la utilización descontrolada de pesticidas y la sobreexplotación de los suelos cultivables, aunado a esto se encuentra el hecho de que casi la tercera parte de la tierra es árida y la disponibilidad de zonas con humedad uniforme, sin periodos de sequía prolongados y utilizables para el cultivo es escasa.

El impacto de las limitaciones nutrimentales sobre la agricultura suele ser de igual o mayor importancia, aun cuando no sean tan evidentes. La importancia de la nutrición mineral vegetal ha sido reconocida por más de 200 años debido a su carácter inusual pues, son los únicos organismos multicelulares autótrofos y, por lo tanto, no dependen de compuestos de alta energía sintetizados por otros organismos. Durante el siglo pasado se ha realizado mucha investigación tecnológica sobre los mecanismos utilizados por las plantas para la obtención de los nutrientes minerales del suelo ya que un mayor entendimiento de estos procesos se reflejan directamente y de manera significativa en el ámbito económico y ecológico [3].

Los elementos esenciales para el crecimiento óptimo de las plantas son 17. En Tabla 1 se enlistan 14 de éstos dejando fuera los más obvios (oxígeno, carbono e hidrógeno).

**Tabla 1** Concentraciones de nutrientes minerales esenciales. (tomado de BUCHANAN, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2001).

Elemento	Concentraciones en materia seca ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentraciones en tejido fresco
<i>Macronutrientes</i>		
N	15,000	71.4 mM
K	10,000	17 mM
Ca	5,000	8.3 mM
Mg	2,000	5.5 mM
P	2,000	4.3 mM
S	1,000	2.1mM
<i>Micronutrientes</i>		
Cl	100	188 $\mu\text{M}$
B	20	123 $\mu\text{M}$
Fe	100	120 $\mu\text{M}$
Mn	50	61 $\mu\text{M}$
Zn	20	20.4 $\mu\text{M}$
Cu	6	6.2 $\mu\text{M}$
Mo	0.1	0.07 $\mu\text{M}$
Ni	0.005	0.006 $\mu\text{M}$

(BUCHANAN, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2001).

De acuerdo con la definición de elemento esencial se catalogan como tales todos aquellos sin los cuales a) la planta no puede completar su ciclo vital y b) es un componente de un metabolito esencial o constitutivo. Así mismo estos nutrientes se pueden clasificar de acuerdo a su papel bioquímico o su forma química en el suelo, sin embargo, la clasificación más común se basa en la concentración relativa en la planta en condiciones normales. Los

macronutrientes se encuentran generalmente en concentraciones que oscilan entre los 1000 y los 15000  $\mu\text{g}$  por gramo de peso seco y son C, H, O, N, K, Ca, Mg, P y S, por otro lado, los micronutrientes (Cl, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo y Ni) se encuentran en concentraciones de 100 a 10000 veces menores que los primeros [3].

Los macronutrientes pueden a su vez dividirse en aquellos que mantienen su identidad como iones dentro de la planta (ej.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y aquellos que son asimilados en compuestos orgánicos (ej. N, S y P). En la actualidad el entendimiento del transporte de iones minerales se ha obtenido por medio del estudio de la absorción de  $\text{K}^+$  y su movimiento dentro de la planta; mientras tanto, los avances en biología molecular han permitido el estudio en el transporte y nutrición de P.

La obtención de fósforo del suelo es uno de los factores de mayor influencia en el crecimiento de las plantas, razón por la cual es uno de los aditivos más frecuentemente utilizados en la fabricación de fertilizantes. A diferencia de otros nutrientes minerales, el fósforo se encuentra principalmente en formas oxidadas dentro de la planta formando fosfatos y polifosfatos orgánicos e inorgánicos [3].

El fósforo es de los macronutrientes de mayor relevancia para el desarrollo óptimo de las plantas pues su anión ortofosfato ( $\text{Pi}$ ) forma parte de compuestos tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP además de participar activamente en la fotosíntesis, la respiración y la regulación de numerosas enzimas y de la expresión genética. Desafortunadamente, el  $\text{Pi}$ , es la única forma asimilable de fósforo para las plantas y suele encontrarse en concentraciones bajas en el suelo ( $\sim 10\mu\text{M}$ ) aún en lugares fértiles. De éste aproximadamente del 20 al 80 por ciento se encuentra en su forma orgánica, la cual debe ser mineralizada para poder ser asimilada, o bien se encuentra formando sales insolubles de calcio, magnesio, aluminio y hierro, principalmente, que por su alta estabilidad, limitan la absorción de fosfato por las raíces [42].

Por lo anterior, el estudio de los mecanismos mediante los cuales una planta puede hacer un

uso más eficiente del fosfato es de gran relevancia y dentro de estos mecanismos se debe considerar al pirofosfato inorgánico (PPi), ya que es el subproducto principal de muchas reacciones de biosíntesis [21].

Las pirofosfatasas inorgánicas (iPPiase) son las enzimas encargadas de la hidrólisis del pirofosfato (PPi) que además de ser un subproducto muy abundante de la biosíntesis, es considerado también como una fuente de energía autónoma en las plantas, actuando como una alternativa de ATP [10] y, por tanto, actuando de manera directa sobre el crecimiento de las plantas.

## ***2- El transporte de Pi en las plantas.***

Debido a que las concentraciones de Pi disponibles en la interfase raíz-suelo se encuentran en el orden de micromolar y, en ocasiones, hasta submicromolar, pero las concentraciones intracelulares son del orden de milimolar, la obtención del Pi a través de las membranas celulares debe efectuarse con un consumo de energía muy elevado. Esto se lleva a cabo por medio del transporte activo de aniones a través de la membrana, que se asocia con el transporte de protones (simporte de  $H^+$ ). Los hongos y las plantas utilizan una ATPasa de membrana plasmática como bomba de protones para generar un gradiente electroquímico utilizando ATP. Esto lleva a la formación de un gran potencial de membrana negativo hacia el citoplasma. No sorprende pues, que el transporte de Pi y otros aniones se acople a la entrada de protones en un proceso de transporte activo secundario [43,49,51].

En consecuencia, el transporte de fosfato por las plantas es impulsado por un gradiente de protones generado por la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática. También se ha comprobado la existencia de dos tipos de transporte: uno de alta afinidad, operando a bajas concentraciones de Pi (en el rango de micromolar) y otro de baja afinidad que opera a altas concentraciones (rangos milimolares).

El Pi es transportado de la raíz al tallo por medio del xilema, una vez dentro de la célula, el Pi pasa la membrana de organelos como el plastidio, la mitocondrias y las vacuolas, generalmente en intercambio por otros solutos o protones. Los metabolitos que son intercambiados entre los plastidios y el citosol deben ser transportados a través de las membranas, de las cuales, la más externa permite el paso de moléculas pequeñas mientras que la interior es la barrera de permeabilidad y el sitio de transporte de Pi. En el caso del cloroplasto, los solutos que deben ser transportados como intercambio son generalmente, carbohidratos fosfatados (triosas, pentosas y hexosas) o fosfoenolpiruvato. La estequiometría en este punto es importante, pues asegura que cada molécula de fosfoéster transportada se balancea con cada una de Pi que entra [41]. Sin embargo, debido al intercambio ATP/ADP mediado por el translocador de adenin nucleótidos, el plastidio gana o pierde fosfato, lo que tiene que ser compensado por algún otro mecanismo, tales como el transportador de fosfato [52], o el translocador de malato/pirofosfato [28].

### ***3.- El pirofosfato (PPi) en los sistemas biológicos y las PPiasas.***

Como se mencionó anteriormente, durante el último siglo el estudio de la relación que existe entre el desarrollo de las plantas y la concentraciones de macronutrientes en el suelo, y a su disposición, ha adquirido gran relevancia e interés y, como se ha señalado anteriormente, uno de los compuestos que limitan con mayor facilidad este desarrollo es el fósforo, el cuál es adquirido a través de la raíz en forma de fosfato inorgánico y del cual uno de los principales metabolitos generados en la planta es el ya mencionado pirofosfato (PPi).

La importancia del PPi en los sistemas biológicos radica en que una gran cantidad de reacciones biosintéticas están acopladas a la hidrólisis de un nucleósido trifosfatado (NTP), que hace posible el desplazamiento de la reacción hacia los productos. Comúnmente, el NTP se hidroliza a NDP y fosfato inorgánico (Pi), sin embargo, en muchas ocasiones esta reacción da como productos PPi y el NMP, que puede quedar libre o condensado con otro de los sustratos. En ambos casos se hidroliza un enlace fosfoanhidro, pero la segunda reacción libera una mayor cantidad de energía química. Por lo anterior, las síntesis de una gran cantidad de macromoléculas se encuentran acopladas a la liberación de PPi a partir de NTP,

especialmente aquellas en las que el NMP-aceptor condensado es el producto de un intermediario de la reacción. Por ejemplo, en el caso de la síntesis de ácidos nucleicos se lleva a cabo directamente en la incorporación de NMP y de NTP al polinucleótido, mientras que en la síntesis de proteínas y polisacáridos el PPI se produce durante la formación de intermediarios activados (aminoacil-tRNA y azúcares difosfonucleótidos, respectivamente) [21].

Muchas de estas reacciones resultan termodinámicamente reversibles *in vitro*, por lo que la hidrólisis del pirofosfato *in vivo* es el factor que garantiza el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de producto, justo en este punto es donde se soporta la observación de que la pirofosfatasa inorgánica soluble es una enzima esencial [6,31].

Por otro lado, el PPI sirve de intermediario en una gran variedad de reacciones bioquímicas como por ejemplo en las rutas de degradación de la sacarosa y la del almidón (Fig. 1), en donde la misma vía que sirve para la síntesis de almidón o sacarosa, puede ser empleada para su degradación, gracias a la reversibilidad termodinámica de la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintasa o la almidón sintasa (Fig. 1), aunque el papel de ésta última en el proceso de degradación no es tan claro. De hecho, se ha propuesto que la acción simultánea de la síntesis y degradación de la sacarosa puede ser una forma de cambiar dos formas de energía entre sí (ATP y PPI) dentro de las células vegetales [13]. En este caso la concentración de PPI ejerce un control sobre dos enzimas importantes en la ruta: la UDP-glucosa pirofosforilasa y la fosfofructocinasa dependiente de PPI [29].

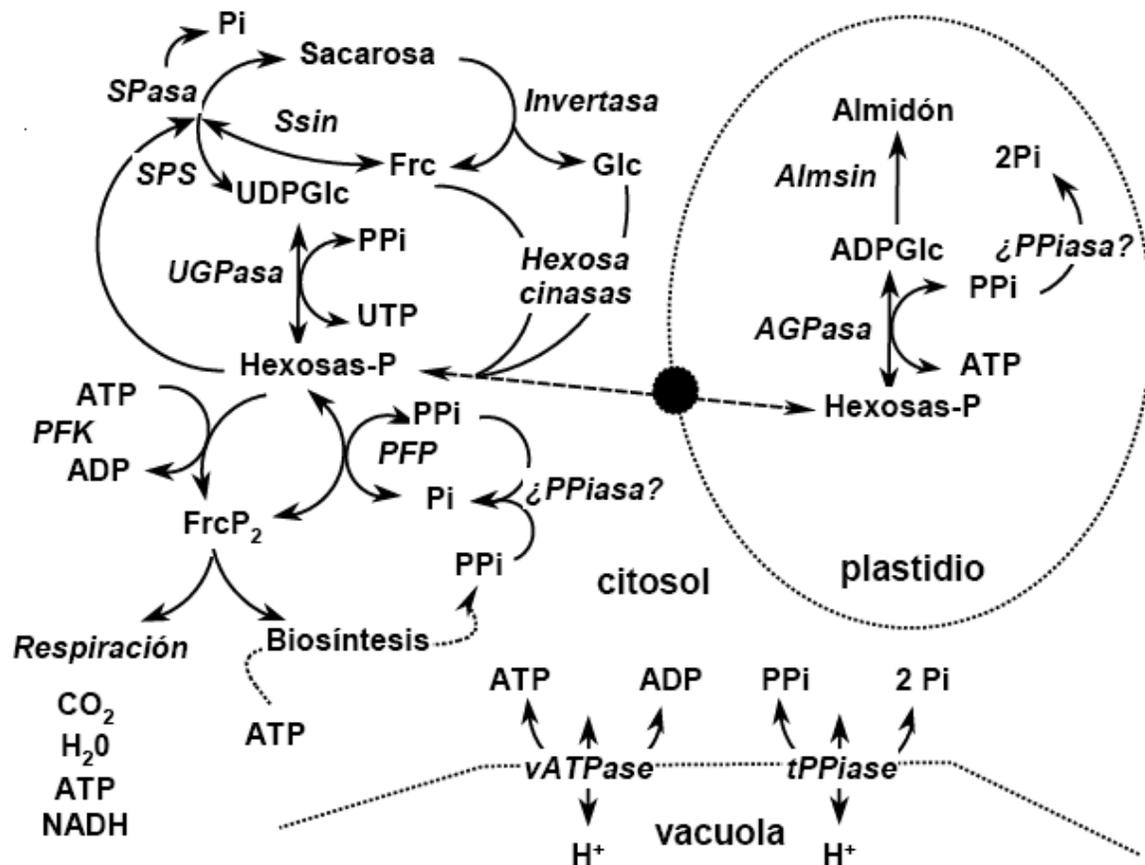
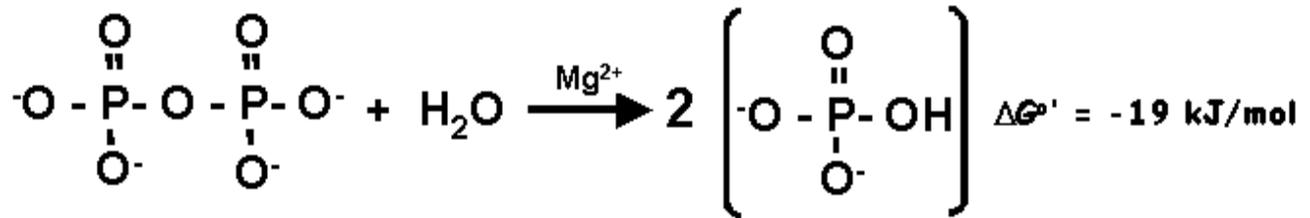


Figura 1.- Rutas de biosíntesis del almidón y sacarosa en las células vegetales.

Por otro lado es evidente que la mayor parte del PPI proviene de la hidrólisis de NTP's en reacciones biosintéticas, sin embargo, también puede ser sintetizado directamente a partir de dos moléculas de ortofosfato utilizando la energía de gradientes iónicos [33]. Algunas bacterias fotosintéticas utilizan la energía de la luz visible para formar gradientes electroquímicos ( $\Delta p$ ) sobre la membrana del cromatóforo y así formar ATP o PPI. Estas reacciones son catalizadas por dos diferentes enzimas,  $H^+$ -ATPasas o  $H^+$ -PPiasas, situadas en la membrana.

En general las PPiasas hidrolizan el PPI produciendo Pi libre (Figura 2) y, como ya se mencionó, se cree que su principal papel metabólico es consumir PPI, para así evitar que dichas reacciones alcancen el equilibrio y el crecimiento se detenga [44].



**Figura 2** Reacción de hidrólisis del pirofosfato por la acción de una PPiasea.

Las PPiases son consideradas dentro de los catalizadores biológicos perfectos (catalizadores únicamente limitados por la difusión del sustrato hacia el sitio activo, o viceversa) por poseer una combinación de alta afinidad por su sustrato y elevada constante catalítica, lo que se traduce en una constante de segundo orden prácticamente igual a la velocidad de difusión.

Dichas enzimas se encuentran presentes en todos los seres vivos, siendo esenciales para las supervivencia de las células [6,21,31]. Éstas pueden subdividirse en 2 tipos, de acuerdo a sus características cinéticas: i) las pirofosfatasa de protones, como la de la membrana vacuolar [34] y del aparato de golgi [36], que acoplan la hidrólisis del PPI a la generación de un gradiente electroquímico y ii) las iPPiases solubles (isPPiases), que utilizan  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y/o  $\text{Co}^{2+}$  como activador esencial y se distribuyen de manera ubicua en células de todos los seres vivos [20]. Ambos tipos de PPiases distintas en su secuencia de aminoácidos, su localización intracelular y sus características cinéticas [45].

A la fecha se conocen dos familias de isPPiases:

La familia I, que incluye la gran mayoría de PPiases conocidas actualmente y distribuidas ampliamente en animales, bacterias, hongos y protozoarios [20], que utilizan  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor, aunque cabe aclarar que dentro de la familia I se ha encontrado un grupo de pirofosfatasa en los trypanosomatidos, que pueden usar  $\text{Ca}^{2+}$  como cofactor, además de  $\text{Mg}^{2+}$ , aunque su actividad es considerablemente mejor con el primero [20].

La familia II, que incluye la PPiasea de *Bacillus subtilis* así como también algunas PPiases

putativas de cuatro líneas bacteriales que incluye a las isPPiases capaces de emplear  $Mn^{2+}$  y/o  $Co^{2+}$  como cofactor catalítico [27].

Es importante remarcar en este punto que no hay similitud a nivel de secuencia de aminoácidos entre ambas familias y que tampoco la hay entre estas y las  $H^+$ -PPiases [45].

### **3.1.- Las PPiases en las plantas superiores**

En las plantas, una gran cantidad de reacciones metabólicas se realizan en el plastidio, algunas de éstas, tales como la síntesis de purinas, pirimidinas y almidón generan PPI. Es comprensible que de acumularse el PPI en el plastidio, las reacciones anteriores se verían inhibidas. Existe pues evidencia de que aproximadamente 80% de la actividad de PPiase se localiza en el plastidio lo cual promovería la hidrólisis del PPI, permitiendo que el Pi resultante sea exportado al citosol por medio de transportadores específicos [44]. En este punto también hay controversia, porque, aunque se han encontrado las proteínas transportadoras de Pi localizadas en los cloroplastos [52], los cloroplastos aislados son impermeables al fosfato en pruebas funcionales [16]. Por otro lado, también se ha reportado que los plastidios poseen sistemas de transporte capaces de translocar pirofosfato, pero aún no se ha identificado a la proteína responsable [28,32].

Adicionalmente, el PPI también es producido por la actividad biosintética en el citoplasma, el núcleo, la mitocondria, el retículo endoplásmico y posiblemente en otros compartimentos. Lo que sugiere la existencia de varias formas de pirofosfatasa en los tejidos vegetales con diferente localización subcelular.

Los primeros trabajos en los que se identificaron y caracterizaron algunas pirofosfatasa de plantas se llevaron a cabo en la caña de azúcar en 1970 [4], en hojas maíz [35] papa [11] y cebada [54], además de otras especies. Además, en los mismos trabajos se reportó su presencia en diversos compartimentos celulares (el amiloplasto y el cromoplasto), soluble

dentro del cloroplasto [4,26,37,55], unido a la membrana del tilacoide [23] y la mitocondria [35,53]. Sin embargo, en dichos reportes su masa molecular nativa, la composición de sus subunidades, los requerimientos iónicos y la especificidad del sustrato son considerablemente diferentes.

Uno de los genes que codifican para PPiases fue identificado por primera vez en *Arabidopsis* en 1991 por Kieber et al. [24], desde entonces se ha conseguido identificar varias cadenas de cDNA que guardan similitud con el primero. Gracias a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* [47] fue posible identificar 5 genes codificantes para isPPiases putativas (At1g01050, At2g18230, At2g46860, At3g53620 y At4g01480) que codifican para proteínas con probable actividad de PPiase. Esto en base a su semejanza a nivel de secuencia con los otros genes previamente identificados en plantas superiores, además se consiguió identificar otro que guarda menor semejanza con los anteriores (At5g09650) [44].

Las isPPiases utilizadas en este trabajo son la AtPPa1 que está formada por 212 aminoácidos y la AtPPa4 con una longitud de 216 aminoácidos [39].

#### **4.- Respuesta de las plantas a estrés abiótico.**

##### **4.1.- Estrés térmico**

Cuando las plantas de sol son transferidas a bajas temperaturas (5°-10°C), se presenta una disminución rápida y pronunciada de la actividad fotosintética, lo cual se acompaña de una reducción en la síntesis de sacarosa. Lo anterior se ha asociado con una acumulación de intermediarios fosforilados y la disminución de la relación [ATP]/[ADP] y [triosa-P]/[3-fosfoglicerato]. Después de un período prolongado a bajas temperaturas, el crecimiento disminuye y los carbohidratos solubles se acumulan en las hojas. Sin embargo, las plantas cuentan con mecanismos adaptativos que les permiten superar estas condiciones, destacando un incremento en la actividad de varias enzimas del ciclo de Calvin, lo que se traduce en una recuperación parcial de la síntesis de sacarosa y otros oligosacáridos, que

además, juegan un papel como crioprotectores. La disponibilidad de esqueletos carbonados es también importante en la síntesis de otros osmoprotectores como prolina y glicina betaína [22,50].

Del mismo modo, la respuesta de las plantas a temperaturas elevadas ( $>40^{\circ}$ ), se presenta mediante una reprogramación compleja de las actividades celulares con el objeto de proteger estructuras y funciones esenciales. Al igual que en la adaptación a otros tipos de estrés, la respuesta a temperatura elevada conlleva a una acumulación de diversos metabolitos tales como glicina betaína, carbohidratos, polioles y aminoácidos. La acumulación de solutos osmocompatibles parece ser un mecanismo central en la adaptación a diversas condiciones de estrés [1].

La actividad fotosintética y la acumulación de carbohidratos son requeridas para la síntesis de varios de estos osmolitos biocompatibles, pero, a su vez, la concentración de pirofosfato parece ser uno de los factores claves en la regulación de la síntesis de sacarosa y almidón [14,15]. Consecuentemente, se ha considerado en este proyecto la posibilidad de que la respuesta a estrés por frío o por calor pueda verse modificada en las plantas que no expresan alguna pirofosfatasa [1,22].

## **4.2.- Estrés osmótico**

Una planta es incapaz de extraer agua del medio a menos que el potencial acuoso en la raíz sea menor que el del medio circundante. La raíz de la planta debe establecer un gradiente suficiente para que el agua pueda fluir libremente. Por lo tanto, si en el medio se encuentra un agente que es capaz de modificar el potencial, la absorción de agua será menos eficiente.

Existen solutos conocidos como osmolitos biocompatibles, que son un pequeño grupo de compuestos orgánicos altamente solubles y no interfieren con el metabolismo celular aún a concentraciones muy elevadas, un ejemplo de éstos es el manitol, la forma reducida de la

manosa. El carácter orgánico de los osmolitos probablemente contrarresta la toxicidad potencial de solutos inorgánicos concentrados. Muchos iones presentes en las células afectan el metabolismo de manera significativa cuando se presentan en concentraciones elevadas, posiblemente uniéndose a cofactores, sustratos, membranas y enzimas, alterando así, la actividad metabólica. Además, muchos de estos iones pueden entrar en las zonas de hidratación de muchas proteínas y promover su desnaturalización [3]. El papel del pirofosato en la respuesta a estrés osmótico ha quedado también de manifiesto en plantas transgénicas que sobreexpresan la H<sup>+</sup>-PPiase en las cuales aumenta la capacidad para sobreponerse a la estrés osmótico, gracias a la disminución del potencial, lo cual activa la absorción de agua [40].

### **4.3.- Estrés salino**

Aún cuando la absorción de iones puede proveer del medio necesario para la adaptación osmótica, las concentraciones citosólicas elevadas de algunos iones, tales como el Na<sup>+</sup>, pueden perturbar severamente el metabolismo. Por consiguiente, la habilidad para regular la concentración, composición y distribución de iones dentro de la célula es esencial para los organismos.

El sodio es un elemento casi ausente en las células vegetales y que resulta tóxico a niveles superiores a 5 mM para la mayoría de las especies vegetales. La acumulación de Na<sup>+</sup> en el citoplasma puede ser prevenido en parte por el transporte activo del Na<sup>+</sup> citosólico a través de la membrana plasmática y fuera de la célula. Además, el Na<sup>+</sup> citosólico es transportado a través del tonoplasto y secuestrado en la vacuola, donde se puede acumular en concentraciones altas lo que tiene un marcado efecto en el balance osmótico de la planta. Existe evidencia de que en suelos salinos se eleva la actividad de los antiportadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en varias plantas. El funcionamiento de este transportador requiere un gradiente de potencial electroquímico a través del tonoplasto, el cual es obtenido gracias a los gradientes de pH generados por la acción de las bombas de protones. Entre las bombas que pueden

satisfacer de energía al antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se encuentran la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana y la vacuolar, y la  $\text{H}^+$ -PPasa del tonoplasto [3]. La relevancia de las  $\text{H}^+$ -PPiasas en la tolerancia al estrés salino ha sido demostrado recientemente mediante su sobreexpresión en plantas transgénicas [17].

#### **4.4.- Respuesta de las plantas a la deficiencia de fósforo**

Las plantas han desarrollado una serie de adaptaciones morfológicas y metabólicas que se disparan en deficiencia de fósforo. Estas adaptaciones se encuentran dirigidas a incrementar la adquisición de éste importante pero limitado nutriente presente en el suelo además de mantener el crecimiento en estas condiciones. A nivel morfológico, la arquitectura del sistema radical es modificada, con un aumento en la relación raíz/tallo, en la densidad y longitud de los pelos radicales y la proliferación de raíces laterales. En algunas plantas, también se observa una reducción en el gravitropismo de las raíces. Todos estos cambios le permiten a la planta una mejor exploración del suelo en busca de Pi. Durante el estrés producido por la deficiencia de Pi, las raíces promueven la secreción de protones y de ácidos orgánicos con el objeto de permitir la solubilización de complejos de Pi. Al mismo tiempo, se liberan fosfatasas y nucleasas para adquirir fosfato de fuentes orgánicas. La cinética del transporte de Pi a la raíz y a través de la planta se modifica por medio de cambios en la abundancia de transportadores y en la afinidad por el Pi. Por otro lado, se activan las rutas metabólicas que son menos dependientes de las concentraciones de Pi intracelular, así como el reemplazamiento de fosfolípidos por sulfolípidos [41].

Es claro que la secreción de los ácidos orgánicos, de fosfatasas y la toma eficiente de fosfato juegan un papel vital en la adaptación de las especies a suelos con bajo contenido de éste nutriente. La caracterización y dilucidación de esas estrategias puede ser un factor importante que permita la obtención de cultivos agrícolas, para aumentar la capacidad de subsistir en suelos con bajo contenido de fosfato, tanto por selección de variantes naturales como por manipulación genética [8].

## **5.- *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio**

En términos muy generales y en lo que respecta a la fisiológica básica de una planta, el organismo modelo, *Arabidopsis thaliana*, realiza las mismas funciones y contiene esencialmente los mismos genes que cualquier otra planta con flores, si bien, cada planta posee sus peculiaridades en aspectos secundarios del desarrollo y en su capacidad para adaptarse a ambientes específicos. Por otro lado, cuenta con una amplia variedad de características que la hacen un excelente modelo de estudio para experimentos *in vivo* en el laboratorio, dichas características se enlistan a continuación:

1. Actualmente se cuenta con la secuenciación completa de su genoma.
2. Debido a su tamaño reducido, es posible contar con un área para realizar los estudios.
3. Es posible obtener suficientes semillas de un individuo para realizar poder segregar los individuos de interés.
4. Principalmente se autopoliniza, lo cual facilita la tarea de hacer cruza.
5. Es un candidato óptimo para la transformación via *Agrobacterium tumefaciens*.

La comprensión de diversos fenómenos fisiológicos y bioquímicos en *Arabidopsis*, pueden proporcionar herramientas valiosas que podrían llevar al desarrollo de una agricultura más amigable con el medio ambiente. En particular, plantas con capacidad mejorada para tomar nutrientes y en una utilización de fertilizantes a niveles menos contaminantes.

## **6.- La clonación de plantas.**

### **6.1 Los vectores de clonación**

Los vectores de clonación para plantas se desarrollaron en 1980 y su utilización ha llevado a cultivos genéticamente modificados que se encuentran a la delantera actualmente. Existen

varios métodos para la clonación, de los cuales, uno de los más comunes es la utilización de vectores en plásmidos de *Agrobacterium* [2].

La base molecular de la transformación genética de células vegetales por medio de *Agrobacterium* es la transferencia e integración de una región de un plásmido inductor de tumor (Ti) en el genoma nuclear de la planta. El tamaño de los plásmidos Ti va desde los 200 hasta los 800 kpb. Cada uno de estos plásmidos contiene una región que es transferida e integrada en el genoma de la planta y a esta región se le conoce como T-DNA o DNA de transferencia. El proceso mediante el cual el T-DNA es exportado de la bacteria e insertado en la célula vegetal es posible gracias a los genes de virulencia contenidos en el plásmido Ti [19].

## **6.2.- Uso del T-DNA como mutágeno**

En la actualidad existen principalmente dos vías para la obtención de mutantes de *Arabidopsis*, la primera, por mutagénesis al azar, seguida de la búsqueda de plantas que generen un fenotipo deseado (genética directa), la segunda, por medio del aislamiento de mutaciones en genes seleccionados por una propiedad molecular específica (genética inversa).

La genética directa es una herramienta poderosa para la identificación de genes que están involucrados en procesos biológicos específicos. Para realizar este tipo de mutación es necesario realizar dos consideraciones importantes: 1 cuántas plantas pueden ser probadas y 2 la cantidad de genes que pueden mutar para obtener el fenotipo de interés. Estos factores afectan la selección del mutágeno. Los mutágenos más comúnmente utilizados son etilmetanosulfonato (EMS) y la inserción de elementos genéticos móviles tales como T-DNA u otros transposones, que pueden causar la pérdida de la función en los genes interrumpidos, a causa de la inserción [72].

La ventaja de la inserción de T-DNA es que las secuencias de *Arabidopsis* que la rodean pueden ser aislados fácilmente. Ésto simplifica la identificación de los genes correspondientes a mutantes interesantes. Por otro lado, la desventaja de este sistema de inserción es que generar las plantas mutantes es tedioso, pues una vez que se ha realizado la inserción es necesario obtener plantas pertenecientes a la  $M_2$ . Además, el porcentaje del número de inserciones por  $M_1$  es de tan sólo 1.5. Por lo tanto, es necesario sembrar grandes cantidades de plantas [56].

### 6.3.- Transformación de las plantas utilizadas en este trabajo

Las plantas empleadas en este trabajo se obtuvieron comercialmente a través de la iniciativa científica llamada "The Arabidopsis Information Resource" (TAIR).

Los métodos de transformación utilizados para las líneas geminales de este trabajo se encuentran descritos en las bases de datos de TAIR (<http://arabidopsis.org/>) y son como siguen:

Línea **SAIL\_545\_C05** generada por medio de infiltración al vacío de una planta Columbia (WT) con el vector pDAP101 de *A tumefaciens*. Se utilizó una técnica modificada de Reacción Térmica-Asimétrica-Entrelazada en Cadena de la Polimerasa (TAIL-PCR) para amplificar los fragmentos de DNA flanqueando la orilla izquierda del T-DNA de esta línea transformada. Se utilizó BASTA para seleccionar las plantas que contuvieran una inserción de T-DNA. La inserción se encuentra en un exon del locus AT1G01050 identificado como el gen de *Arabidopsis thaliana* para Pirofosforilasa 1, el cual posee a su vez actividad de Pirofosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  [39,48]. En la figura 3 se muestra una representación esquemática del gen AtPPa1 indicando el lugar de la inserción de T-DNA.

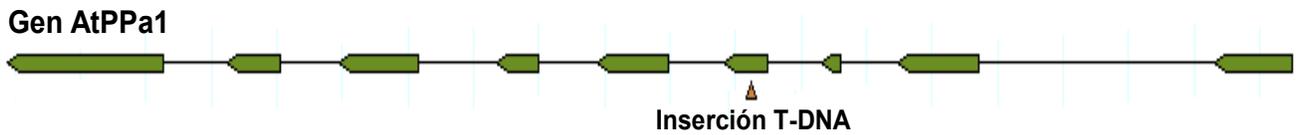


Figura 3 Gen AtPPa1 con inserción de T-DNA

Línea **SAIL\_916\_C08** generada por medio de infiltración al vacío de una planta Columbia (WT) con el vector pDAP101 de *A tumefaciens*. Se utilizó una técnica modificada de TAIL-PCR para amplificar los fragmentos de DNA flanqueando la orilla izquierda del T-DNA de esta línea transformada. Es homóciga para *qtr* (quartet) un defecto en la tétrada de polen. Se utilizó BASTA para seleccionar las plantas que contuvieran una inserción de T-DNA. La inserción se encuentra en un intron del locus AT3G53620 identificado como el gen de *Arabidopsis thaliana* para Pirofosforilasa 4, el cual posee a su vez actividad de Pirofosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  [39,48]. En la figura 4 se muestra una representación esquemática del gen AtPPa4 indicando el lugar de la inserción de T-DNA.

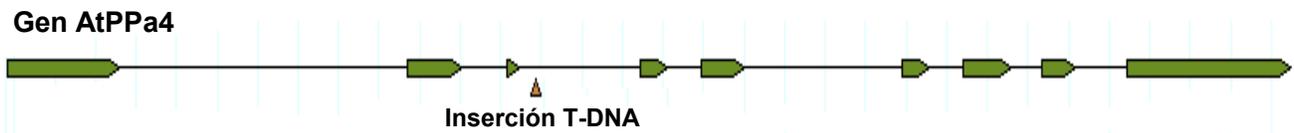


Figura 4 Gen AtPPa4 con inserción de T-DNA

## PLANTEAMIENTO PROBLEMA

El pirofosfato es un metabolito que se produce con el crecimiento de la planta y su hidrólisis es esencial para que dicho crecimiento no se vea detenido [25]. A pesar de ello, las plantas poseen un contenido relativamente alto de pirofosfato en el citoplasma [55] que puede ser empleado como fuente alternativa de energía [33,46]. Aún bajo condiciones de estrés severo las plantas mantienen una concentración relativamente elevada de pirofosfato en el citoplasma [5,9], lo que representa un misterio sin resolver en la biología vegetal [3].

Por otro lado, la relevancia del metabolismo del pirofosfato en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés ha quedado de manifiesto con los resultados de plantas transgénicas que sobreexpresan las pirofosfatasas de protones en la membrana del tonoplasto [40].

Sin embargo, la alternativa en la degradación de pirofosfato la constituyen las pirofosfatas inorgánicas solubles. Dichas enzimas se encuentran codificadas por 6 genes diferentes en la especie *Arabidopsis thaliana*. Por lo tanto, resulta de sumo interés conocer cual es el papel individual de estas isoenzimas sobre el desarrollo normal de las plantas y si su respuesta a condiciones de estrés se ve afectada de manera distinta por la ausencia de una u otra pirofosfatasa. Tal evidencia proporcionaría información sobre si la existencia de tantas isoformas es resultado de la redundancia genética, o si cada una de éstas posee una subespecialización dentro del concierto general de la fisiología de la planta. Por otro lado, estos datos aportarían evidencia de la relevancia que tiene contar con dos formas de pirofosfatasas (solubles y membranales), especialmente porque, como ya se dijo, las H<sup>+</sup>-PPiases son muy importantes en la respuesta de las plantas a estrés de sequía, salino y también de deficiencia de fósforo [18].

Debido a que el PPI es un subproducto central en el metabolismo, la ausencia de alguna de las isPPasas capaces de hidrolizarlo puede ocasionar su acumulación intracelular, o estimular la actividad de alguna otra de las pirofosfatasas disponibles. Dependiendo de como se redistribuya el uso del pirofosfato, el desarrollo de las plantas y su capacidad de

responder y recuperarse de manera eficiente a distintas condiciones de estrés puede verse afectado negativamente, o bien, esa alteración puede resultar en una planta más robusta bajo un tipo particular de estrés. Alternativamente, si entre las 6 isPPiasas de *Arabidopsis*, alguna puede suplir por completo la función de la enzima ausente, el fenotipo será nulo. en cualquier caso, la información obtenida será de gran relevancia para acercarnos a entender la función de estas proteínas en la fisiología vegetal.

## HIPÓTESIS

La ausencia de una de las isoenzimas de isPPiase en las mutantes de *Arabidopsis thaliana* por inserción de T-DNA en los genes correspondientes, se manifestará en una alteración del metabolismo de fósforo, que dará como resultado cambios fenotípicos observables en el crecimiento de la planta bajo condiciones normales y/o bajo condiciones de estrés abiótico como estrés salino, estrés osmótico, deficiencia de fósforo, choque de calor, o bajas temperaturas.

# OBJETIVOS

## ***Objetivo general***

Caracterizar individuos de la especie *Arabidopsis thaliana* con inserciones de T-DNA en los genes que codifican para las isoenzimas 1 o 4 de las pirofosfatasas, según corresponda, y describir la respuesta de estos individuos a condiciones de estrés térmico, osmótico, salino y de suficiencia y deficiencia de fósforo.

## ***Objetivos particulares***

- Crecer individuos de cada una de las líneas mutantes con insertos de T-DNA con el fin de tener suficiente población para identificar homocigos.
- Montar un método para extraer de manera eficiente, suficiente RNA de los individuos bajo análisis.
- Identificar las mejores condiciones para realizar RT-PCR.
- Identificar los individuos homocigos mutantes de cada una de las clonas utilizadas por medio de RT-PCR.
- Crecer plantas silvestres y mutantes homocigas de las líneas seleccionadas, bajo las siguientes condiciones:
  - Condiciones óptimas
  - Estrés térmico
  - Estrés osmótico
  - Estrés salino
  - Deficiencia y suficiencia de fosfato.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## ***Material***

### **Sustancias**

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos de los siguientes proveedores: Sigma (St. Louis, MO. EUA), Roche (Hvidovre, Dinamarca), Merk (Darmstadt, Alemania) y *PhytoTechnology Laboratories* (Shawnee Mission, EUA) y QIAGEN.

### **Material Biológico**

Las semillas de las diferentes mutantes con inserciones de T-DNA fueron obtenidas del *Arabidopsis Biological Resource Center* localizado en la Universidad de Ohio en EUA. Y se almacenaron maduras y secas en refrigeración en contenedores de baja humedad. El sustrato METROMIX-200 fue adquirido a través de un proveedor de materiales para invernadero local.

### **Material para Biología Molecular y Microbiología**

Se utilizaron cuatro oligonucleótidos para amplificar las regiones del DNA correspondientes a las mutaciones putativas, dichos iniciadores fueron diseñados de acuerdo a los descrito en la dirección [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) y se sintetizaron en el Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias de los iniciadores utilizados y las regiones hacia las que están dirigidas se resumen en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1** Lista de los primers utilizados para la amplificación de los mRNA correspondiente a los genes de los genes de las isPPasa 1 y 4.

isPPasa	LP	RP	Producto kpb
Pirofosfatasa 1	AtPPa1onA	AtPPa1onB	~600
Pirofosfatasa 4	AtPPa4onA	AtPPa4onB	~600

**Tabla 2** Secuencia correspondiente a cada primer y numero de bases.

Primers	Secuencia	#Bases
AtPPa1onA	5'-CACCATGAGTGAAGAACTAAAGATAACCAGAG-3'	33
AtPPa1onB	5'-ACGCCTCAGGGTGTGGAGAATG-3'	22
AtPPa4onA	5'-CACCATGGCGCCACCGATT-3'	19
AtPPa4onB	5'-ACGTCTTAGGTTCTCCACGAC-3'	21

Se utilizó el OneStep RT-PCR kit de QIAGEN para realizar las amplificaciones de los fragmentos de interés.

## Medios para pruebas de estrés y crecimiento de las semillas

En tabla 3 se presentan los reactivos utilizados para la preparación de los medios utilizados para las pruebas de estrés:

**Tabla 3 Concentración de nutrientes por medio.**

<b>Reactivo</b>	<b>Control [mM]</b>	<b>+PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> [mM]</b>	<b>-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> [mM]</b>	<b>Salino [mM]</b>	<b>Osmótico [mM]</b>
KNO <sub>3</sub>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	2.5	-	1.0	1.0
KCl	-	-	1.0	-	-
MgSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeEDTA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
MnSO <sub>4</sub>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
CuSO <sub>4</sub>	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
ZnSO <sub>4</sub>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
NaMoO <sub>4</sub>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
MES	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
NaCl	1.0	1.0	1.0	35.0	1.0
Manitol	-	-	-	-	500
SiO <sub>2</sub>	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sacarosa	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Se utilizaron 10 g de goma de Gelana (Gelrite) por cada litro de medio preparado.

## **Métodos**

### **Germinación de las semillas y crecimiento de las plantas**

1. Colocar semillas de *A. thaliana* en un tubo eppendorf de 1.5mL y realizar 3 lavados con una solución 10% de NaClO<sub>4</sub> y eliminar el excedente después de cada lavado.
2. Eliminar el remanente de NaClO<sub>4</sub> por medio de 3 lavados con agua desionizada estéril.
3. Colocar cuidadosamente las semillas en una caja de petri con medio Control, 1% de

Gelana y 0.5% de sacarosa.

4. Colocar las cajas a 4°C durante 24 hrs para estimular de germinación.
5. Transladar las cajas a una cámara de luz a aproximadamente 21°C y con 8 horas de oscuridad al día.
6. 15 días después se transfieren las plantas a macetas con METROMIX-200.
7. Regar cada 4 días con aproximadamente 10 mL de H<sub>2</sub>O.
8. 5 semanas después recolectar las semillas.
9. Repetir el procedimiento hasta obtener la F<sub>2</sub> para tener un 25% de probabilidad de encontrar una homóciga mutante en la descendencia.
10. Las plantas seleccionadas como posibles homócigas mutantes fueron aquellas que presentaron un fenotipo distinto en condiciones normales.
11. Observar evidencias fenotípicas de las mutaciones en los individuos a lo largo de su desarrollo.

## **Extracción del RNA total**

Para la extracción se utilizaron los reactivos y el método descrito en el TRI Reagent® de Ambion, el cual es brevemente descrito a continuación:

1. Pesar aproximadamente 100 mg de tejido vegetal.
2. Homogeneizar tejido en 1 mL de TRI Reagent.
3. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12000 x g por 10 min a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
5. Añadir 200µL de cloroformo, mezclar e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
6. Centrifugar a 12000 x g por 10 min a 4°C y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
7. Añadir 500µL de isopropanol, mezclar con vortex por 5 seg e incubar a temperatura ambiente por 10 min
8. Centrifugar a 12000 x g por 8 min a 4°C y desechar el sobrenadante.

9. Añadir 1mL de etanol al 75%.
10. Centrifugar a 7500 x g durante 5 min, remover el etanol y secar al aire brevemente.
11. Disolver el RNA en el buffer de elección.
12. Correr un gel de agarosa al 1.5% para observar la presencia de RNA.

Se extrajo DNA de planta silvestre (WT) y de las plantas provenientes de la F<sub>2</sub> para la AtΔ<sup>Ppa1</sup> (SAIL\_545\_C05) y de la F<sub>3</sub> de la AtΔ<sup>Ppa4</sup> (SAIL\_916\_C08).

## Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA se realizó por medio de espectrofotometría con UV leyendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU® 650, para calcular la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = \epsilon A_{260} l F_D$$

donde C es la concentración en µg/ml,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción (  $50 \mu g ml^{-1} cm^{-1}$  ),  $l$  es la longitud de la celda (1cm) y  $F_D$  es el factor de dilución.

## Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para la RT-PCR se utilizó el esquema de la Tabla 4:

**Tabla 4 Preparación de reacción RT-PCR**

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer 10X	-	10	
H <sub>2</sub> O estéril	-	~29*	
dNTP's	10mM	2	0.02mM
AtPPa1onA	2.5mM	1.2	2.5X10 <sup>-3</sup> mM
AtPPa1onB	2.5mM	1.2	2.5X10 <sup>-3</sup> mM
Muestra	-	**	-
Enzyme Mix	-	2	-
<b>Volumen total</b>	<b>50µL</b>		

En la tabla se muestra la preparación de la reacción de la transcripasa reversa y la amplificación del gen que expresa AtPPa1, para la amplificación del gen de AtPPa4 se rempazan los oligonucleótidos por los correspondientes. \*La cantidad de agua varia de acuerdo a la cantidad de muestra adicionada. \*\*Cantidad adicionada de cada muestra WT= 1.5µL, AtΔ<sup>Ppa1</sup>= 1.5µL y AtΔ<sup>Ppa4</sup>= 4.5µL

Los tubos de reacción se pusieron durante 30 min a 50°C con el fin de permitir la actividad de la Transcriptasa reversa. Posteriormente fueron sometidos al modelo para PCR descrito en la Tabla 5

**Tabla 5 Condiciones de incubación PCR**

Proceso	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización	94	15 min
Alineamiento	56	50 seg
Elongación	72	50 seg
<b>Ciclos</b>		<b>35</b>

## Ensayos de estrés

### **Estrés térmico a 4°C**

1. Seguir el método anteriormente descrito para el crecimiento de las plantas hasta el punto 5.
2. Dejar a 21°C el tiempo suficiente para la germinación de las plantas (1 semana).
3. Transferir la caja de Petri con semillas a una cámara fría (4°-10°C) con 8 horas de

oscuridad al día.

4. Analizar crecimiento cada semana durante 21 días después de haber sometido a estrés térmico.

### ***Estrés térmico 45°C***

1. Seguir el método para el crecimiento de las plantas hasta el punto 5.
2. Transferir la caja de petri con semillas a una incubadora a 45°C durante una hora y regresar posteriormente a 21°C.
3. Repetir el paso 2 una vez por semana.
4. Analizar crecimiento cada semana durante 21 días después de haber sometido a estrés térmico.

### ***Estrés osmótico***

1. Seguir el método para el crecimiento de las plantas hasta el punto 5 utilizando medio con Manitol 500mM.
2. Analizar crecimiento cada semana durante 21 días después de haber sido sembradas.

### ***Estrés salino***

1. Seguir el método para el crecimiento de las plantas hasta el punto 5 utilizando medio con NaCl 35mM.
2. Analizar crecimiento cada semana durante 21 días después de haber sido sembradas.

### ***Estrés por exceso de fosfato***

1. Seguir el método para el crecimiento de las plantas hasta el punto 5 utilizando medio con fosfato 2.5mM.
2. Analizar crecimiento cada semana durante 21 días después de haber sido sembradas.

### ***Estrés por deficiencia de fosfato***

1. Seguir el método para el crecimiento de las plantas hasta el punto 5 utilizando medio con reemplazando el fosfato con KCl 1mM.
2. Analizar crecimiento cada semana durante 21 días después de haber sido sembradas.

### ***Análisis de las características foliares de las plantas y análisis estadístico.***

Se realizó la medición de las plantas control y las sometidas a estrés considerando los siguientes aspectos: distancia de la punta de la hoja al internodo (DI), longitud foliar (LF), ancho foliar (AnF) y área foliar (ArF) utilizando únicamente hojas de la primer roseta de cada planta.

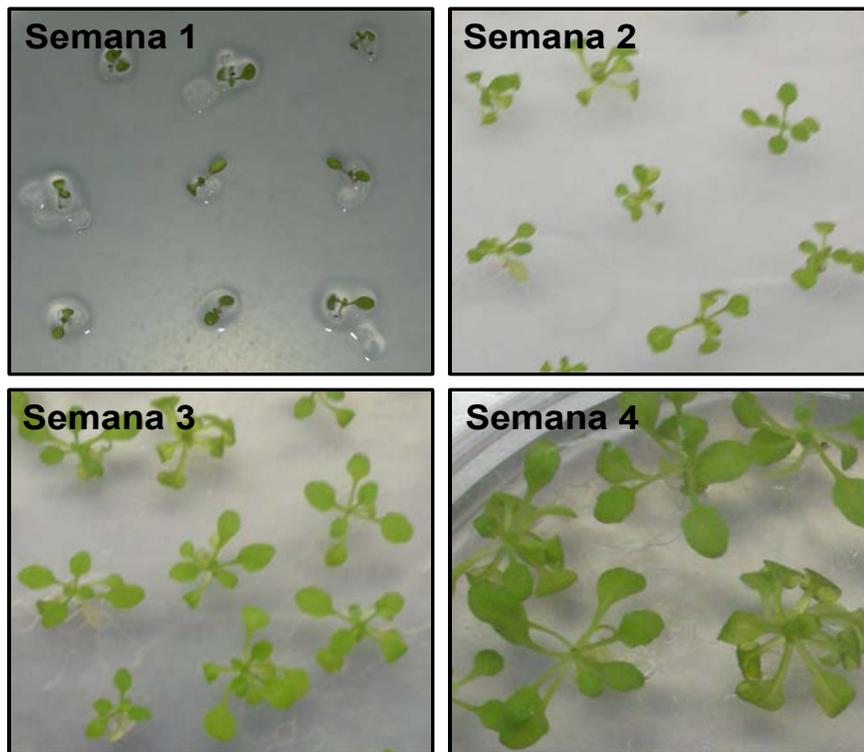
Los datos fueron utilizados para comparar el desarrollo de las plantas mutantes contra la silvestre, se utilizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis. En los casos en los que se encontraron diferencias, se aislaron éstas mediante la prueba de Dunn.

# RESULTADOS Y ANÁLISIS

## *Resultados*

### Fenotipo de las plantas

Con el fin de tener una referencia y observar las características de las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) crecidas bajo condiciones óptimas de laboratorio, se registró el crecimiento de las plantas a lo largo de cuatro semanas. Las imágenes de las plantas silvestres se muestran en la figura 1.



**Figura 1** Crecimiento de plantas en medio basal Gamborg B-5

Cuando se sembraron las semillas de las plantas que habían sido mutagenizadas por inserción del T-DNA en las regiones correspondientes a los genes que codifican para las

pirofosfatasas AtPPa1 y AtPPa4 (ver tabla ) se pudo observar la aparición de un fenotipo alterado que consistió en un desarrollo retrasado del tallo floral a partir de la semana 5 y más evidente en la semana 7 (Fig. 2). En algunos individuos, tal desarrollo estaba tan retrasado que las flores comenzaron a aparecer casi inmediatamente en la rosetta y la elongación del tallo floral ocurría luego de la aparición de las flores (no se muestra). Debido a que lo anterior se presentaba en una proporción cercana al 25 % de los individuos, se consideró factible que fueran éstos los que portaran la mutación en forma homóciga, por lo que se les seleccionó preferencialmente. Esto fue más claro en las plantas  $At\Delta^{Ppa1}$  que en las  $At\Delta^{Ppa4}$ .

Las semillas cosechadas de dichas plantas fueron sembradas nuevamente y su semillas cosechadas y resembradas hasta tener una población con características uniformes ( $F_4$ ).

## Selección de plantas con fenotipo distinto

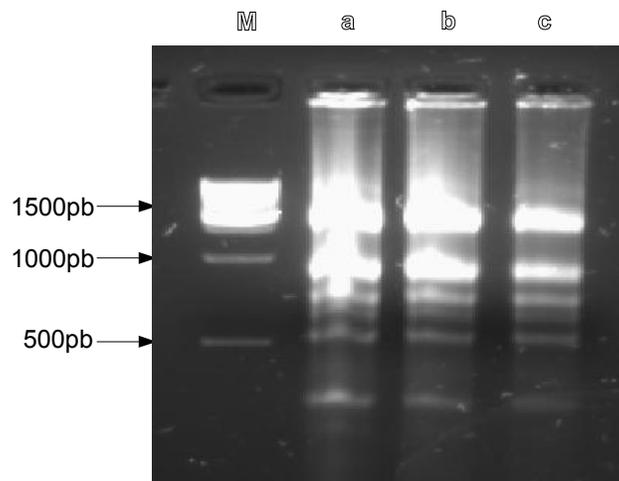
Las semillas correspondientes a las plantas  $At\Delta^{Ppa1}$  y  $At\Delta^{Ppa4}$  sembradas en medio Gamborg B-5 y transplantadas a tierra a las 4 semanas presentaron diferencias fenotípicas en el tamaño del tallo tal como se muestra en la figura 2, razón por la cual fueron seleccionadas como posibles plantas homocigas de las mutaciones, sin embargo, para poder afirmar lo anterior, es necesario contar con evidencia molecular suficiente.



**Figura 2** Comparación de altura de tallos entre la especie silvestre (WT) y las plantas posiblemente mutantes ( $At\Delta^{Ppa1}$ ,  $At\Delta^{Ppa4}$ ) a las 7 semanas de edad.

## Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA total de las plantas que presentaban diferencia fenotípica en la longitud del tallo con respecto a la silvestre, una por cada mutación esperada, suponiendo que dicha diferencia era debida a la mencionada mutación. La integridad del RNA obtenido se comprobó mediante un gel de agarosa al 1.5%, el cual se corrió durante 30 minutos a 100V y 100mA (Figura 3).



**Figura 3** Gel de agarosa que muestra la extracción de RNA de los individuos de 5 semanas de edad. Se observan las bandas correspondientes al RNA y una banda de alto peso molecular correspondiente al RNA ribosomal. Las muestras son WT (a),  $At\Delta^{Ppa1}$  (b) y  $At\Delta^{Ppa4}$  (c).

## Cuantificación de RNA

Una vez comprobada la integridad del RNA total extraído de las plantas en estudio, se realizó la cuantificación del mismo. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

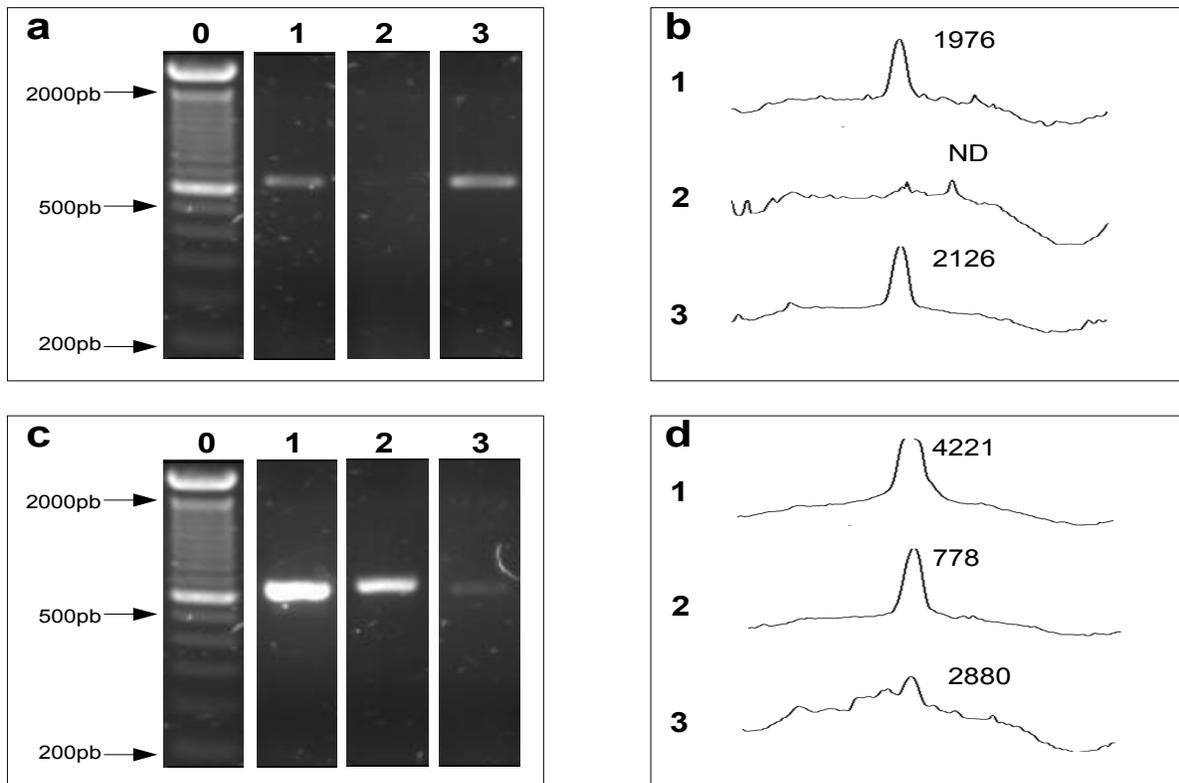
**Tabla 1** Concentración de RNA extraído por muestra.

Muestra	[RNA] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
WT	0.845
$At\Delta^{Ppa1}$	0.788
$At\Delta^{Ppa4}$	0.524

## RT-PCR

Las muestras obtenidas fueron amplificadas mediante transcripción inversa y una reacción

en cadena de la polimerasa, la cual nos permite comprobar la presencia del cDNA correspondiente a los genes de interés, la ausencia o baja expresión de este cDNA es una prueba de la disminución total o parcial en la expresión de las enzimas correspondientes a los genes, la cual es debida a las mutaciones presentes en éstos. Los productos de las reacciones de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% durante 30 minutos a 100V y 100mA y se midió la densidad de las bandas (Figura 2).



**Figura 4** Identificación de los mRNA mediante RT-PCR en las muestras de plantas silvestres (1), y de las mutantes *AtΔ<sup>PPa1</sup>* (2) y *AtΔ<sup>PPa4</sup>* (3) y separados por electroforesis en geles de agarosa comparados con marcadores de masa molecular (0). Panel **a**) Amplificación con los oligonucleótidos para AtPPa1 tabla . Panel **c**) amplificación con los oligonucleótidos para AtPPa4 tabla . En los paneles **b** y **d** se muestran los trazos densitométricos en unidades arbitrarias, de los carriles correspondientes a los paneles **a** y **c**, respectivamente. ND.- No detectada.

La posición de las inserciones dentro de los genes es relevante puesto que en la mutante *AtΔ<sup>PPa1</sup>* se encuentra en un exón, lo cual significa que la mutación puede ser detectada de manera confiable mediante el método anterior y se ha asignado la nomenclatura *AtPPa1<sup>ΔΔ</sup>* para designar a su descendencia.

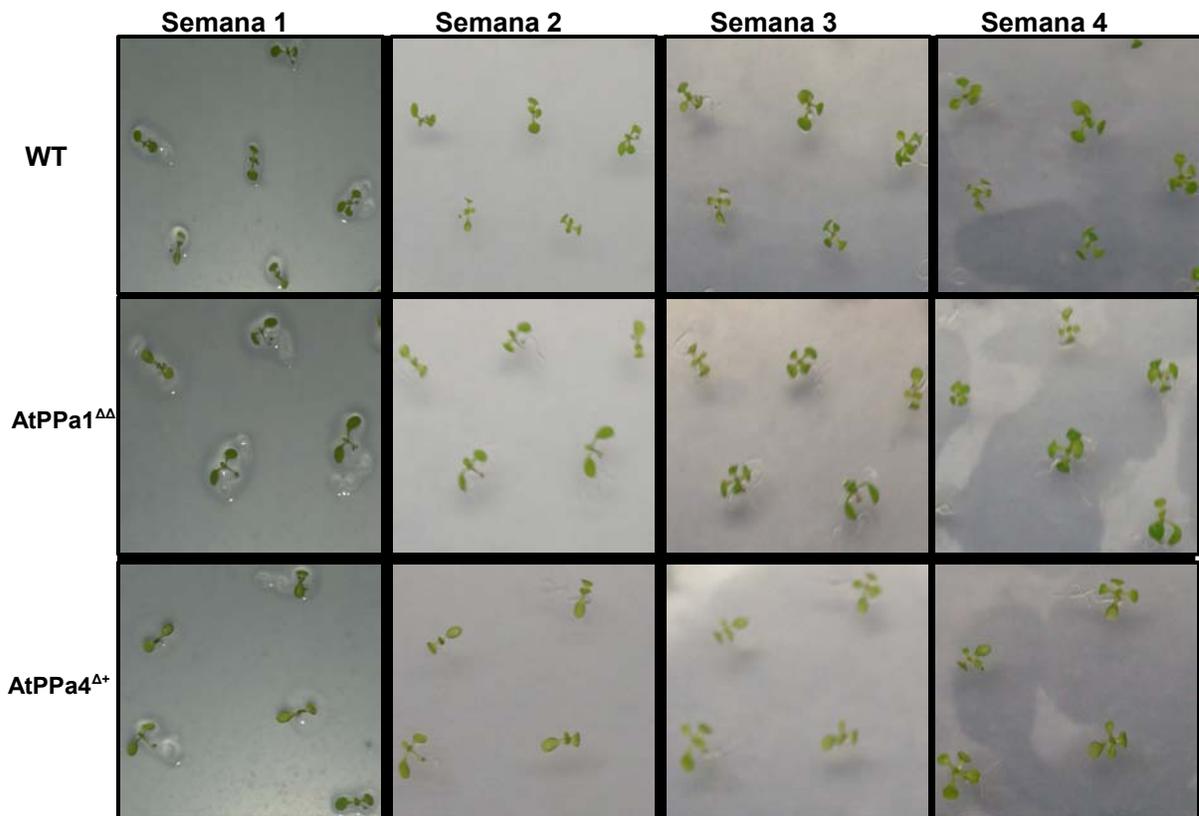
Por otro lado en la mutante *AtΔ<sup>PPa4</sup>* la inserción se encuentra en un intrón, lo cual hace posible que los datos anteriores no reflejen la verdadera condición de mutante homociga de

la planta, puesto que el mRNA se forma a partir de la parte codificante del gen (exclusivamente exones), sin embargo, el resultado obtenido es interesante, puesto que, a pesar de la ubicación de la inserción, aún es posible observar un cambio en la expresión de la proteína, el cual puede deberse también al fenotipo de la planta heterociga. Por lo anterior y dado a que es imposible asegurar la naturaleza homociga de la mutante  $At\Delta^{PPa4}$ , se consideró heterociga para los estudios posteriores y se ha asignado la nomenclatura  $AtPPa4^{\Delta+}$  para su descendencia.

## Pruebas de estrés

### *Estrés Térmico 4°C*

Las plantas  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  fueron sometidas a estrés térmico de 4°C y se registró su crecimiento a lo largo de 4 semanas (Figura 5).



**Figura 5** Comparación de las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  respecto a las plantas silvestres (WT) a las 4 semanas de edad crecidas a 4°C. Durante la primera semana se permite la germinación de las semillas a condiciones de 21°C con 8 hrs de oscuridad.

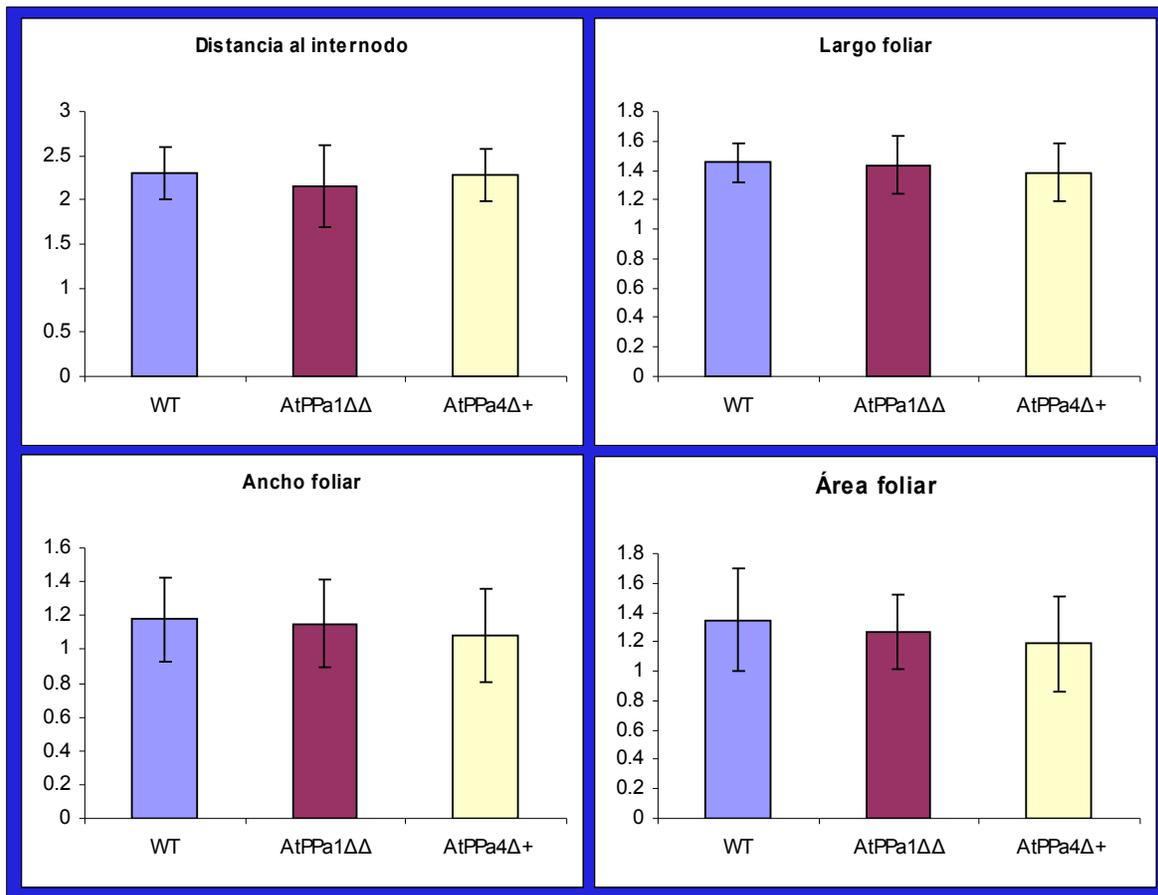
Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido se realizó el análisis de las características foliares de las plantas con el fin de observar diferencias entre las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$ ,  $AtPPa4^{\Delta+}$  y la silvestre. A los resultados se les realizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis utilizando el programa SigmaStat (Tabla 2).

**Tabla 2** Comparación estadística de las características foliares de las AtPpa1 $\Delta\Delta$  y AtPpa4 $\Delta+$  respecto a las plantas silvestres (WT) sometidas a estrés por baja temperatura.

	<b>Distancia al Internodo</b>	<b>Longitud Foliar</b>	<b>Ancho Foliar</b>	<b>Area Foliar</b>
<b>WT (n=17)</b>	2.303 $\pm$ 0.288	1.454 $\pm$ 0.13	1.176 $\pm$ 0.244	1.347 $\pm$ 0.348
<b>AtPPa1<math>\Delta\Delta</math> (n=16)</b>	2.159 $\pm$ 0.47	1.437 $\pm$ 0.195	1.153 $\pm$ 0.258	1.264 $\pm$ 0.322
<b>AtPPa4<math>\Delta+</math> (n=16)</b>	2.277 $\pm$ 0.295	1.387 $\pm$ 0.193	1.084 $\pm$ 0.274	1.190 $\pm$ 0.252

Los valores muestran el rango que agrupa al 50% central de la población  
 No hubo diferencias estadísticas significativas para ningún grupo con respecto al control.

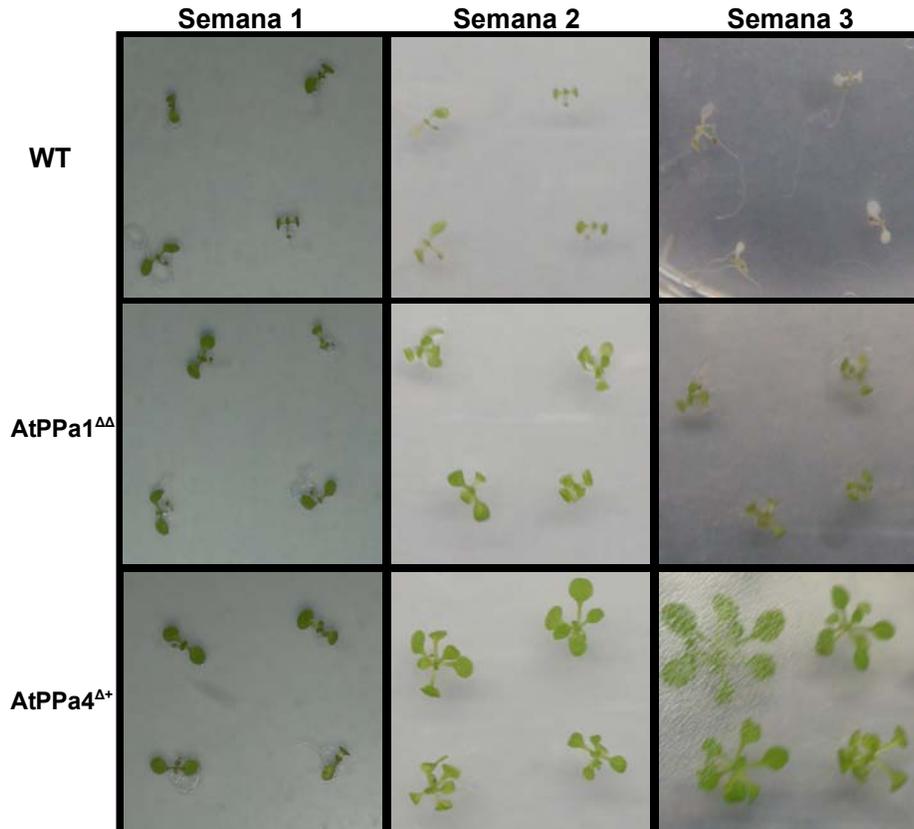
En la figura 6 se muestra una representación gráfica de los rangos que agrupan el 50% de los individuos para cada parámetro. Es posible observar que no hay diferencias entre los grupos para ninguno de los parámetros.



**Figura 6** Representación gráfica de los rangos para cada parámetro bajo estrés a 4°C.

## Estrés Térmico 45°C

Las plantas  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  fueron sometidas a estrés térmico de 45°C durante una hora a la semana y se observó su desarrollo y recuperación a lo largo de 3 semanas (Figura 7).



**Figura 7** Comparación de las mutantes  $AtPpa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPpa4^{\Delta+}$  respecto a las plantas silvestres (WT) a las 3 semanas de edad sometidas a 45°C durante 1hr a la semana, la semana 1 fue utilizada para germinar las plantas antes de ser sometidas a estrés.

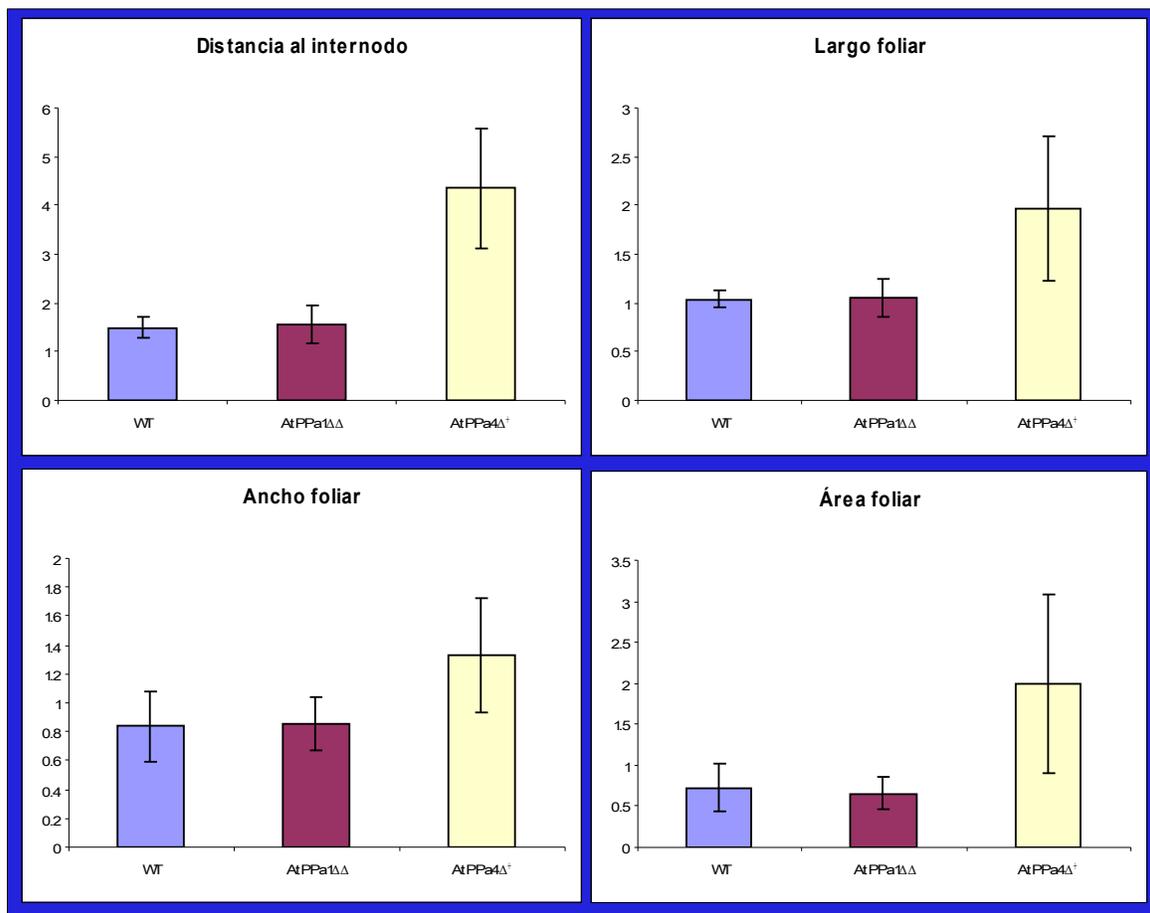
Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido se realizó el análisis de las características foliares de las plantas con el fin de observar diferencias entre las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$ ,  $AtPPa4^{\Delta+}$  y la silvestre. A los resultados se les realizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis. Las diferencias encontradas en los rangos fueron aisladas mediante la prueba de Dunn. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SigmaStat (Tabla 3).

**Tabla 3** Comparación estadística de las características foliares de las *AtPpa1 $\Delta\Delta$*  y *AtPpa4 $\Delta\Delta$*  respecto a las plantas silvestres (WT). Las plantas tenían 3 semanas de edad y fueron sometidas a estrés por alta temperatura, según los descrito en materiales y métodos.

	<b>Distancia al Internodo</b>	<b>Longitud Foliar</b>	<b>Ancho Foliar</b>	<b>Area Foliar</b>
<b>WT (n=14)</b>	1.497 $\pm$ 0.23	1.034 $\pm$ 0.089	0.839 $\pm$ 0.246	0.728 $\pm$ 0.292
<b>AtPPa1<math>\Delta\Delta</math> (n=13)</b>	1.56 $\pm$ 0.404	1.059 $\pm$ 0.196	0.859 $\pm$ 0.187	0.652 $\pm$ 0.197
<b>AtPPa4<math>\Delta\Delta</math> (n=14)</b>	4.347 $\pm$ 1.218*	1.963 $\pm$ 0.742*	1.328 $\pm$ 0.391*	1.996 $\pm$ 1.086*

Los valores muestran el rango que agrupa al 50% central de la población  
 \* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (P < 0.05).

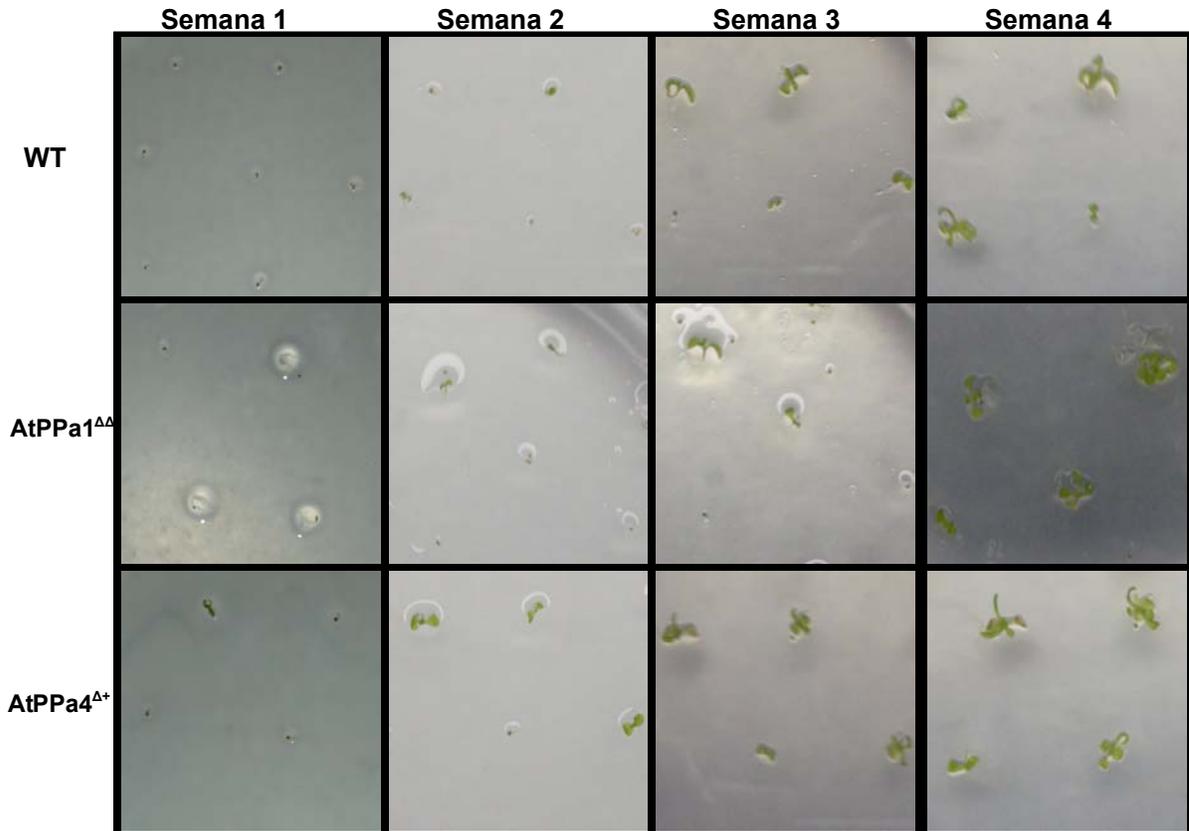
En la figura 8 se muestra una representación gráfica de las diferencias entre los rangos que agrupan el 50% de los individuos para cada parámetro. Las diferencias entre el grupo WT y el *AtPPa4 $\Delta\Delta$*  son claras.



**Figura 8** Representación gráfica de los rangos para cada parámetro bajo estrés a 45°C.

### **Estrés Osmótico**

Las plantas  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  fueron sometidas a estrés osmótico con 500mM de manitol y se observó su desarrollo a lo largo de 4 semanas (Figura 9).



**Figura 9** Comparación de las mutantes  $AtPpa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPpa4^{\Delta+}$  respecto a las plantas silvestres (WT) a las 4 semanas de edad crecidas en presencia de 500mM de manitol.

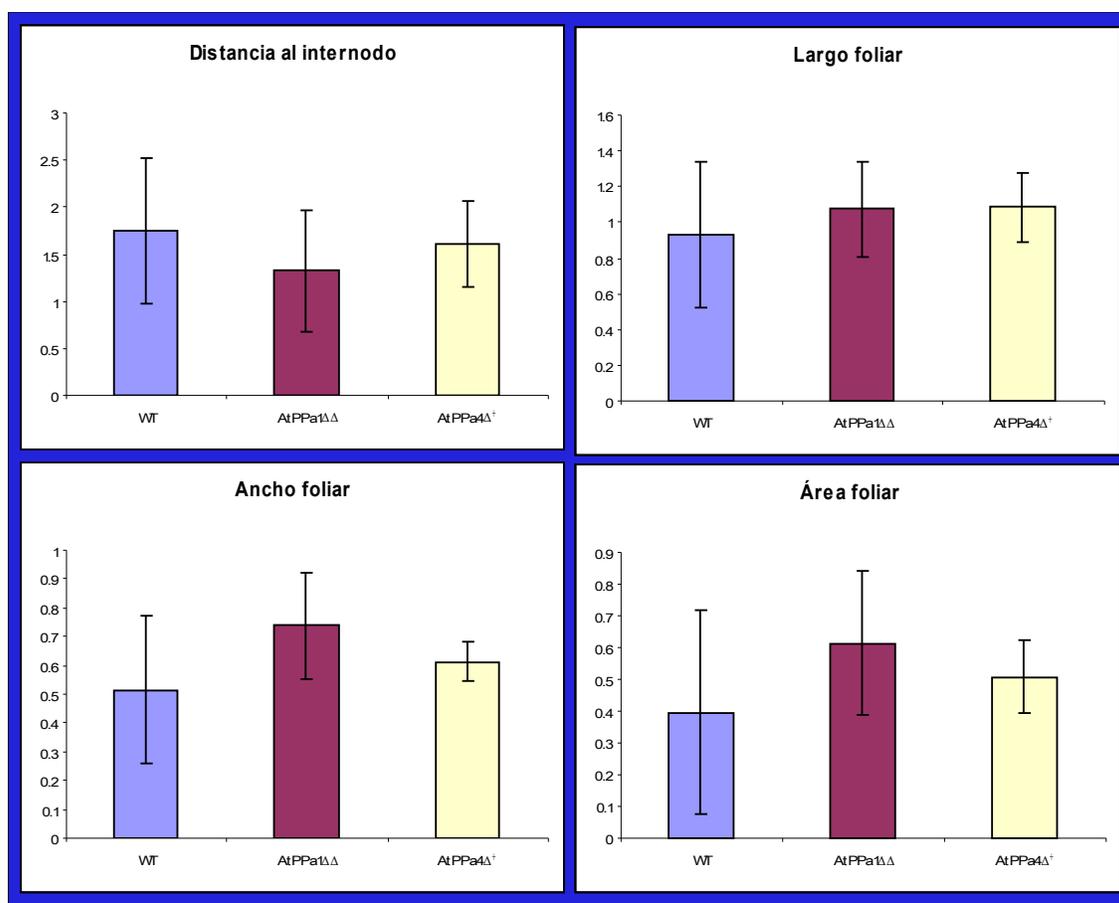
Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido se realizó el análisis de las características foliares de las plantas con el fin de observar diferencias entre las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$ ,  $AtPPa4^{\Delta+}$  y la silvestre. A los resultados se les realizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis, la diferencia encontrada en los rangos fue aislada mediante la prueba de Dunn. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SigmaStat (Tabla 4).

**Tabla 4** Comparación de las características foliares de las AtPpa1<sup>ΔΔ</sup> y AtPpa4<sup>Δ+</sup> respecto a las plantas silvestres (WT). Las plantas tenían 4 semanas de edad y fueron cultivadas en presencia de 500 mM de manitol.

	<b>Distancia al Internodo</b>	<b>Longitud Foliar</b>	<b>Ancho Foliar</b>	<b>Area Foliar</b>
<b>WT (n=14)</b>	1.757 ± 0.774	0.929 ± 0.409	0.516 ± 0.259	0.397 ± 0.32
<b>AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> (n=13)</b>	1.328 ± 0.647	1.075 ± 0.286	0.739 ± 0.184*	0.613 ± 0.226
<b>AtPPa4<sup>Δ+</sup> (n=14)</b>	1.607 ± 0.464	1.083 ± 0.196	0.613 ± 0.069	0.508 ± 0.113

Los valores muestran el rango que agrupa al 50% central de la población  
 \* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (P < 0.05).

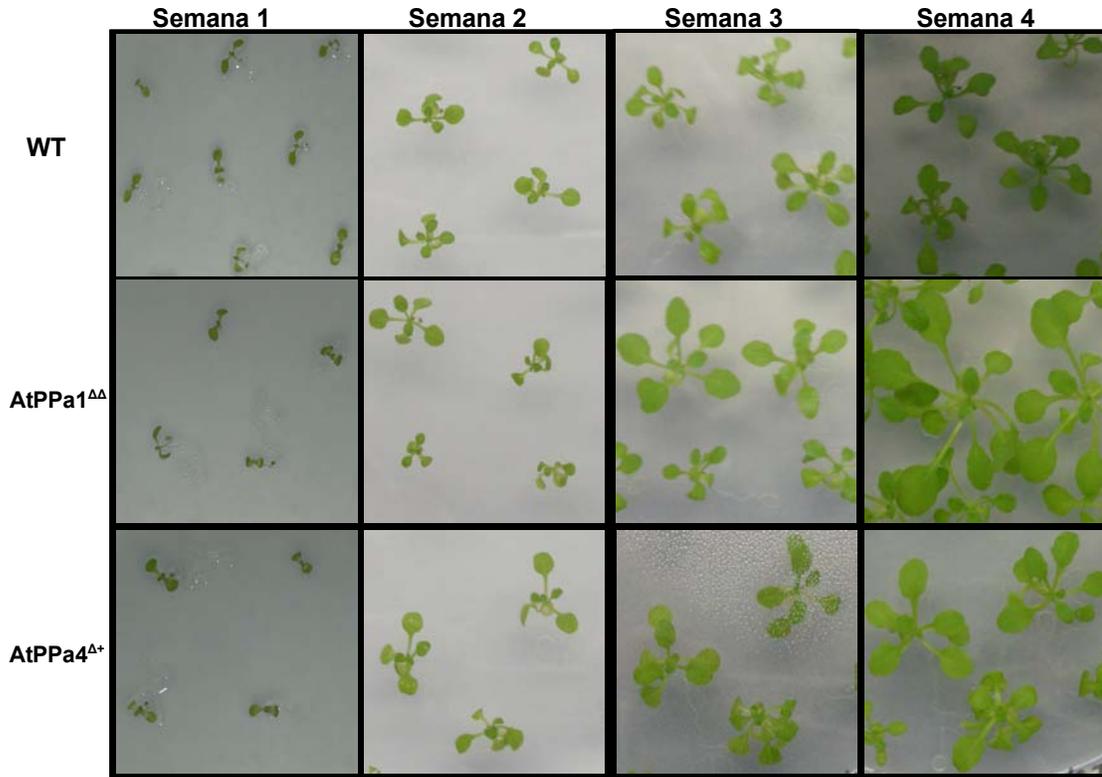
En la figura 10 se muestra una representación gráfica de las diferencias entre los rangos que agrupan el 50% de los individuos para cada parámetro. Es posible observar una diferencia en el ancho foliar entre el grupo WT y el AtPPa4<sup>ΔΔ</sup>, sin embargo, no es suficiente para determinar si la diferencia se debe a la mutación.



**Figura 10** Representación gráfica de los rangos para cada parámetro bajo estrés osmótico con manitol 500mM.

### **Estrés Salino**

Las plantas  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  fueron sometidas a estrés salino con NaCl 35mM y se observó su desarrollo a lo largo de 4 semanas (Figura 11).



**Figura 11** Comparación de las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  respecto a las plantas silvestres (WT) a las 4 semanas de edad crecidas en presencia de 35mM de NaCl.

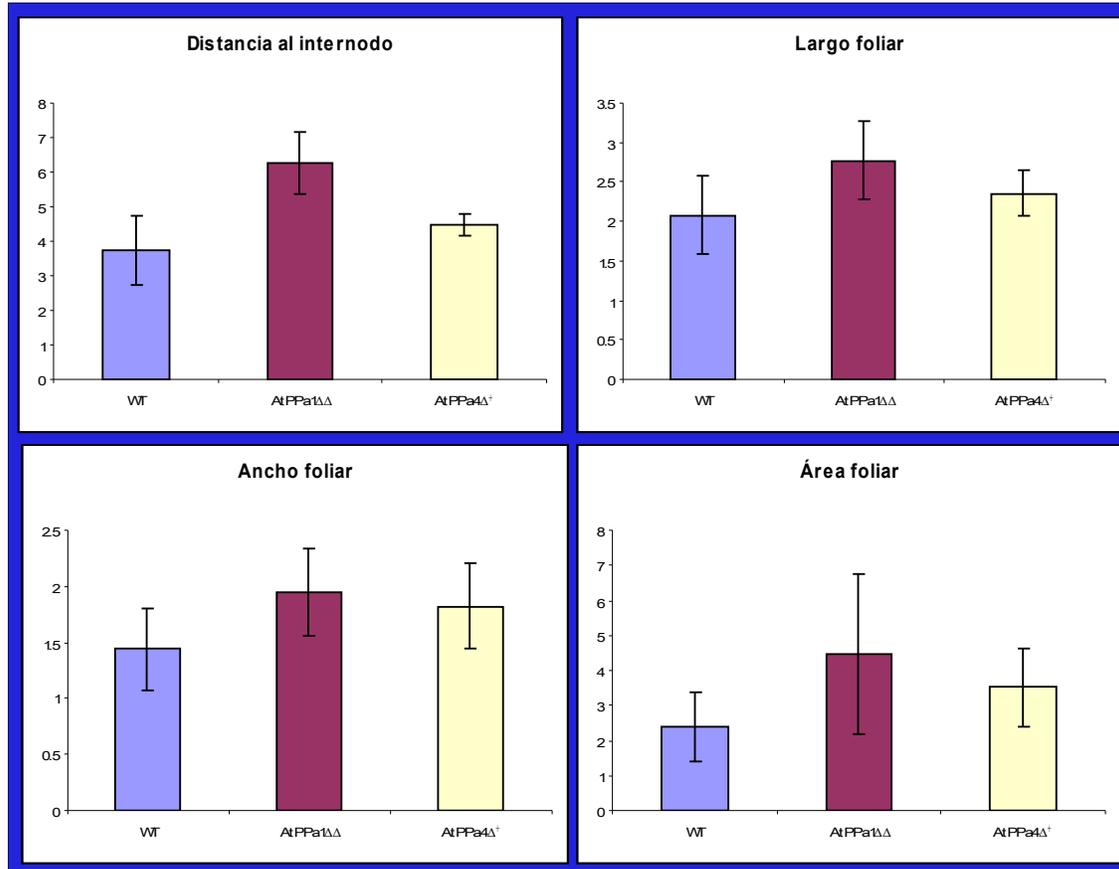
Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido se realizó el análisis de las características foliares de las plantas con el fin de observar diferencias entre las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$ ,  $AtPPa4^{\Delta+}$  y la silvestre. A los resultados se les realizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis. Las diferencias encontradas en los rangos fueron aisladas mediante la prueba de Dunn. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SigmaStat (Tabla 5).

**Tabla 5** Comparación de las características foliares de las *AtPpa1<sup>ΔΔ</sup>* y *AtPpa4<sup>Δ+</sup>* respecto a las plantas silvestres (WT). Las plantas tenían 4 semanas de edad y fueron cultivadas en presencia de 35mM de NaCl.

	<b>Distancia al Internodo</b>	<b>Longitud Foliar</b>	<b>Ancho Foliar</b>	<b>Area Foliar</b>
<b>WT (n=12)</b>	3.734 ± 0.978	2.083 ± 0.486	1.44 ± 0.37	2.385 ± 0.968
<b>AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> (n=12)</b>	6.266 ± 0.873*	2.774 ± 0.501*	1.952 ± 0.387*	4.473 ± 2.267*
<b>AtPPa4<sup>Δ+</sup> (n=11)</b>	4.481 ± 0.302*	2.358 ± 0.279*	1.825 ± 0.377*	3.51 ± 1.119*

Los valores muestran el rango que agrupa al 50% central de la población  
 \* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (P < 0.05).

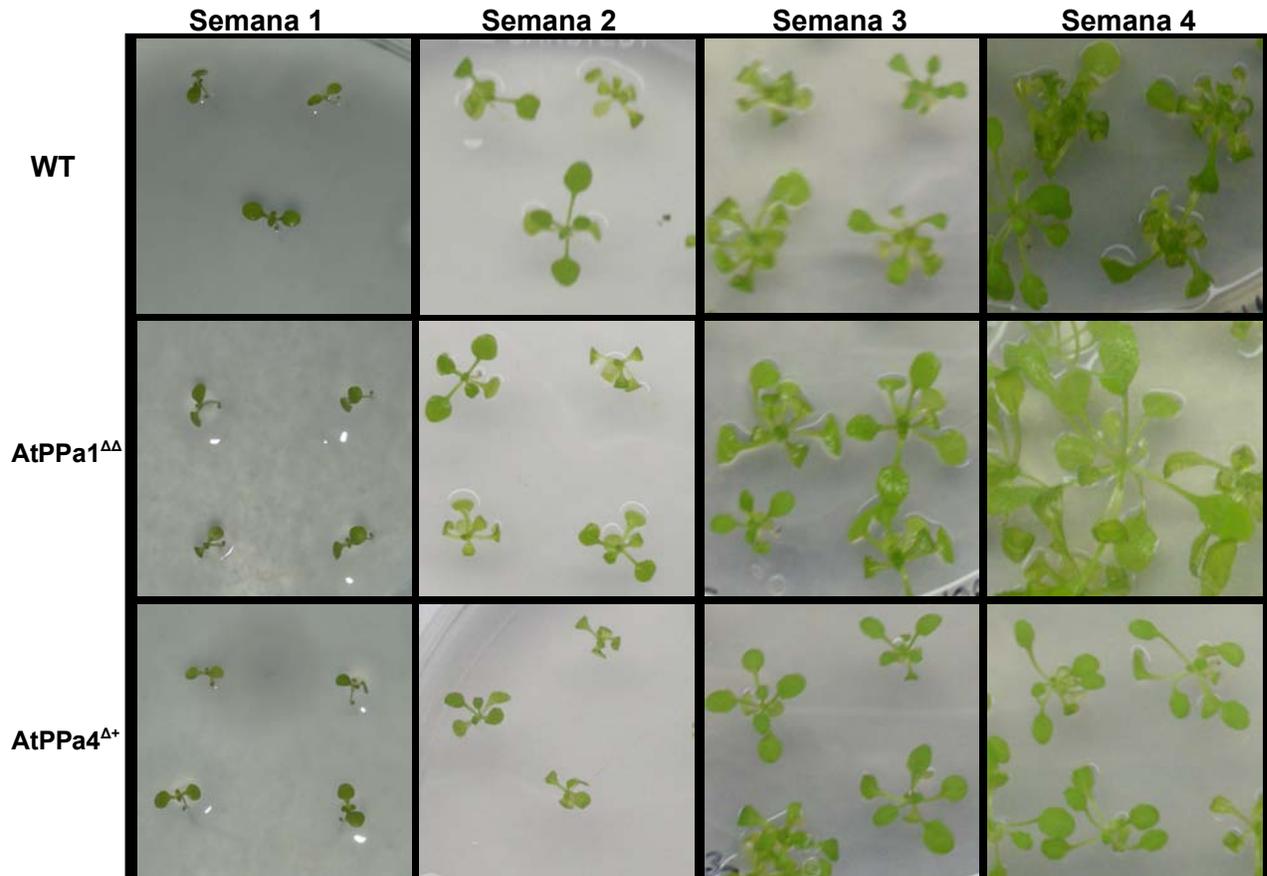
En la figura 12 se muestra una representación gráfica de las diferencias entre los rangos que agrupan el 50% de los individuos para cada parámetro. Las diferencias entre el grupo WT y las mutantes *AtPPa1<sup>ΔΔ</sup>* y *AtPPa4<sup>Δ+</sup>* son claras.



**Figura 12** Representación gráfica de los rangos para cada parámetro bajo estrés salino con NaCl 35mM

### ***Estrés por exceso de fosfato***

Las plantas  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  fueron sometidas a estrés por exceso de fosfato y se observó su desarrollo a lo largo de 4 semanas (Figura 13).



**Figura 13** Comparación de las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  respecto a las plantas silvestres (WT) a las 4 semanas de edad crecidas en presencia de 2.5mM de  $PO_4^{3-}$ .

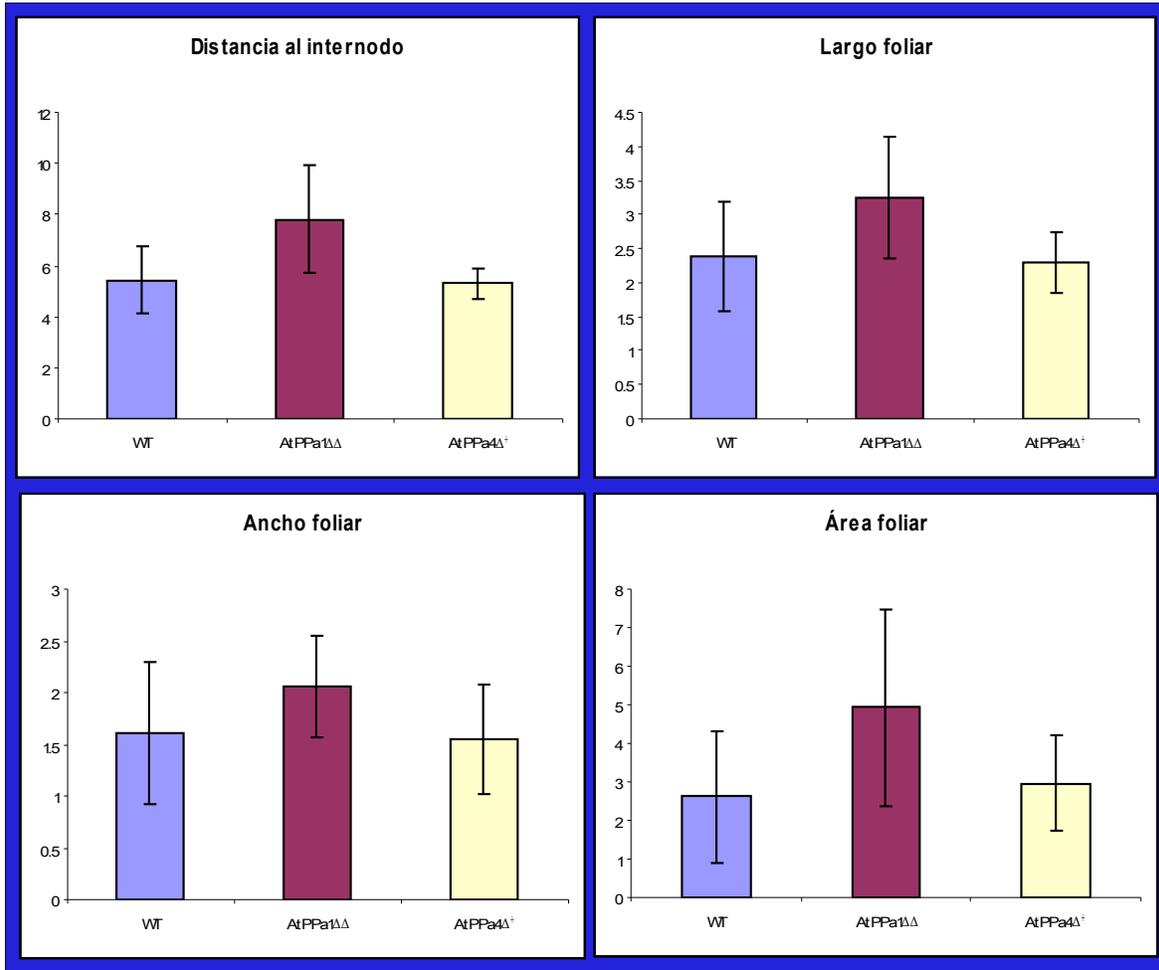
Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido se realizó el análisis de las características foliares de las plantas con el fin de observar diferencias entre las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$ ,  $AtPPa4^{\Delta+}$  y la silvestre. A los resultados se les realizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis. Las diferencias encontradas en los rangos fueron aisladas mediante la prueba de Dunn. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SigmaStat (Tabla 6).

**Tabla 6** Comparación de las características foliares de las AtPpa1<sup>ΔΔ</sup> y AtPpa4<sup>Δ+</sup> respecto a las plantas silvestres (WT). Las plantas tenían 4 semanas de edad y fueron cultivadas en presencia de 2.5mM de fosfato.

	<b>Distancia al Internodo</b>	<b>Longitud Foliar</b>	<b>Ancho Foliar</b>	<b>Area Foliar</b>
<b>WT (n=9)</b>	5.431 ± 1.333	2.381 ± 0.807	1.606 ± 0.689	2.607 ± 1.703
<b>AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> (n=11)</b>	7.8 ± 2.107*	3.25 ± 0.897*	2.055 ± 0.496	4.922 ± 2.557*
<b>AtPPa4<sup>Δ+</sup> (n=12)</b>	5.29 ± 0.569	2.293 ± 0.446	1.544 ± 0.53	2.957 ± 1.241

Los valores muestran el rango que agrupa al 50% central de la población  
 \* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (P < 0.05).

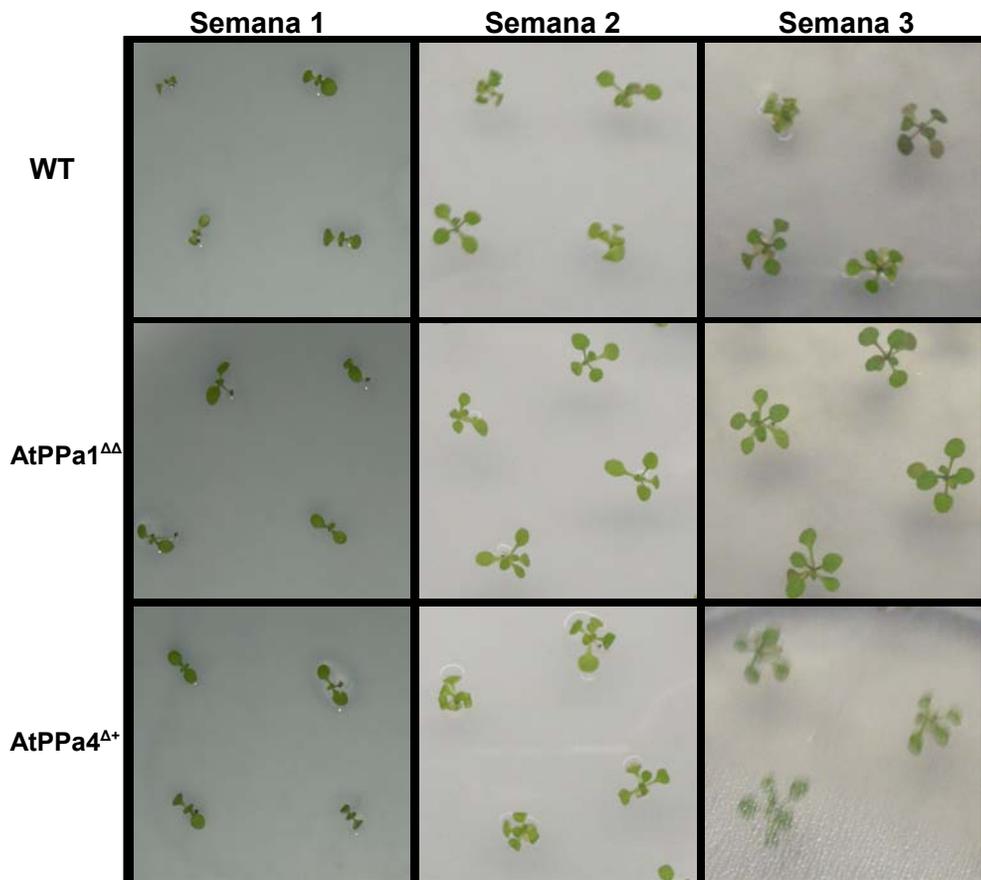
En la figura 14 se muestra una representación gráfica de las diferencias entre los rangos que agrupan el 50% de los individuos para cada parámetro. Las diferencias entre el grupo WT y las mutantes AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> son claras.



**Figura 14** Representación gráfica de los rangos para cada parámetro bajo estrés por exceso de fosfato.

***Estrés por deficiencia de fosfato***

Las plantas  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  fueron sometidas a estrés por deficiencia de fosfato y se observó su desarrollo a lo largo de 3 semanas (Figura 15).



**Figura 15** Comparación de las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$  y  $AtPPa4^{\Delta+}$  respecto a las plantas silvestres (WT) a las 3 semanas de edad crecidas en ausencia de  $PO_4^{-3}$ .

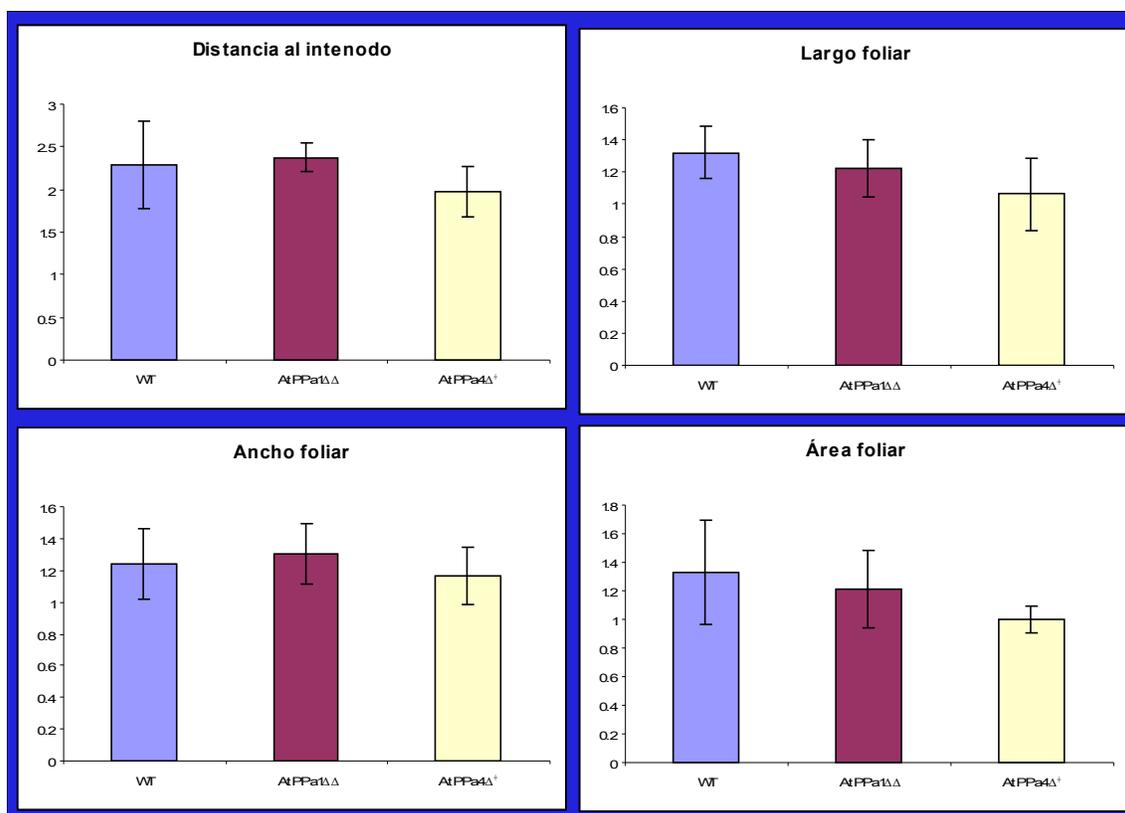
Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido se realizó el análisis de las características foliares de las plantas con el fin de observar diferencias entre las mutantes  $AtPPa1^{\Delta\Delta}$ ,  $AtPPa4^{\Delta+}$  y la silvestre. A los resultados se les realizó una ANOVA de una cola en rangos con el método de Kruskal-Wallis. Las diferencias encontradas en los rangos fueron aisladas mediante la prueba de Dunn. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SigmaStat (Tabla 7).

**Tabla 7** Comparación de las características foliares de las AtPpa1<sup>ΔΔ</sup> y AtPpa4<sup>Δ+</sup> respecto a las plantas silvestres (WT). Las plantas tenían 3 semanas de edad y fueron cultivadas en ausencia de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

	<b>Distancia al Internodo</b>	<b>Longitud Foliar</b>	<b>Ancho Foliar</b>	<b>Area Foliar</b>
<b>WT (n=8)</b>	2.297 ± 0.512	1.321 ± 0.161	1.238 ± 0.225	1.329 ± 0.368
<b>AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> (n=15)</b>	2.371 ± 0.168	1.222 ± 0.179	1.305 ± 0.19	1.21 ± 0.268*
<b>AtPPa4<sup>Δ+</sup> (n=11)</b>	1.972 ± 0.298	1.063 ± 0.226*	1.168 ± 0.18	0.998 ± 0.092*

Los valores muestran el rango que agrupa al 50% central de la población  
 \* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (P < 0.05).

En la figura 16 se muestra una representación gráfica de las diferencias entre los rangos que agrupan el 50% de los individuos para cada parámetro. Es posible apreciar diferencias entre el grupo WT y las mutantes AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> y AtPPa4<sup>Δ+</sup>, sin embargo, debido a la gran diferencia en el número de individuos por grupo es difícil asociar estas diferencias a las mutaciones. Por otro lado la diferencia más notable se observa en el color de las hojas (no se muestra).



**Figura 16** Representación gráfica de los rangos para cada parámetro bajo estrés por deficiencia de fósforo.

## ***Análisis de resultados***

En los resultados que se muestran en la Figura 2 es posible apreciar diferencias significativas entre el crecimiento del tallo de las mutantes AtPPa1 y AtPPa4, gracias al cual se facilitó el discernir entre las plantas que posiblemente presentaban la mutación y las que la habían perdido. Sin embargo, el hecho de que presentasen un fenotipo distinto no garantiza que la mutación fuera causada por la inserción del T-DNA, ni que los individuos fueran homocigos. Por ello, es necesario comprobar el genotipo mediante evidencias de tipo molecular.

Inicialmente, se siguió el procedimiento recomendado por la iniciativa TAIR para la identificación de las mutanes, dicho procedimiento consiste en amplificar el gene de interés, a partir de DNA genómico de la planta, usando oligonucleótidos específicos el mismo. Dicho procedimiento produciría una banda sólo en los casos en que el individuo portara, al menos, una copia del gene silvestre. Adicionalmente, empleando uno de estos dos oligonucleótidos, combinado con un oligonucleótido interno del T-DNA, es posible amplificar un fragmento correspondiente al gene interrumpido por el transposón. Así, se esperaba que los individuos mutantes mostraran una banda distinta a los individuos silvestres. Aquellos individuos heterocigotos, presentaría ambas bandas. La amplificación del gen completo con el inserto de T-DNA no pudo ser comprobada en el experimento, lo cual pudo haberse debido a que el fragmento es demasiado largo para ser amplificado por la Taq polimerasa en ensayos convencionales de PCR.

Por otro lado, debido a que el marcador de selección presente en el T-DNA empleado para generar las colecciones portaba resistencia al herbicida BASTA™, se podría utilizar esta herramienta para la selección. Sin embargo, *Arabidopsis* es muy sensible a este herbicida y, a menudo, las diferencias no son suficientemente claras, ya que aún los mutantes son afectados por el herbicida. El hecho de haber encontrado un fenotipo claro entre la descendencia nos permitió seleccionar por fenotipo y evitar el uso de BASTA, lo que mejora el rendimiento de la cosecha y facilita una selección más rápida. Por otro lado, esto resultó un inconveniente al final, ya que la amplificación del fragmento del T-DNA de las mutantes no

pudo conseguirse, aunque tampoco se observaba la amplificación del gene silvestre (como si ocurría en las plantas silvestres). Esto nos llevó a suponer que el T-DNA había sufrido mutaciones y que el oligonucleótido empleado ya no era útil, sin embargo, la inserción parecía persistir, ya que el fenotipo estaba presente.

Para demostrar la presencia de la mutación se decidió determinar la ausencia del mRNA correspondiente a estas proteínas en las mutantes. Es claro que, independientemente de los cambios que hubieran ocurrido en el T-DNA, si el inserto persistía, el mRNA no se produciría en el caso de que el inserto se encontrara en un exón y no sería posible detectarlo mediante RT-PCR, sin embargo, para el caso en el cual el inserto está en un intrón es difícil distinguir las mutantes homocigas de las heterocigas mediante este método.

Al realizar la amplificación de los fragmentos de RNA figura 4, la mutante para el gene AtPpa1 mostró la ausencia del mensaje correspondiente, por lo que se consideró que era efectivamente AtPpa1<sup>ΔΔ</sup>. Por otro lado, la mutante putativa en el gene AtPPa4 seguía presentando el mRNA, aunque severamente disminuído, con relación a la planta silvestre. Aunque es posible que un nivel de mensaje disminuído no se traduzca en una reducción del nivel de proteína correspondiente. Lo que si es claro, es que la proteína debe expresarse en menor cantidad, ya que de otro modo no se observaría un fenotipo.

El fenotipo observado de la longitud del tallo floral es en realidad desventajoso cuando las plantas se crecen en condiciones óptimas, ya que la menor longitud del tallo floral complica el acceso al polen, reduciendo la fertilización cruzada y poniendo al individuo en desventaja en la competencia reproductiva. Dicha presión de selección puede explicar la ausencia de este carácter entre las plantas silvestres. Especialmente, porque la no expresión de estas pirofosfatasa parece brindar a la planta una mayor resistencia al estrés.

La tabla 8. resume las diferencias fenotípicas observadas bajo condiciones de estrés. Las plantas mutantes fueron igualmente sensibles al estrés osmótico y, al igual que la planta silvestre, son poco afectadas por las bajas temperaturas. Lo cual no sorprende pues este

ecotipo fue seleccionado para crecer en climas relativamente fríos y húmedos.

**Tabla 8** Diferencias entre las líneas mutantes probadas comparadas contra el control

<b>Prueba de estrés</b>	<b>AtPPa1<sup>ΔΔ</sup></b>	<b>AtPPa4<sup>Δ+</sup></b>
Térmico 4°C	=	=
Térmico 45°C	=	+
Osmótico	=	=
Salino	+	++
Exceso de -PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	+	=
Deficiencia de -PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	+	+

= No hay diferencia entre la mutante y la silvestre

+ Más tolerante que la silvestre

++ Más tolerante que la otra mutante

Por otro lado, ambas plantas mutantes fueron más tolerantes al estrés salino y a la deficiencia de fósforo, siendo la mutante AtPpa4<sup>ΔΔ</sup>, extraordinariamente resistente al estrés salino (Tablas 11 y 14, y figura 15). En este sentido cabe mencionar que una mayor tolerancia a estrés salino y a deficiencia de fósforo puede también observarse en plantas que expresan niveles más elevados de la pirofosfatasa de protones de la membrana vacuolar [17,57]. En el caso de estas plantas, se ha demostrado que el transporte de auxinas hacia los órganos de crecimiento está aumentado [30]. Dicho aumento puede explicar un crecimiento más rápido, lo que posibilitaría a la planta a escapar parcialmente al estrés. Pero también puede ser que la actividad de esta proteína genera un mayor potencial electroquímico entre la vacuola y el citoplasma, mejorando la capacidad de la planta para acumular sodio y fosfato en las vacuolas.

Una explicación compatible con los datos anteriores, para el fenotipo observado en las plantas mutantes aquí presentadas sería que al reducir el consumo de pirofosfato por las isPPiases, quedaría más sustrato disponible para la H<sup>+</sup>-PPiase, lo que a final de cuentas, tendría efectos semejantes a la sobreexpresión de esta última enzima. Sin embargo, esta explicación no es suficiente para explicar la notable tolerancia al estrés calórico de las mutantes, aunque es posible que tal tolerancia esté relacionada con un transporte más activo de auxinas a través de la planta, como ocurre con las sobreexpresoras de la H<sup>+</sup>-PPiase [30].



## CONCLUSIONES

- La presencia de fenotipos observables en las plantas mutantes AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> y AtPPa4<sup>Δ+</sup> indica que la presencia de dichos genes no obedece a simple redundancia genética y que posee papeles propios en la fisiología vegetal, que no pueden ser complementados del todo por las isoformas restantes.
- Las plantas AtPPa1<sup>ΔΔ</sup> y AtPPa4<sup>Δ+</sup> carecen de enzimas con idéntica actividad enzimática y secuencia de aminoácidos muy semejante, ambas putativamente localizadas en el citosol. Sin embargo, sus fenotipos no son equivalentes, ni se explican sólo por el posible grado de reducción en la capacidad para hidrolizar pirofosfato. Por lo que sus papeles fisiológicos son también distintos entre sí.
- La mayor tolerancia al estrés de estas plantas sugiere que estas variaciones deberían haberse presentado ya en la naturaleza, dando como resultado plantas con mejor potencial adaptativo y ventajas reproductivas. El hecho de que esto no haya sucedido indica que poseen desventajas importantes, de las cuales, no obtuvimos evidencia, fuera de la menor capacidad para competir por el polen durante la época reproductiva.

## PERSPECTIVAS

- Los resultados presentados en este trabajo indican que el metabolismo del pirofosfato posee una función muy relevante en la fisiología vegetal y que su consumo y producción estarán seguramente muy bien controlados. Por lo tanto, es de gran interés el que en el futuro se profundice en el estudio de las mutantes aquí descritas y amplíen el análisis a las mutantes carentes de las 4 enzimas restantes, así como también a las plantas que sobreexpresen la actividad de dichas enzimas.

## REFERENCIAS

- 1 **Alia, Hayashi H, Sakamoto A, Murata N. (1998)** Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.* 16(2): 156-161.
- 2 **Brown T A. (2006)** Gene cloning and DNA analysis: An introduction. Faculty of Life Sciences. Quinta edición. University of Manchester. UK. 141-145.
- 3 **Buchanan B H. (2001)**, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2001. pags 1222-1223.
- 4 **Bucke C. (1970)** The distribution and properties of alkaline inorganic pyrophosphatase from higher plants, *Phytochemistry*. 9: 1303–1309.
- 5 **Carswell C, Grant B R, Theodorou M E, Harris J, Niere J O, Plaxton W C. (1996)** The Fungicide Phosphonate Disrupts the Phosphate-Starvation Response in *Brassica nigra* Seedlings. *Plant Physiol* 10(1):105-110.
- 6 **Chen J, Brevet A, Fromant M, Lévêque F, Schmitter J M, Blanquet S, Plateau P. (1990)** Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:5686-5689.
- 7 **Chi A, Kemp R G. (2000)** The Primordial High Energy Compound: ATP or Inorganic Pyrophosphate?. *J. Biol. Chem.* 275():35677-35679.
- 8 **Coello-Coutiño M P (2001)** Respuesta de las plantas a la deficiencia de fósforo. Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 43-54.

- 9 **Dancer J E, apRees T. (1989)** Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic-pyrophosphate content of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta* 178():421-424.
- 10 **Dancer J, Veith R, Feil R, Komor E, Stitt M. (1990,)** Independent changes of inorganic pyrophosphatase and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Sci.* 66:59-63.
- 11 **Du Jardin P, Rojas-Beltran J, Gebhardt C, Brasseur R. (1995)** Molecular cloning and characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase in potato, *Plant Physiol.* 109: 853-860.
- 12 **Edwards C A. (2001)**, Agricultural systems:ecology. *Encyclopedia of Life Sciences*; 1-6.
- 13 **Farré E M, Geigenberger P, Willmitzer L, Trethewey R N. (2000)** A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber. *Plant Physiol.* 123: 681-688.
- 14 **Farré E M, Tech S, Trethewey R N, Fernie A R, Willmitzer L. (2006)** Subcellular pyrophosphate metabolism in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Mol Biol.* 62(1-2):165-179.
- 15 **Fernie A R, Willmitzer L, Trethewey R N (2002)** Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology . *TRENDS in Plant Science* 7:35-41
- 16 **Fuks B, Homblé F. (1999)** Passive anion transport through the chloroplasts inner envelope membrane measured by osmotic swelling of intact chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1416 361–369.
- 17 **Gaxiola R A, Li J, Undurraga S, Dang L M, Allen G J, Alper S L, Fink G R. (2001)**

Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(20):11444-11449.

18 **Gaxiola R A, Palmgren M G, Schumacher K. (2007)** Plant proton pumps. FEBS Lett. May 25;581(12):2204-14. Epub 2007 Mar 30. Review.

19 **Gelvin S B. (2003)** *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67: 16-37.

20 **Gómez-García M R, Losada M, Serrano A. (2006)** A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. Biochem. J. 395():211-221.

21 **Heinonen J K. (2001)** The biological role of Inorganic pyrophosphatase. Kluwer Academic Publishers. Boston, U.S.A. pp.10-13.

22 **Hurry V, Strand A, Furbank R, Stitt M, (2000)** The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperatures is revealed by the *pho* mutants of *Arabidopsis thaliana*, Plant J 24, 383-396.

23 **Jiang S S, Fan L L, Yang S J, Kuo S Y, Pan R L. (1997)** Purification and characterization of thylakoid membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Spinacia oleracea* L. Arch Biochem Biophys 346,105-112.

24 **Kieber J J, Signer E R. (1991)** Cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase gene from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 16: 345-348.

25 **Korngberg A. (1962)** On the metabolic significance of phospholytic and pyrophosphorytic reactions. EN: Horizons in Biochemistry Kasha M, Pullman B, eds. New York, Academic Press pp 251-254.

- 26 **Krishnan V A, Gnanam A. (1988)** Properties and regulation of Mg<sup>2+</sup>-dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase from *Sorghum vulgare* leaves. Arch Biochem Biophys 260, 277-284.
- 27 **Kuhn N J, Ward S. (1998)** Purification, properties and multiple forms of a manganese activated inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. Archives of Bioch. And Biophys; 354: 1: 47-56.
- 28 **Lara-Núñez A, Rodríguez-Sotres R. (2004)** Characterization of a dicarboxylate exchange system able to exchange pyrophosphate for L-malate in non-photosynthetic plastid from developing maize embryos. Plant Science 166(5):1335-1343.
- 29 **Lee J W, Lee D S, Bhoo S H, Jeon J S, Lee Y H, Hahn T R. (2005)** Transgenic Arabidopsis plants expressing *Escherichia coli* pyrophosphatase display both altered carbon partitioning in their source leaves and reduced photosynthetic activity. Plant Cell Rep. 23: 374-382.
- 30 **Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S, Gaxiola R. (2005)** Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. Science. Oct 7;310(5745):121-5.
- 31 **Lundin M, Baltscheffsky H, Ronne H. (1991)** Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. Journal of Biological Chemistry 266(19):12168-12172).
- 32 **Lunn J E, Douce R. (1992)** Transport of inorganic pyrophosphate across the spinach chloroplast envelope, Biochem. J. 290 375–379.
- 33 **Maeshima M. (2001)** Tonoplast transporters: Organization and Function. Annu. Rev. Plant

Physiol. Plant Mol. Biol. 52:469-497.

34 **Maeshima M. (1996)**, *Vacuolar H<sup>+</sup> Pyrophosphatase*. Biochim. Biophys. Acta. 1465:37-51.

35 **Maslowski P, Maslowska H, Kowalczyk S. (1977)** Subcellular distribution and properties of alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves, Acta Biochim. Pol. 24: 117–126.

36 **Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato M H. (2001)**, Novel type *Arabidopsis thaliana* H<sup>+</sup>-PPase is localized in the Golgi apparatus. FEBS Lett; 488:29-33.

37 **Mortain-Bertrand A, Uteau F, Enault N, d'Harlingue A, Schaeffer J, Lamant A. (1992)** Characterization of alkaline inorganic pyrophosphatase from *Capsicum annum* chloroplasts. Plant Physiology and Biochemistry 30:779-788.

38 **Navarro-De la Sancha E. (2005)** Identificación y caracterización de genes de pirofosfatasa posiblemente implicados en la respuesta a la deficiencia de fósforo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.

39 **Navarro-De la Sancha E, Coello-Coutiño M P, Valencia-Turcotte L G, Hernández-Domínguez E, Trejo-Yepes G, Rodríguez-Sotres R. (2007)** Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 172(4): 796-807.

40 **Park S, Li J, Pittman J K, Berkowitz G A, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi K D, Gaxiola R A (2005)** Up-regulation of a H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. Proc Natl Acad Sci USA. 102:18830-35.

41 **Poirier Y, Bucher M. (2002)** Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists.

- 42 **Ragothama K G. (1999)** Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-93.
- 43 **Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M. (1998)** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- 44 **Schulze S, Mant A, Kossman J, Loyd J R. (2004)** Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. *FEBS Letters.* 565: 101-105.
- 45 **Silvula S A, Parfenyev A N, Pekka P. (1999)** Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters* 454 (1999) 75-80 USDA, 2000.
- 46 **Stitt M. (1998)** Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: An enigmatic alternative to ATP. *Botanica Acta* 111(3):167-175.
- 47 The Arabidopsis Information Resource, 24 de abril de 2008. Disponible en: <http://www.arabidopsis.org/>
- 48 **Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini T Z, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L, Radenbaugh A, Singh S, Swing V, Tissier C, Zhang P, Huala E. (2008)**, The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation, *Nucl. Acids Res.* 36, D1009-D1014.
- 49 **Thibaud J B, Davidian J C, Sentenac H, Soler A, Grignon C. (1988)** H<sup>+</sup> cotransports in roots as related to the surface pH shift induced by H<sup>+</sup> excretion. *Plant Physiol.* 88: 1469-1473.
- 50 **Thomashow M F. (1999)** Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:571-599.

51 **Ullrich-Eberius C I, Novacky A, van Bel A J E. (1984)** Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* 161: 46-52.

52 **Versaw W K, Harrison M J. (2002)** A chloroplast phosphate transporter, PHT2, 1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14: 1751-1766.

53 **Vianello A, Petrusa E, Macri F. (1994)** ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate, *FEBS Lett.* 349, 407-410.

54 **Visser K, Heimovaara-Dijkstra S, Kijne J W, Wang M. (1998)** Molecular cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase from barley, *Plant Mol. Biol.* 37: 131–140.

55 **Weiner H, Stitt M, Heldt H. (1987)** Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 893(1):13-21.

56 **Wiegel D, Glazebrook J. (2005)** *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 19-26. behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67: 16-37. cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase from barley, *Plant Mol. Biol.* 37: 131–140.

57 **Yang H, Knapp J, Koirala P, Rajagopal D, Peer W A, Silbart LK, Murphy A, Gaxiola R A. (2007)** Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Plant Biotechnol J.* 5:735-745.