



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO SOBRE LA
ACTIVIDAD DEL COMPLEJO S_nRK-1 DURANTE EL
DESARROLLO DE SEMILLAS DE FRIJOL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

VIRIDIANA CORONA CASTAÑEDA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Luz del Carmen Castellanos Román
VOCAL	Rosario Adelaida Muñoz Clares
SECRETARIO	J. Eleazar Martínez Barajas
PRIMER SUPLENTE	Mireya Rodríguez Penagos
SEGUNDO	Tzvetanka Dimitrova Dinkova
SUPLENTE	

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioquímica, laboratorio 102,
Facultad de Química, Conjunto E
Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR

DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

SUSTENTANTE

VIRIDIANA CORONA CASTAÑEDA

Gracias

A Dios por darme una buena familia, por guiarme en todo momento y ayudarme a lograr mis objetivos profesionales.

A mis papás Leticia y Enrique por brindarme su cariño, enseñanzas, valores, apoyo, comprensión, sus palabras de aliento en los momentos difíciles y sobre todo por creer en mí. Gracias a ustedes lo tengo todo.

A mis hermanas Valeria y Berenice porque siempre están conmigo, por sus consejos, cariño, comprensión y por su apoyo.

A mi sobrino Abraham por ser una alegría en mi vida, enseñarme nuevas cosas y recordar otras que ya había olvidado.

A mis abuelitos, porque me enseñaron a ser una persona honesta, responsable y enseñarme que no importa lo que seas, siempre y cuando seas el mejor.

A mis profesores de toda la carrera por sus enseñanzas que contribuyeron a mi formación académica.

A Jimena, mi amiga de toda la carrera, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por las risas compartidas, las quemadas vividas, las noches desveladas, las comidas olvidadas, y sobre todo por ser un gran apoyo para mí. Alicia y Sergio por brindarme su amistad, apoyo, comprensión a lo largo de la carrera, me enseñaron muchas cosas que no se aprenden en el salón. Humberto por ser tan especial conmigo, ayudarme cuando el tedio se había apoderado de mí, por tu apoyo, cariño y comprensión.

Agradezco el apoyo brindado por las siguientes personas e Instituciones:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química por permitir mi formación académica.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de septiembre a diciembre de 2008 a través del proyecto 46827-Q.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por la beca otorgada durante el período de junio a septiembre de 2009 a través del proyecto PAPIIT IN207907.

Dra. Luz del Carmen Castellanos Román por darme apoyo en los momentos difíciles y por ser una gran asesora, ayudándome a la corrección de este manuscrito.

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares por enseñarme que se debe trabajar con excelencia y calidad, por ser un apoyo en la corrección de esta tesis orientándome de la mejor manera.

Dra. Lilia Bernal, por su atención, tiempo, dedicación y sobretodo porque me ayudó en los momentos difíciles sin que fuera su obligación.

Dr. Eleazar Martínez Barajas por sus atenciones, tiempo, dedicación y paciencia en la dirección de la presente tesis y por todo lo que he aprendido, como la tolerancia a la frustración, tener humildad, responsabilidad para terminar un proyecto y saber que un título no hace a la persona.

Todos mis compañeros del laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, por todas las cosas que compartimos.

Í N D I C E

	Página
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Marco Teórico	3
2.1 Generalidades del cultivo de frijol.....	3
2.2 Desarrollo de la planta de frijol.....	4
2.2.1 <i>Morfogénesis de la semilla y características de la planta de frijol</i>	4
2.2.2 <i>Maduración de la semilla de frijol</i>	7
2.3 Requerimientos nutricionales.....	8
2.4 Fósforo.....	9
2.4.1 <i>Deficiencia de fósforo</i>	9
2.5 Deficiencia energética.....	10
2.5.1 <i>AMPK (AMP-activated protein kinase)</i>	11
2.5.2 <i>SNF1 (Sucrose non Fermenting-1 protein kinase)</i>	13
2.5.3 <i>SnRK-1 (SNF1 related protein kinase)</i>	14
2.5.4 <i>Subunidades que forman parte de los complejos cinasas AMPK, SNF1, SnRK-1</i>	15
2.5.4.1 Subunidad catalítica α	15
2.5.4.2 Subunidad regulatoria β	16
2.5.4.3 Subunidad regulatoria γ	17
2.5.4.4 Isoformas de las subunidades.....	17
2.5.5 <i>Actividad cinasa del complejo heterotrimérico</i>	18
Capítulo 3. Objetivos e Hipótesis	20
Capítulo 4. Diseño Experimental	21
4.1 Cultivo de plantas de frijol	22
4.2 Extracción de proteínas de semillas y vainas de frijol	24
4.3 Cuantificación de proteínas por el Método Bradford	24
4.4 Ensayo para determinar la actividad cinasa del complejo <i>SnRK-1</i>	25
4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	26
4.6 Determinación de subunidades a través de <i>Western Blot</i>	26
4.7 Inmunoprecipitaciones.....	27
4.8 Tinción con plata de los geles obtenidos en SDS-PAGE.....	28
4.9 Determinación de la conformación del complejo <i>SnRK-1</i>	28
4.10 Determinación de la conformación del complejo empleando el entrecruzador Ditiobis Succinimidil Propionato (DSP)	29
Capítulo 5. Resultados	30
5.1 Actividad cinasa del complejo <i>SnRK-1</i>	30
5.2 Expresión de las subunidades del complejo <i>SnRK-1</i> en diferentes etapas de desarrollo de vaina y semilla.....	30
5.3 Expresión de las subunidades que forman el complejo <i>SnRK-1</i> en semillas.....	34
5.4 Inmunoprecipitación	38

5.5	Composición probable del complejo en embriones de semillas de 20 días de desarrollo	39
5.6	Establecimiento de la composición probable del complejo en embriones de semillas de 20 días de desarrollo usando el entrecruzador DSP Ditiobis.....	43
5.7	Determinación de la presencia de ubiquitina.....	44
Capítulo 6. Discusión de Resultados.....		46
Capítulo 7. Conclusiones.....		50
Bibliografía.....		51

Í N D I C E D E F I G U R A S

	Página
Figura 1. Distribución de los cultivos de frijol en México.....	3
Figura 2. Desarrollo de la planta de frijol	5
Figura 3. Esquema de la maduración de la semilla.....	8
Figura 4. Concentraciones adecuadas de minerales en las plantas.....	8
Figura 5. Plantas de frijol con y sin deficiencia de fósforo.....	10
Figura 6. Activación y modulación de <i>AMPK</i>	12
Figura 7. Activación y modulación de <i>SNF1</i>	13
Figura 8. Activación y modulación de <i>SnRK-1</i>	14
Figura 9. Tipos de las subunidades presentes en los diferentes complejos.....	15
Figura 10. Subunidades clásicas que conforman a los complejos con actividad cinasa <i>AMPK</i> , <i>SNF1</i> , <i>SnRK-1</i>	18
Figura 11. Secuencia de aminoácidos reconocida por los complejos <i>AMPK</i> , <i>SNF1</i> y <i>SnRK-1</i> ..	19
Figura 12. Diagrama de trabajo (Primera parte).....	21
Figura 13. Diagrama de trabajo (Segunda parte).....	22
Figura 14. Composición de la disolución nutritiva Hoagland modificada.....	23
Figura 15. Diluciones recomendadas para los anticuerpos de cada subunidad.....	27
Figura 16. Tiempos de exposición para cada subunidad.....	27
Figura 17. Actividad cinasa del complejo <i>SnRK-1</i> sobre el péptido SAMS.....	30
Figura 18. Características de las muestras en las diferentes etapas de desarrollo.....	31
Figura 19. <i>Western Blot</i> de vainas y semillas en diferentes etapas de desarrollo.....	31
Figura 20. SDS-PAGE del extracto proteínico de cubierta, embrión y cotiledón de semillas secas.....	34
Figura 21. <i>Western Blot</i> de semillas de 20 días de desarrollo y semillas secas.....	35
Figura 22. Masas moleculares y concentración relativa de las subunidades del complejo <i>SnRK-1</i>	38
Figura 23. Gel teñido con plata de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo contra la subunidad α	39
Figura 24. Calibración de la columna Superdex 200.....	39
Figura 25. Gel que contiene las fracciones que se colectaron en la columna Superdex 200 teñido con plata.....	40
Figura 26. <i>Western Blot</i> realizado a las fracciones obtenidas por la Cromatografía de Filtración en Gel	41
Figura 27. <i>Western Blot</i> realizado a las fracciones obtenidas por la Cromatografía de Filtración en Gel usando el entrecruzador DSP.....	43
Figura 28. <i>Western Blot</i> realizado con el anticuerpo contra Ubiquitina	45
Figura 29. Elucidación de subunidades del complejo <i>SnRK-1</i> en extractos de embriones de semillas de 20 días de desarrollo entrecruzados con DSP y fraccionados en una columna de exclusión molecular.....	45

Capítulo 1. Introducción

El fósforo es un nutrimento esencial para el desarrollo de las plantas debido a que interviene en procesos importantes como la producción de energía (síntesis de ATP), el transporte de nutrientes, la transferencia de información genética, la formación de estructuras membranales, entre otras funciones importantes. Cuando este nutrimento está ausente la productividad de los cultivos se ve reducida notablemente.

En la actualidad existe una gran proporción de suelos agrícolas en donde la cantidad de fósforo es insuficiente para el desarrollo de las plantas; esto se debe principalmente a la facilidad con que este elemento forma complejos que las plantas no son capaces de asimilar.

El cultivo de frijol es uno de los más importantes en nuestro país, la mayoría de las zonas productoras se localizan en regiones de la República Mexicana donde la cantidad de agua es limitada y los suelos son deficientes de fósforo. Gracias a la amplia diversidad genética, es posible seleccionar genotipos de frijol que exhiben cierta tolerancia a la falta de este nutriente, lo cual indica la existencia de mecanismos que ayudan a incrementar la incorporación y/o hacer un uso más eficiente del fósforo disponible. Las cinasas del tipo ***SnRK-1*** (*Sucrose non fermenting related protein kinase-1*) se activan en condiciones de estrés, promueven la fosforilación de enzimas clave que redirigen el metabolismo y favorecen la adaptación de las plantas a esta condición.

El complejo proteínico ***SnRK-1*** se conforma por tres subunidades: la catalítica denominada α y dos regulatorias llamadas β y γ . Actualmente se ha reportado que existen por lo menos dos isoformas de cada de las subunidades regulatorias, lo cual sugiere la existencia de diferentes complejos que reconocen diferentes sustratos.

El propósito de este trabajo de investigación consistió en caracterizar el efecto de la deficiencia de fósforo sobre la expresión de las subunidades del complejo ***SnRK-1*** durante el desarrollo de vainas y semillas de frijol. De tal forma que los resultados obtenidos sirvan como antecedente para el desarrollo experimental que permita establecer la función de dicho complejo en la deficiencia de fósforo.

El desarrollo experimental consistió en la observación del efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad cinasa del complejo, la expresión de las subunidades que lo conforman y las posibles combinaciones para formar los diferentes complejos de ***SnRK-1***.

Para lo cual se emplearon los extractos proteínicos de vainas y semillas de frijol en diferentes etapas de desarrollo, en condiciones de deficiencia y en condiciones óptimas de fósforo.

Se determinó la actividad cinasa de los extractos proteínicos mediante la cuantificación de la incorporación de P^{32} en un péptido sintético llamado SAMS, cuya secuencia de aminoácidos es similar a la secuencia de los aminoácidos de las proteínas blanco que reconoce el complejo **SnRK-1**. Una vez que se determinó el comportamiento de la actividad, se estudió la expresión de las diferentes subunidades empleando la técnica de *Western Blot*. Finalmente para conocer la posible composición del complejo se empleó la separación en una columna de exclusión molecular (Superdex 200) seguido por la técnica de *Western Blot*.

2.1 Generalidades del cultivo de frijol

El frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) pertenece a la familia de las Fabáceas; es una planta de crecimiento rápido que se caracteriza por tener:

- Un sistema radicular ligero constituido por una raíz principal y un gran número de raíces secundarias.
- Hojas sencillas y de tamaño variable según el genotipo.
- Frutos de color verde o amarillo, con forma cilíndrica y dimensiones variables.

Es un cultivo estratégico para México, ya que ocupa el segundo lugar en superficie a nivel nacional con un promedio de 1.68 millones de hectáreas. En el periodo de 2006 a 2008 se produjeron 1.31 millones de toneladas, con un valor de 7.5 mil millones de pesos, (SAGARPA, 2008). Sin embargo, los rendimientos agrícolas obtenidos son bajos debido a la falta de desarrollo tecnológico y a la precipitación irregular en las zonas donde se cultiva el frijol (**Figura 1**).

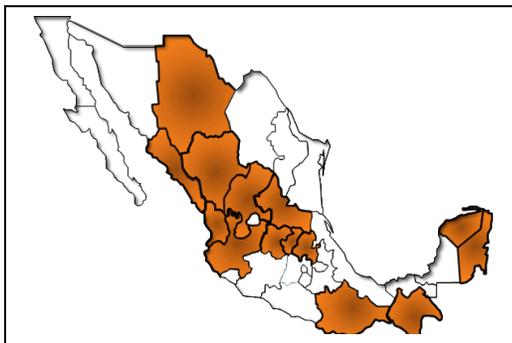


Figura 1. Distribución de los cultivos de frijol en México.

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) estimó que el rendimiento potencial del frijol era de 1.8 ton/Ha y 2.0 ton/Ha, sin embargo en el año 2008, SIAP reportó que el rendimiento promedio a nivel Nacional fue de solo 0.67 ton/Ha. Bajo este panorama se ha sugerido que las posibles causas son la carencia de agua y de nutrientes.

Se estima que existen ciento cincuenta especies de frijol, de las cuales cincuenta se encuentran en México y sólo cuatro especies han sido domesticadas: *Phaseolus vulgaris L.* (frijol común), *Phaseolus coccineus L.* (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus L.* (frijol comba) y

Phaseolus acutifolius gray (frijol tepari). Las dos primeras especies son las más importantes en nuestro país por la superficie sembrada y su producción (Rosales *et. al*, 2001).

Como cualquier otro cultivo, la disponibilidad de agua, la temperatura, el fotoperiodo y la cantidad de nutrientes presentes influyen notoriamente en el crecimiento y desarrollo del frijol. Se ha reportado que las condiciones óptimas para este cultivo consisten en una *humedad relativa* de 60 al 65%, una *temperatura* que oscile entre 10° C a 27° C y respecto a la condición del *suelo*, debe de existir un buen flujo de agua, alto contenido de materia orgánica y pH que se encuentre entre 6.5 y 7.5, dado que en este intervalo de pH la mayoría de los nutrimentos se encuentran disponibles para poder ser asimilados por la planta (Rosales *et al.*, 2001).

2.2 Desarrollo de la planta del frijol

El desarrollo de la semilla es un proceso crucial en el ciclo de la vida de las plantas puesto que provee un nexo entre dos diferentes generaciones. Este proceso está genéticamente programado y correlacionado con los cambios en los niveles de los metabolitos y condiciones ambientales.

De manera general el desarrollo de la semilla se puede dividir en dos etapas: *la morfogénesis y la maduración*.

2.2.1. Morfogénesis de la semilla y características de las plantas de frijol

La morfogénesis (**Figura 2**) es el proceso que comprende desde la germinación hasta la formación de la nueva semilla dentro de la vaina.

El primer signo del inicio de la germinación, corresponde a la aparición de la radícula, la cual se convierte con el tiempo en la raíz primaria o principal. Días después se desarrollan las raíces secundarias y el hipocótilo (parte subterránea del tallo principal), favoreciendo que el cotiledón emerja sobre el suelo.

Una vez que el cotiledón está en la superficie promueve el crecimiento del primer par de hojas primarias y del epicótilo (porción del tallo ubicada entre los cotiledones). De esta manera la planta comienza a crecer.

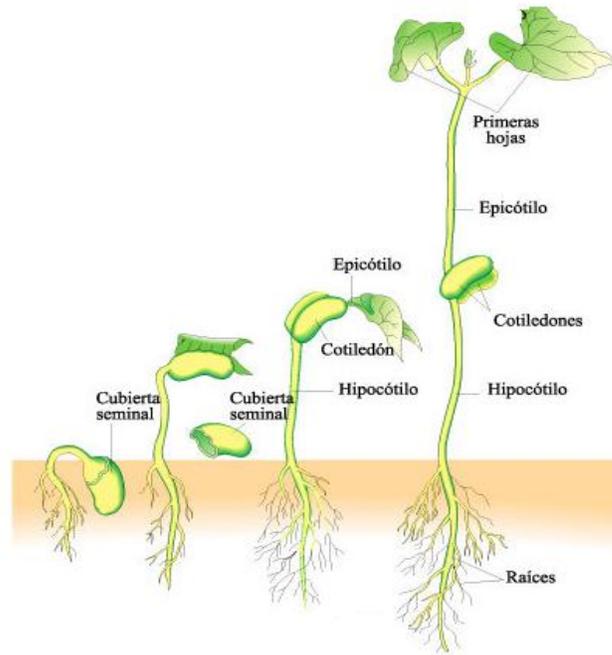


Figura 2. Desarrollo de la planta de frijol.

De acuerdo con la forma de desarrollo, los cultivos de frijol pueden agruparse en cuatro tipos:

- a) *Tipo 1, arbustivo*: La altura de las plantas varía entre 30 cm y 50 cm y la etapa de floración es rápida, la cual marca la pauta para detener el crecimiento del tallo principal y de las ramas.
- b) *Tipo 2, arbustivo indeterminado*: Son plantas pequeñas que poseen pocas ramas y desarrollan una guía pequeña; a diferencia de las plantas arbustivas, la floración no es la pauta para detener el crecimiento del tallo, es decir, aunque la planta tenga inflorescencias, las ramas y el tallo siguen creciendo.
- c) *Tipo 3, indeterminado postrado*: Presentan un importante sistema de ramificación, el tallo principal y las ramas presentan capacidad trepadora; la etapa de floración es más prolongada que en los casos anteriores.
- d) *Tipo 4, trepador*: Su tallo mide 2 metros o más de altura si es guiado; su floración se prolonga durante varias semanas, esto puede comprobarse porque se observan vainas casi secas en la parte basal de la planta mientras que en la parte alta sigue la floración.

En una planta de frijol se encuentran diferentes estructuras, algunas son:

- a) Las **flores** tienen la morfología ideal para la autopolinización, ya que el polen cae directamente sobre el estigma lo cual provoca la rápida apertura de las flores. De cada flor puede formarse una o varias vainas.
- b) Las **vainas** corresponden a los frutos de la planta de frijol; están compuestas por dos valvas que envuelven a las nuevas semillas. En los primeros días de crecimiento, las vainas se elongan lentamente portando rudimentos florales en su parte apical; esta elongación se agiliza durante el desarrollo y maduración de la planta.
- c) Las **semillas** inician su crecimiento poco antes de que las vainas alcancen su máxima longitud. Al iniciar esta etapa se encuentran unidos el endospermo, la cubierta y el embrión para formar a la nueva semilla, que hasta ese momento tiene poco crecimiento. Cuando la vaina tiene el estado de máxima longitud, las semillas crecen con rapidez, debido a que se promueve la división celular favoreciendo el aumento de volumen y tamaño de semilla. La **cubierta** es una estructura crucial para el desarrollo exitoso de la semilla; ya que permite el paso de nutrientes en las etapas iniciales de desarrollo de la semilla.

Durante su desarrollo varios reguladores metabólicos son activados, promoviendo cambios característicos como:

- El desarrollo del meristemo, que es un tejido altamente diferenciado que se caracteriza por una división celular activa.
- La subsecuente incorporación de sacarosa para ser degradada a hexosas.
- La obtención de la actividad fotosintética y la estabilización del estado energético de la planta.
- La inducción del almacenamiento de metabolitos de reserva.

Pero no todas las semillas que se planean formar se logran desarrollar. Esto se debe al fenómeno conocido como *aborto de semillas*, el cual puede ocasionarse por diferentes factores como la escasez de nutrientes, falta de agua o estrés ambiental. La etapa posterior a la formación de la semilla es la maduración.

2.2.2 Maduración de la semilla de frijol

El proceso de la maduración de las semillas (**Figura 3**) se realiza en tres fases (Gutiérrez *et. al.*, 2007) que se mencionan a continuación:

1. *Fase de transición.* Se caracteriza por la desactivación de los controles maternos y la activación de los propios de la semilla. Algunas vías metabólicas y reguladores que intervienen son:
 - *Vía metabólica del nitrógeno.* Porque la reserva de proteína se ve limitada por la capacidad de la semilla para tomar nitrógeno.
 - *Degradación de ácidos grasos.* Dependiendo de la cantidad de ácidos grasos la duración de la maduración se ve modificada.
 - *Acumulación de sacarosa.* Ya que es un prerequisite para la adquisición de la tolerancia de la desecación.
 - *Deficiencia energética.* Puesto que se requiere una gran cantidad de energía para la fase de desecación y latencia.
2. *Desarrollo del embrión y relleno de la semilla.* En esta etapa se observa el crecimiento del embrión y la acumulación de productos de reserva hasta la maduración fisiológica, es decir, cuando la semilla está completamente formada, es de color verde y su humedad promedio se encuentra entre el 52 y el 54%. Esta etapa finaliza con un cese del crecimiento para dar lugar a la diferenciación de las capas que conforman a la semilla.
3. *Desecación y latencia.* En este periodo la semilla pierde agua; durante el secado su color cambia a las diferentes tonalidades características de las variedades de frijol y su humedad promedio llega al 14%. También ocurre la acumulación de azúcares no reductores, las que estabilizan, protegen a las macromoléculas y retienen la integridad funcional de las membranas después de la desecación y rehidratación (Hoekstra *et. al.*, 2001). Los azúcares no reductores pueden servir como una fuente disponible de energía durante la etapa de latencia.

Los procesos de maduración son activados por cambios en el ambiente o en los nutrientes, lo cual genera respuestas en el metabolismo, como la fosforilación de proteínas, para que la semilla comience a adaptarse a las condiciones en que se encuentra (Baena *et al.*, 2007).

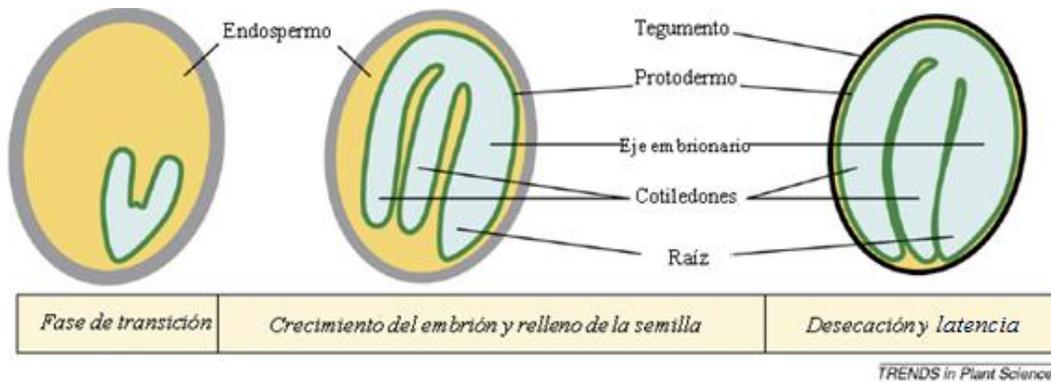


Figura 3. Esquema de la maduración de la semilla.

2.3 Requerimientos nutricionales.

La fotosíntesis provee a la planta de gran parte de los requerimientos nutricionales, cerca del 95% de sus componentes son obtenidos a través de la fotosíntesis y se forman por los elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno. El 5% restante lo obtiene del suelo en forma de minerales, los cuales son indispensables para formar ácidos nucleicos, modular la actividad de enzimas, formar parte de las membranas, regular la presión osmótica e intervenir en la regulación de procesos metabólicos (Salisbury *et al.*, 1969). Estos minerales se pueden clasificar de acuerdo a las cantidades requeridas (**Figura 4**) y a su relevancia en el desarrollo adecuado de la planta, en *macronutrientes* y *micronutrientes*.

Figura 4. Concentraciones adecuadas de minerales en las plantas

Macronutrientes		
Elemento	Forma que asimila la planta	% de peso seco
Nitrógeno	NO_3^- NH_4^+	1.5
Fósforo	H_2PO_4^- HPO_4^{2-}	0.2
Potasio	K^+	1.0
Calcio	Ca^{2+}	0.5
Magnesio	Mg^{2+}	0.2
Azufre	SO_4^{2-}	0.1

Micronutrientes

Elemento	Forma que asimila la planta	% de peso seco
Hierro	Fe ³⁺ Fe ²⁺	0.010
Manganeso	Mn ²⁺	0.0050
Zinc	Zn ²⁺	0.0020
Cobre	Cu ⁺ Cu ²⁺	0.0006
Molibdeno	MoO ₄ ²⁻	0.00001
Boro	BO ³⁻ B ₄ O ₇ ²⁻	0.002
Cloro	Cl ⁻	0.010
Níquel	Ni ²⁺	0.0001

Modificado de Salisbury *et. al.*, 1969.

2.4 Fósforo

El fósforo es un macronutriente que interviene en la formación de moléculas de carácter energético como el ATP y el NADP; participa en la fotosíntesis, la formación de membranas, la transferencia de características genéticas, el transporte de carbohidratos y en diversas transformaciones metabólicas. En tejidos vegetales se encuentra entre 0.2 al 0.5% del peso seco; se caracteriza por ser un elemento móvil, es decir, que cuando existe deficiencia se distribuye preferentemente entre las partes nuevas de las plantas.

Las plantas asimilan fósforo a través de las raíces sólo cuando forma iones ortofosfato (H₂PO₄⁻ y HPO₄²⁻); de esta manera su disponibilidad está en función de su solubilidad, que a su vez se ve modificada por reacciones fisicoquímicas y biológicas. Por ejemplo, en suelos alcalinos el fósforo reacciona con calcio y magnesio formando precipitados que no pueden ser asimilados por las plantas; en cambio, si el suelo tiene pH ácido se forman compuestos con hierro, aluminio y manganeso que tampoco son asimilables (Raghothama, 1999; Poirier y Bucher, 2002).

De esta manera la disponibilidad de fósforo varía, dando como resultado carencias nutricionales en los cultivos.

2.4.1 Deficiencia de fósforo

Las plantas con deficiencia de fósforo manifiestan síntomas (**Figura 5**) como clorosis, puntas de hoja necróticas, pigmentación rojiza en las hojas debida a la formación de antocianinas,

madurez retardada, formación de tallos finos y cortos con hojas pequeñas, favorecimiento del crecimiento de la raíz y disminución del número de brotes. Muchos de los síntomas descritos son más evidentes en las hojas maduras.

La aplicación de un fertilizante puede corregir el problema; sin embargo, buena parte del fósforo añadido también forma complejos que las plantas no pueden aprovechar (Fassbender, 1966 y Bornemisza, 1982), por lo cual es necesaria la aplicación continua.



Figura 5. Plantas de frijol con deficiencia de fósforo (izquierda) y sin deficiencia de fósforo (derecha)

Para superar la deficiencia de fósforo, las plantas implementan una serie de respuestas dentro de las que destacan la expresión de transportadores de fosfato de alta afinidad, el aumento en la secreción de ácidos orgánicos como el cítrico o málico (Raghothama, 1999) y la secreción de enzimas que incrementan la disponibilidad del fósforo. Al mismo tiempo que el fósforo acumulado en la vacuola se transporta a los tejidos que lo requieren (Mimura, 1995). También se implementan medidas que ayudan a mejorar la eficiencia con que se incorpora el fósforo disponible, reciclarlo, redirigirlo o cuando es posible suplirlo con sulfato. Además se estimula la actividad de enzimas que usan pirofosfato en lugar de ATP (Wei-Yi *et al.*, 2008).

A pesar de todos estos ajustes hay varios procesos metabólicos que son muy sensibles a la falta de este nutriente; uno de los más importantes es la producción de ATP, cuyo nivel disminuye notablemente en plantas que sufren de deficiencia de fósforo.

2.5 Deficiencia energética

El control de energía y la homeostasis metabólica son un reto para todos los organismos, de tal manera que la tolerancia al estrés está íntimamente relacionada con la capacidad de los

organismos para mantener la disponibilidad de la energía necesaria para que la célula sobreviva y crezca (Baena *et al.*, 2007). Los organismos constantemente pueden sentir e integrar muchos de los estímulos internos y externos para optimizar el crecimiento y desarrollo. Las diferentes señales son percibidas por receptores específicos lo cual desencadena cascadas de reacciones las cuales promueven las respuestas adecuadas para adaptar al metabolismo de la planta a las condiciones adversas (Rolland *et al.*, 2006).

Las consecuencias de la deficiencia de energía han sido estudiadas por décadas, al igual que los síntomas que se presentan fisiológica, metabólica y molecularmente, tales como el cese de crecimiento, la activación de las vías catabólicas para proveer el uso de nutrientes alternativos y la disminución de la actividad de las enzimas biosintéticas para preservar energía (Baena *et al.*, 2007).

Algunos de los moduladores energéticos que se activan, corresponden a la familia de las cinasas *AMPK/SNF1/SnRK-1*, las cuales se presentan en mamíferos, levaduras y plantas respectivamente. Su función consiste en percibir el estado energético, ajustar el metabolismo del carbono a la carencia de fósforo, lograr la sobrevivencia en ambientes poco aptos y contribuir a la restauración de la homeostasis energética (Baena *et al.*, 2008).

Estas cinasas son complejos proteínicos formados por diferentes subunidades, una subunidad catalítica y dos regulatorias. Pueden existir isoformas de cada subunidad regulatoria, generándose una gran variedad de combinaciones entre las subunidades y por ende una gran cantidad de complejos. Aunque estos complejos conservan ciertas características, su actividad se modula y se expresa de diferente forma en los seres vivos.

2.5.1 *AMPK (AMP-activated protein kinase)*

En mamíferos, el complejo *AMPK* actúa como regulador energético en condiciones de estrés. Como se muestra en la **Figura 6**, este complejo se activa por un aumento en el cociente de AMP/ATP generalmente cuando hay un ejercicio prolongado; una vez activado *AMPK*, se apagan las vías que consumen ATP, tales como la síntesis de ácidos grasos, colesterol y

proteínas; mientras que se encienden las vías para producir ATP como la oxidación de ácidos grasos y la glucólisis (Hardie, 2004).

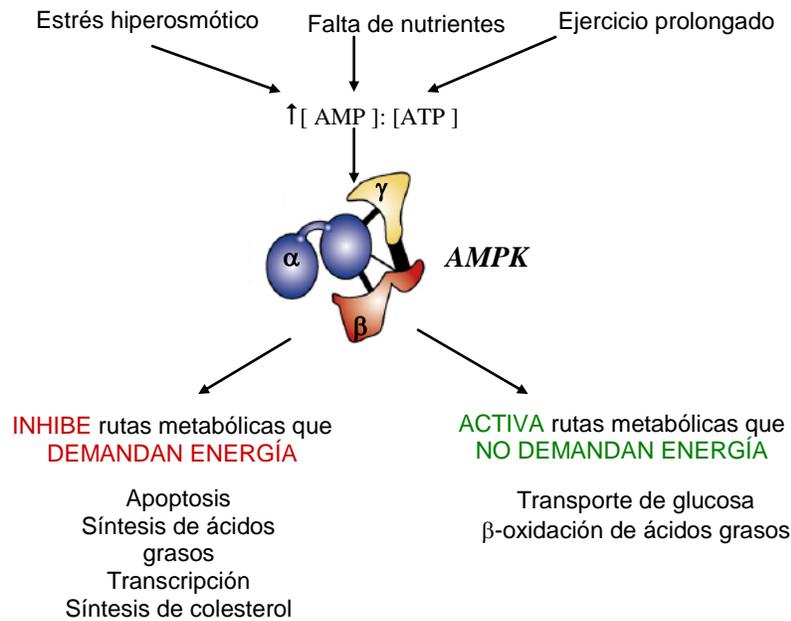


Figura 6. Activación y modulación de AMPK

AMPK interviene en la homeostasis de glucosa y en la homeostasis energética en el metabolismo de lípidos. En el primer caso, cuando el nivel de glucosa es bajo, AMPK inhibe a la producción de insulina.

En el segundo caso la homeostasis energética se logra cuando la leptina aumenta la oxidación de los ácidos grasos en músculos o bien cuando la adiponectina activa al metabolismo de la glucosa, a la oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado además de inhibir a la producción de glucosa en el hígado activando de esta manera a AMPK (Minokoshi *et al.*, 2002).

Respecto a su estructura, AMPK es un complejo heterotrimérico formado por una subunidad catalítica denominada α y dos subunidades regulatorias llamadas β y γ . La subunidad catalítica tiene un dominio cinasa de serina-treonina y una región regulatoria carboxi-terminal, la primera subunidad regulatoria (β) permite el ensamble del complejo, mientras la segunda subunidad regulatoria (γ) ayuda a la modulación de la actividad del complejo mediante efectos alostéricos provocados por AMP y ATP (Hardie *et al.*, 2006).

Se ha reportado que la masa molecular de la subunidad α es de 63 kDa, de la subunidad β es de 38 kDa mientras que la subunidad γ tiene una masa de 36 kDa (Hardie, 2007).

2.5.2 *SNF1 (Sucrose non fermenting-1 protein kinase)*

En el caso de las levaduras, la cinasa *SNF1* (**Figura 7**) es importante debido a que interviene en el cambio diaúxico, es decir, en la transición del metabolismo fermentativo al oxidativo (respiración), usando en el proceso al etanol formado durante la fermentación para producir ATP (Hardie *et al.*, 1998). Además, regula la actividad de enzimas que intervienen en el metabolismo de ácidos grasos, juega diferentes papeles en la esporulación, almacenamiento de glucógeno, termotolerancia y biogénesis del peroxisoma (Celenza y Carlson, 1986).

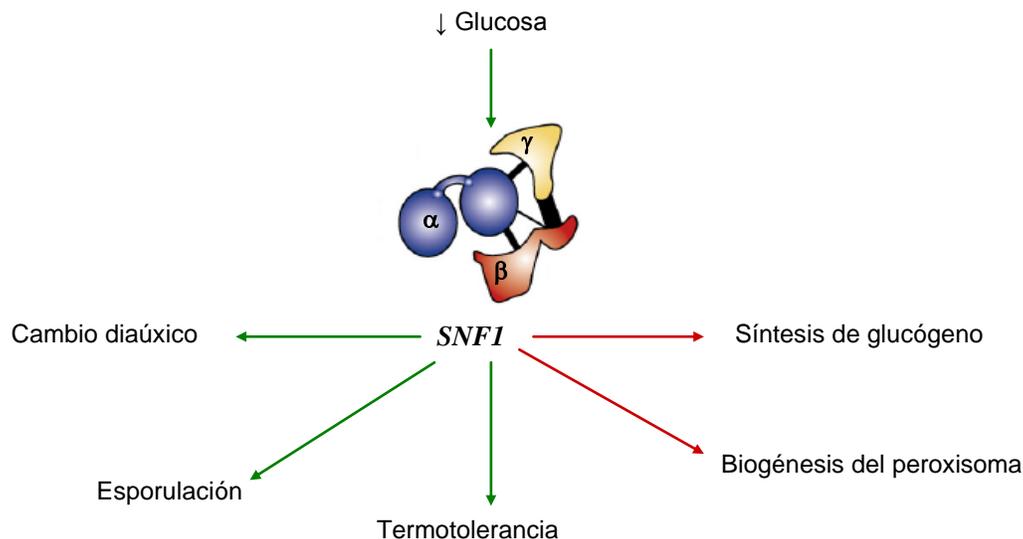


Figura 7. Activación y modulación de *SNF1*.

Estructuralmente *SNF1* es un complejo formado por una subunidad catalítica α y dos reguladoras β y γ . La subunidad α tiene un dominio de serina/treonina. La subunidad β es muy importante en la formación del heterotrímero porque contiene dos secuencias conservadas que ayudan a la interacción específica entre las subunidades α y γ . Además regula la localización subcelular de la cinasa y favorece la unión con los diferentes blancos. La subunidad γ se encarga de la modulación de la actividad del complejo (Jiang y Carlson, 1997). Actualmente no existe suficiente información que avale que enzimas o moléculas activan al

complejo *SNF1*, lo que se reporta es que por deficiencia energética éste complejo modula al metabolismo de la levadura para que se adapte a las condiciones de estrés.

2.5.3. *SnRK-1* (*SNF-1 related protein kinase*)

En el caso de las plantas el complejo *SnRK-1* ha sido considerado como un elemento crucial de la regulación transcripcional, metabólica y del desarrollo en respuesta al estrés, ya que interviene en la regulación global del metabolismo (Halford *et al.*, 2003).

En estudios realizados *in vitro*, se observó que *SnRK-1* (**Figura 8**) fosforila e inactiva cuatro enzimas de procesos metabólicos: la *β*-hidroxi-*β*-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) que interviene en la biosíntesis de colesterol (Dale *et al.*, 1995), la *sacarosa fosfato sintasa* (SPS) que interviene en la biosíntesis de sacarosa, *nitrato reductasa* (NR) que interviene en el primer paso de la asimilación del nitrógeno en la síntesis de aminoácidos (Sugden *et al.*, 1999) y a la *trehalosa fosfato sintasa 5* (TPS5) que es una enzima clave en la síntesis de la trehalosa 6 fosfato, la cual a su vez participa en la señalización de azúcares, regulación del metabolismo y desarrollo (Harthill *et al.*, 2006).

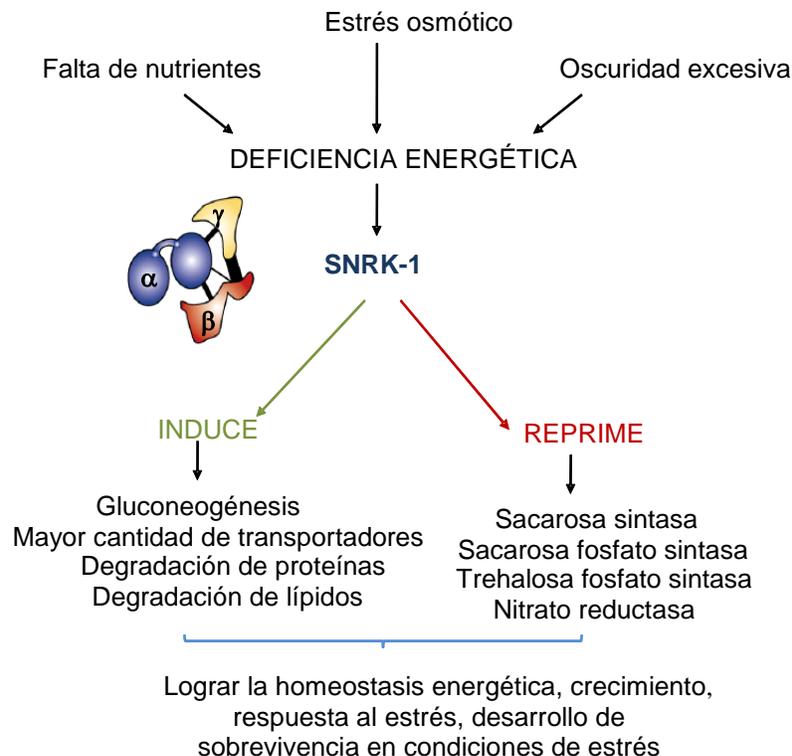


Figura 8. Activación y modulación de *SnRK-1*.

De manera indirecta *SnRK-1* controla la transcripción de varios genes como el de la sacarosa sintasa, que interviene en la síntesis de la sacarosa, el de la β -Amilasa que participa en la degradación de almidón (Laurie *et al.*, 2003) y en la activación de la ADP-glucosa fosforilasa (AGPasa) que participa en la síntesis de (Geigenberger, 2003).

Existen otras dos subfamilias relacionadas (SnRK-2 y SnRK-3) que son exclusivas de plantas. Tienen menos características en común con *SNF1*, *AMPK* y *SnRK-1*; la secuencia de aminoácidos que reconocen en sus proteínas blanco es distinta a la secuencia de aminoácidos de los sitios que son fosforilados por *SnRK-1* (Halford *et al.*, 2004) y probablemente participan en funciones distintas (Halford *et al.*, 2003).

2.5.4 Subunidades que forman parte de los complejos cinasas AMPK, SNF1 y SnRK-1

Las cinasas *AMPK*, *SNF1* y *SnRK-1* son heterotrímeros conformados por una subunidad catalítica (α) y dos subunidades regulatorias (β y γ), (Hardie, 2007). Cada una de ellas tiene una función específica dentro del complejo.

Se ha reportado que el complejo se forma por tres subunidades, pero de cada una se han encontrado isoformas en los diferentes organismos en donde se expresan, tal como se muestra en la **Figura 9**.



Figura 9. Diferentes tipos de las subunidades presentes en los diferentes complejos *AMPK*, *SNF1*, *SnRK-1*.

2.5.4.1 Subunidad catalítica α

Esta subunidad fosforila a los diferentes blancos; contiene un dominio típico cinasa de serina-treonina en su extremo amino terminal y un dominio regulatorio en su extremo carboxi-terminal, con el cual interactúa con las subunidades regulatorias β y γ .

En mamíferos existen dos isoformas de esta subunidad; se ha reportado que la primera isoforma denominada α_1 , se expresa en el citosol mientras que la segunda, llamada α_2 , se restringe al núcleo y citosol de tejidos como el corazón, el músculo y el hígado (Fragoso *et al.*, 2008). En *AMPK* esta subunidad tiene una masa de 63 kDa, mientras que en *SNF1* su masa es de 72 kDa y finalmente en *SnRK-1* se reportado que tiene una masa de 58 kDa (Hardie *et al.*, 1998).

Las subunidades catalíticas descritas en mamíferos, levaduras y plantas tienen un 48% de similitud en sus secuencias completas, pero si la comparación se llega a restringir al dominio cinasa la similitud llega a aumentar hasta un 60-65% (Polge y Thomas, 2006).

2.5.4.2 Subunidad regulatoria β

Las subunidades regulatorias β en las levaduras, los mamíferos y en las plantas muestran una estructura en común compuesta por un dominio variable amino terminal, asociado con dos dominios conservados. Uno de los dominios conservados, denominado KIS (*Kinase Interacting Sequence*) (Jiang y Carlson, 1997), permite la unión de la subunidad α ; el otro dominio, es llamado ASC (*Association with SNF1 Complex*) (Yang *et al.*, 1994; Jiang y Carlson, 1997) que permite la unión con la subunidad γ (Yang *et al.*, 1992). De este modo la subunidad β constituye la base del complejo porque permite la interacción de las tres subunidades. Recientemente se ha caracterizado un nuevo dominio implicado en la unión al glucógeno y con el dominio KIS (Hudson *et al.*, 2003). Fue llamado GBD (*Glycogen Binding Domain*) y presenta las características de un dominio N-isoamilasa.

En mamíferos la subunidad β se ha caracterizado con una masa molecular que oscila entre los 38 kDa y 40 kDa además de que es necesario que se expresen los tres dominios

(ASC, KIS y GBD). En cambio, en levaduras el dominio KIS parece que no participa en la formación del complejo $\alpha\beta\gamma$, debido a que el dominio ASC por si sólo es suficiente para efectuar este proceso.

Finalmente, en las plantas las subunidades β pueden ser agrupadas en dos clases, una en la que tiene características semejantes a levaduras y mamíferos, que en Arabidopsis son denominadas como AKIN β 1 y AKIN β 2 (Bouly *et al.*, 1999) en las que el dominio ASC interactúa fuertemente con la subunidad γ (Bouly *et al.*, 1999; Gissot *et. al.*, 2004) y la otra clase que tiene una composición estructural atípica llamada β 3 en la que el dominio ASC interactúa con las subunidades de tipo α .

2.5.4.3 Subunidad regulatoria γ

La subunidad regulatoria γ se encuentra implicada en el mantenimiento de la conformación activa de la subunidad catalítica, debido a que se une al dominio autoinhibitorio de la subunidad α . Los niveles de conservación entre las subunidades presentes en los tres reinos varía del 20 al 35% y corresponden a los motivos de cistatión β -sintasa, los cuales sirven para fijar las moléculas de AMP o ATP en mamíferos (Scott *et al.*, 2004).

En mamíferos se ha observado que esta subunidad tiene una masa molecular que oscila de los 36 kDa a los 38 kDa. En maíz se observó que esta subunidad contiene en su extremo amino terminal una secuencia relacionada con el dominio KIS que se presenta en la subunidad β (Lumbreras *et al.*, 2001). En algunos experimentos se ha reportado que la subunidad γ se acumula durante el llenado de la semilla, pero después en la maduración la subunidad tiende a degradarse.

2.5.4.4 Isoformas de las subunidades

Aparte de las subunidades clásicas que se describieron con anterioridad, se han encontrado subunidades que participan en la formación de complejos cinasa que poseen características de las subunidades β y γ ; una de ellas se denomina subunidad $\beta\gamma$.

La subunidad $\beta\gamma$ tiene en su región amino terminal secuencias relacionadas con el dominio KIS, que es característico de las subunidades β , mientras que en la región carboxilo terminal se encuentran los motivos cistatión β -sintasa, que son característicos de las subunidades γ . Se ha demostrado que esta subunidad puede participar en la formación del complejo de manera alternativa (Lumbreras *et al.*, 2001) y a nivel celular se ha demostrado que se encuentra en citosol y núcleo.

Gissot y sus colaboradores (2004), demostraron que existe una interacción entre el dominio ASC de la subunidad α y las subunidades γ y $\beta\gamma$ en plantas.

En la **Figura 10** resume las principales características de las subunidades clásicas que pueden formar parte de los complejos heterotriméricos con actividad cinasa.

Figura 10. Subunidades clásicas que conforman a los complejos con actividad cinasa *AMPK*, *SNF1*, *SnRK-1*.

Subunidad	Función	Complejo	Masa Molecular (kDa)
α (clásica) 	Catalítica	<i>AMPK</i>	63 kDa
		<i>SNF1</i>	72 kDa
		<i>SnRK-1</i>	58 kDa
β (clásica) 	Ensamble del complejo	<i>AMPK</i>	38 - 40 kDa
		<i>SNF1</i>	No reportado
		<i>SnRK-1</i>	No reportado
γ (clásica) 	Regulatoria	<i>AMPK</i>	36 -38 kDa
		<i>SNF1</i>	36 kDa
		<i>SnRK-1</i>	No reportado

2.5.5 Actividad cinasa del complejo heterotrimérico

El alto grado de conservación entre *SNF1*, *AMPK* y *SnRK-1* se hace particularmente evidente en el dominio catalítico de la subunidad α donde el 62% de los aminoácidos son idénticos. La especificidad de su sustrato también es similar, ya que las tres pueden fosforilar al residuo de serina de la secuencia que se muestra en la **Figura 11** (Halford y Hardie, 1998). Es por ello que los péptidos basados en esta secuencia, como el SAMS y AMARA, son buenos sustratos para medir en forma relativamente fácil la actividad (Davies *et al.*, 1989).

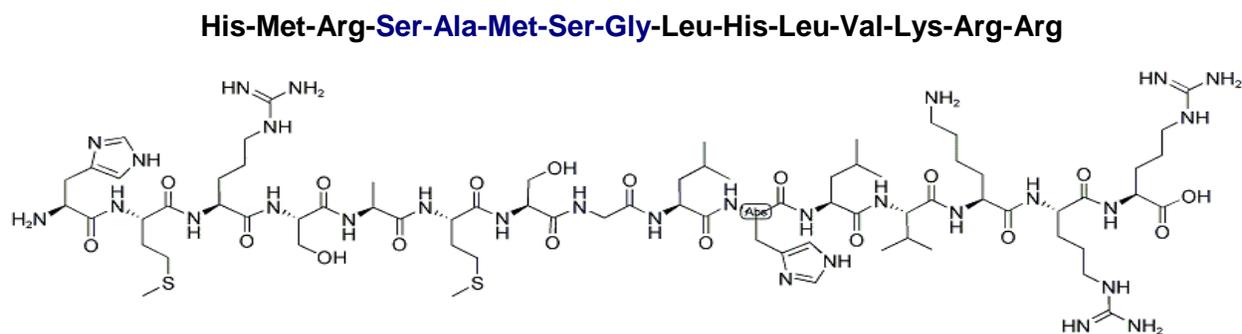


Figura 11. Secuencia de aminoácidos reconocida por los complejos *AMPK*, *SNF1*, *SnRK-1*

Capítulo 3. Objetivos e Hipótesis

a) **Objetivo general**

Caracterizar el efecto de la deficiencia de fósforo sobre la expresión de las subunidades del complejo ***SnRK-1*** durante el desarrollo de vainas y semillas de frijol.

b) **Objetivos específicos**

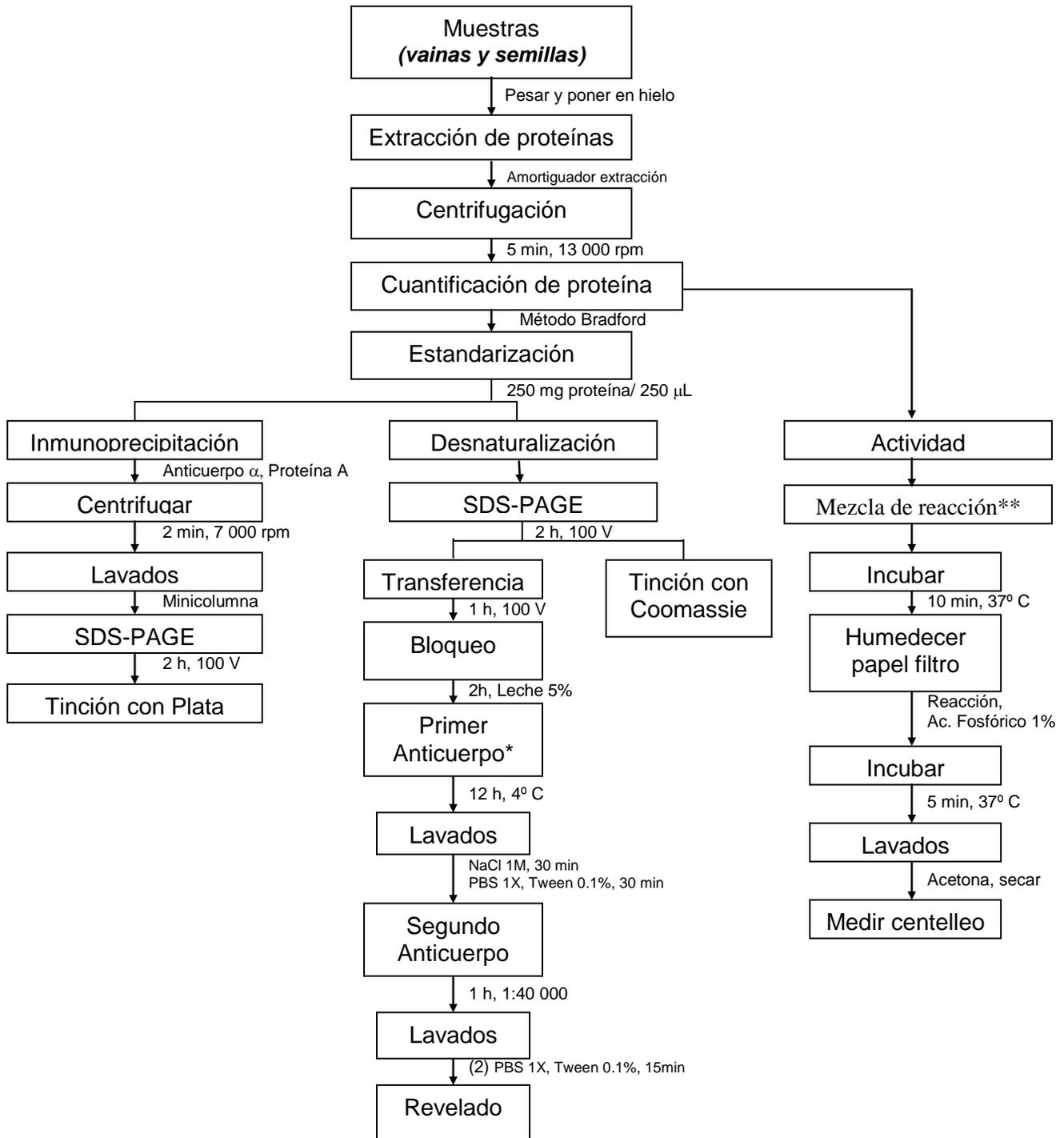
Establecer el efecto de la deficiencia de fosfato sobre:

- ∞ La actividad cinasa del complejo *SnRK-1* en vainas y semillas de frijol en diferentes etapas de desarrollo.
- ∞ La expresión de subunidades que forman el complejo *SnRK-1* en semillas de frijol.
- ∞ La composición probable del complejo *SnRK-1* en ejes embrionarios de semillas de frijol.

Hipótesis

La actividad del complejo *SnRK-1* es importante para implementar estrategias bioquímicas que permiten a las plantas de frijol enfrentar con éxito la deficiencia de fosfato.

Capítulo 4. Diseño Experimental



***Primer Anticuerpo.** Específico para cada subunidad con la dilución indicada en la figura 15.

****Mezcla de reacción:** 1.5 µg de proteína, 5 µL del péptido SAMS 100 µM, 5 µg de la disolución de ATP, 5 µL de amortiguador de reacción agua hasta aforar a 25 µL.

Figura 12. Diagrama de Trabajo (Primera parte)

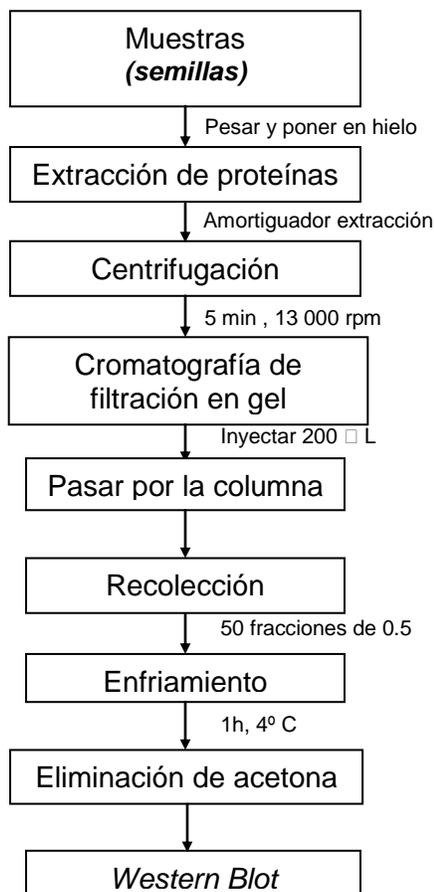


Figura 13. Diagrama de trabajo (Segunda Parte)

4.1 Cultivo de plantas de frijol

Se germinaron frijoles de la variedad canario que provenían de líneas conservadas en el Laboratorio 102 del conjunto E de la Facultad de Química, los cuales fueron regados con disolución Hoagland con diferente concentración de fósforo para obtener semillas con deficiencia de fósforo. El tratamiento previo consistió en un lavado con etanol durante 1 minuto, con desinfección posterior con hipoclorito de sodio durante 30 segundos y finalmente un lavado con agua desionizada hasta eliminar el olor a hipoclorito.

Una vez que las semillas se desinfectaron y lavaron se colocaron en agrolita; se cubrieron con una bolsa negra y se incubaron a 25° C por aproximadamente cinco días para iniciar la germinación. Después del periodo de incubación, se transplantó el germinado a

macetas con agrolita y se separaron en dos grupos, el primero que fue regado con disolución Hoagland 200 μM (grupo con deficiencia de fósforo) y el segundo que fue regado con disolución Hoagland 500 μM (grupo control, condiciones óptimas de fósforo requerido).

Se mantenían a las plantas hasta obtener semillas y vainas de diferentes etapas de desarrollo para caracterizar el complejo proteínico *SnRK-1*.

Disolución Hoagland

Es una disolución nutritiva cuya composición química (**Figura 14**) provee las cantidades requeridas de sales minerales para el desarrollo óptimo de las plantas sin provocar toxicidad o estrés salino.

Figura 14. Composición de la disolución nutritiva Hoagland modificada.

Macronutrientes

Componente	Elemento	Concentración final	
		μM	ppm
KNO ₃	Nitrógeno	16	224
	Potasio	6	235
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	Calcio	4	160
NH ₄ H ₂ PO ₄	Fósforo	2	62
MgSO ₄ 7H ₂ O	Azufre	1	32
	Magnesio	1	24
EDTAFE	Hierro	1	32

Micronutrientes

Componente	Elemento	Concentración final	
		μM	ppm
KCl	Cloro	50	1.77
H ₃ BO ₄	Boro	25	0.27
MnSO ₄ H ₂ O	Manganeso	2	0.11
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Zinc	2	0.13
CuSO ₄ 5H ₂ O	Cobre	0.5	0.03
H ₂ MoO ₄	Molibdeno	0.5	0.05
FeSO ₄	Hierro	16.1	1

Los Macronutrientes se añadieron por separado, a partir de disoluciones estándares. Para evitar la precipitación de nutrientes durante la preparación de la disolución nutritiva, se preparó una disolución stock combinada con todos los micronutrientes excepto el hierro.

4.2 Extracción de proteínas de semillas y vainas de frijol

Se preparó el amortiguador de extracción que contiene: HEPES- NaOH 100 mM (pH= 8), EDTA 1 mM, MgCl₂ 5mM, KCl 10 mM, PVPP 1%, glicerol 10%, 85 mg de coctel de inhibidores de proteasas **Roche**[®] por cada 25 mL de amortiguador preparado, DTT 5 mM y agua.

Posteriormente se colectaron y depositaron en hielo las muestras de vainas y semillas de diferentes etapas de desarrollo de las plantas deficientes de fósforo y de las plantas control. Las muestras se pesaron y se molieron con 250 µL de amortiguador de extracción. Una vez que se obtuvieron mezclas homogéneas se transfirieron a tubos microfuga y se mantuvieron en hielo mientras se molieron las muestras restantes. Cuando todas las mezclas se colectaron en los tubos, se centrifugaron durante 5 minutos con una velocidad de 9000g, el sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se utilizó en los procedimientos posteriores.

4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para cuantificar la proteína presente en el extracto obtenido en el paso anterior, se empleó el método Bradford (Bradford, 1976). Inicialmente se preparó *la curva patrón*, empleando albúmina bovina con una concentración de 0.5 mg /mL; se tomaron alícuotas de acuerdo con el siguiente cuadro:

Volumen de muestra (µL)	0	10	20	30	40	50
Volumen de agua (µL)	100	90	80	70	60	50

A cada uno de los tubos se les añadió 1.5 mL de reactivo de Bradford y se dejaron cinco minutos a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se cuantificó la proteína presente en cada una de las muestras. Para ello se tomaron 5 µL del sobrenadante del extracto proteínico y se llevó a un volumen de 100 µL con agua; se añadió 1.5 mL de reactivo de Bradford, se dejó la reacción a temperatura ambiente durante cinco minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Con los datos obtenidos de la curva patrón se realizó un análisis de regresión lineal; con la ecuación de la recta que describe la relación entre la absorción y la concentración, se interpolaron los valores de absorbancia de cada muestra y se determinó la concentración de proteínas presentes en las mismas.

Finalmente se estandarizaron las muestras para que todas tuvieran 1 mg de proteína por μL de extracto. Se añadió el mismo volumen de amortiguador de muestra 2X, el cual contiene 0.12 M de Tris, 4% de SDS, 10% de 2-mercaptoetanol, 20% de glicerol y 2 mg/mL de azul de bromofenol. Se hirvieron los tubos microfuga con las muestras ya estandarizadas durante 15 minutos; después se enfriaron y se guardaron en refrigeración, para posteriores análisis.

4.4 *Ensayo para determinar la actividad cinasa del complejo SnRK-1*

Para determinar la actividad cinasa del complejo, se cuantificó el P^{32} que se incorporó al péptido sintético SAMS. Primero se molieron muestras de semillas y vainas de diferentes etapas de desarrollo con amortiguador de extracción (50mM HEPES, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y se ajustó $\text{pH}=8.2$), la mezcla obtenida se transfirió a tubos microfuga los cuales se centrifugaron a $25000g$ y 4°C durante 10 minutos. Al terminar este tiempo se sacaron los tubos de la centrífuga, se descartó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en $30\ \mu\text{L}$ de amortiguador de extracción.

De esta última suspensión se tomó una muestra para cuantificar proteína con el método Bradford (ver apartado 4.3). Se cuantificó la concentración de proteína presente en cada muestra y se colocaron $1.5\ \mu\text{g}$ de proteína con $5\ \mu\text{L}$ del péptido SAMS $100\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{g}$ de la disolución de ATP ($5\ \mu\text{L}$ de $\text{ATP}_{\gamma}^{32\text{P}}$ ATP ($5\ \mu\text{Ci}/\ \mu\text{L}$) se disolvieron en $95\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 75mM , 20mM MOPS, $500\ \mu\text{M}$ ATP, $25\ \text{mM}$ β -glicerol fosfato, $1\ \text{mM}$ EGTA, $1\ \text{mM}$ DTT), $5\ \mu\text{L}$ de amortiguador de reacción (50mm HEPES, 50 mm NaF, 0.8 mm EDTA, 50 MM NaCl, 8% glicerol, 5 mm MgCl_2 y 1mm DTT) y agua hasta llevar a un aforo de $25\ \mu\text{L}$, toda esta mezcla se incubó 10 minutos a 37°C .

El siguiente paso consistió en determinar la incorporación de la marca al péptido sintético, para ello se humedeció un círculo de papel filtro *Whatman* con $15\ \mu\text{L}$ de la reacción y se colocó en ácido fosfórico al 1%, se incubó durante 5 minutos, posteriormente se lavó dos veces con ácido fosfórico al 1%, cada lavado tuvo una duración de 15 minutos.

Finalmente se lavó con acetona y se dejó secar durante la noche. Los papeles filtros secos se colocaron en viales con 5 mL de líquido de centelleo y se realizaron las lecturas cada dos minutos, reportándose la actividad cinasa como cuentas por minuto por miligramo de proteína.

4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para separar las proteínas de acuerdo a su masa molecular se empleó la técnica de electroforesis, para lo cual se preparó un gel de acrilamida al 11%, con diez carriles. En cada carril se cargaron 20 µg de proteína, los geles se colocaron en la cubeta con amortiguador de TRIS/Glicina (25 mM de Tris, 0.19 M de glicina, 0.1% (p/p) SDS ajustando a un volumen de 4 litros). La cubeta se conectó a 100 volts durante dos horas. Una vez terminada la electroforesis, el gel se transfirió a un recipiente y se realizó la tinción con azul de Coomassie o la transferencia en membranas de Immobilon-P (Millipore) para hacer la técnica de *Western Blot*.

4.6 Determinación de subunidades usando la técnica de Western Blot

Las proteínas que se encontraban separadas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de Immobilon-P (Millipore), para ello se colocaron en un contenedor dos papeles filtro humedecidos con amortiguador de transferencia (12.4 mM de Tris, 96 mM de Glicina, 20% de metanol y 125 µL de SDS aforando a 1000mL de agua desionizada); seguidos por el gel, después se colocó la membrana, previamente hidratada con metanol y amortiguador de transferencia; al final se colocaron dos papeles filtro humedecidos con amortiguador de transferencia y se cerró el contenedor.

El contenedor se colocó en la cubeta que contiene amortiguador de transferencia, se insertó el contenedor de hielo y el agitador, se cerró la cubeta y se conectó a 100 volts durante 1 hora con agitación continua. Transcurrido el tiempo de agitación, se sacó la membrana del contenedor usando pinzas y se bloqueó durante dos horas con una disolución de leche al 5%. Posteriormente se colocó el anticuerpo específico de cada subunidad de acuerdo a las diluciones de la **Figura 15**, transcurrido ese tiempo las membranas se llevaron al cuarto frío durante toda la noche a 4° C con agitación continua. Después de la agitación, se

realizó un lavado con NaCl 1M durante 30 minutos, seguido por un segundo lavado con PBS-Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos (1.36 M NaCl, 6.7 mM KCl, 14.7 mM K₂HPO₄·7H₂O, 79.9 mM Na₂HPO₄·H₂O, 7.69 mM NaN₃ y se completó a un volumen final de un litro con agua).

Figura 15. Diluciones recomendadas para los anticuerpos de cada subunidad

<i>Anticuerpo para la subunidad</i>	<i>Semilla seca</i>	<i>Vaina y semilla fresca</i>
α	1:5000	1:5000
β_2	1: 2000	1:1000
$\beta\gamma$	1: 10 000	1: 10 000
γ	1:5000	1:20 000

Después se colocó el segundo anticuerpo anti IgG de conejo durante 1 hora en una disolución de leche al 5% con la dilución 1:20 000, pasado el tiempo de incubación con el segundo anticuerpo se realizaron dos lavados más con PBS 0.1% cada uno de 15 minutos. Finalmente se reveló la membrana en el cuarto oscuro, para lo cual se expuso con los reactivos quimioluminiscentes durante un minuto. La membrana se colocó en un papel filtro dentro del contenedor, seguida por una película de plástico antiadherente y sobre de ella la película fotosensible. El tiempo de exposición varió de 1 a 5 min de acuerdo a cada subunidad. Al término, se pasó la película por el revelador, agua y finalmente fijador.

Figura 16. Tiempos de exposición para cada subunidad

<i>Subunidad</i>	<i>Tiempo de exposición</i>
α	5 minutos
β_2	10 minutos
$\beta\gamma$	10 minutos
γ	3 minutos

4.7 Inmunoprecipitaciones

Al extracto de proteínas se le añadió el anticuerpo específico para la subunidad de interés y se puso en agitación constante durante 4 horas a temperatura ambiente, terminado este tiempo se añadió la proteína A para hacer insoluble el complejo anticuerpo–proteína. Por medio de una centrifugación de 9000g y 10 minutos se eliminó el sobrenadante. Las pastillas se colocaron en una minicolumna y se lavaron dos veces con amortiguador de muestra. Con las proteínas ya suspendidas se corrió un gel de acrilamida al 11%. Al término de la electroforesis realizó la tinción con plata y se observaron las bandas obtenidas.

4.8 Tinción con plata de los geles obtenidos de SDS-PAGE

El gel obtenido de la inmunoprecipitación se trasladó a un recipiente; se realizaron tres lavados con disolución de etanol al 30% v/v y ácido acético al 10% v/v cuya duración fue de 30 minutos cada uno; posteriormente se enjuagó con etanol al 20% v/v durante 10 minutos, agua durante 10 minutos. Una vez enjuagado el gel, se hizo la sensibilización con la disolución de tiosulfato de sodio 2g/L durante un minuto, después se lavó con agua cada uno de 20 segundos.

Transcurridos los lavados se expuso al gel a una disolución de plata con una concentración de 2g/L durante 30 minutos, se lavó con agua durante 10 segundos. Para desarrollar el color, el gel se colocó en una disolución de formaldehído al 37%, carbonato de potasio anhidro con una concentración de 30 g/L y tiosulfato de sodio con una concentración de 10 mg/L; el gel comenzó a tornarse oscuro y para detener la formación del color se empleó una disolución de Trizma Base 10% p/v y Ácido Acético 25% v/v.

4.9 Determinación de la conformación del complejo SnRK-1

Para conocer la composición probable del complejo se empleó una columna de extrusión molecular Superdex 200 en donde se separaron en fracciones de acuerdo a la masa molecular las diferentes proteínas contenidas en el extracto.

Primero se extrajeron las proteínas de la muestra empleando el amortiguador de extracción II que contenía 50 mM de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS- HCl) pH

7.8, 1mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1mM de DTT, 1% v/v de glicerol, 150 mM de NaCl y coctel de inhibidores de proteasas **Roche**[®] guardando la relación de 85 mg de inhibidor por 25 mL de amortiguador preparado. Después el extracto se centrifugó a 9000g durante 10 minutos con una temperatura de 4° C, el sobrenadante se pasó por un filtro para microcentrifuga *MILLIPORE* y se centrifugó a 3000g durante 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se inyectaron 200 µL del filtrado en la columna Superdex 200.

Se recolectaron 50 muestras de 0.5 mL en tubos microfuga que contenían 1 mL de acetona, después se dejaron las muestras en hielo y se metieron a -20° C durante una hora. Después de éste tiempo se centrifugaron a 9000g durante 15 minutos con una temperatura de 4° C, se eliminó el sobrenadante de cada uno de los tubos y se evaporó el disolvente remanente.

A la pastilla que quedó se le añadió 50 µL de amortiguador de muestra 1X; la mezcla se hirvió durante 15 minutos, se enfrió y se almacenó para su posterior análisis. Las fracciones que se analizaron fueron 17, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 33, 35 y 37.

4.10 Determinación de la conformación del complejo empleando el entrecruzador Ditiobis Succinimidil Propionato (DSP)

Para elucidar la probable composición del complejo con mayor precisión se empleó el entrecruzador Ditiobis Succinimidil Propionato (DSP), el cual une a las proteínas que se encuentran cercanas, ya que reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina para unir a los péptidos que se encuentran a una distancia de 1.2 nm. La metodología empleada es similar a la descrita en la sección 4.9., pero antes de centrifugar, se añadió la cantidad indicada por el proveedor *Thermo Scientific* durante 20 minutos, seguido por el fraccionamiento de la muestra y el análisis con la técnica de *Western Blot* en las mismas fracciones.

5.1 Actividad cinasa del complejo *SnRK-1*

La primera parte de la experimentación consistió en evaluar el efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad cinasa del complejo *SnRK-1* medida como la incorporación de ^{32}P sobre el péptido sintético SAMS, en extractos de vainas y semillas, tomadas en fases representativas del desarrollo de ambos tejidos.

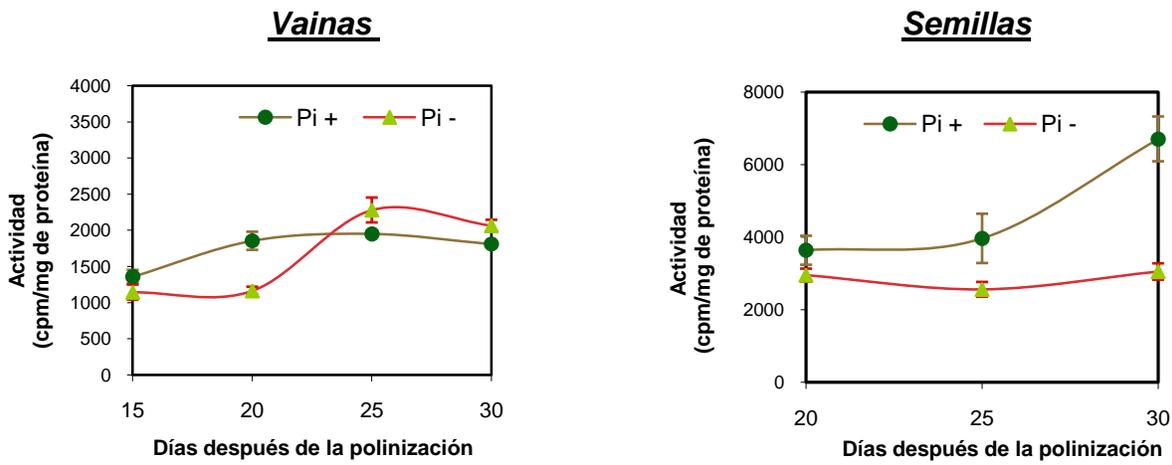


Figura 17. Actividad cinasa del complejo *SnRK-1* sobre el péptido SAMS.

En la **Figura 17** se observa que durante el desarrollo de las vainas la falta de fósforo retarda el incremento de la actividad cinasa del complejo *SnRK-1*, mientras que en semillas el efecto más evidente es una disminución importante en la etapa final del desarrollo de las mismas. De acuerdo a lo anterior, se sugiere que la actividad del complejo *SnRK-1* es afectada por el tejido, el desarrollo y las condiciones ambientales (en este caso la disponibilidad de fósforo) en que está creciendo la planta.

5.2 Expresión de las subunidades del complejo *SnRK-1* en diferentes etapas de desarrollo de vaina y semilla

En la segunda etapa, se analizó el efecto del tipo de tejido, el desarrollo y la deficiencia de fósforo sobre la concentración relativa de las subunidades que forman parte del complejo

SnRK-1. Con ese propósito se tomaron muestras de vainas y semillas producidas por plantas control y con deficiencia de fósforo en diferentes etapas de desarrollo.

Figura 18. Características de las muestras en las diferentes etapas de desarrollo

Etapa	Longitud de la vaina (cm)	Días de desarrollo de la vaina	Días de desarrollo de la semilla
1	2.5	15	15
2	4.0	20	20
3	5.5	25	25
4	6.5	30	30

Las proteínas presentes en los extractos se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes, se transfirieron a una membrana de *Immobilion P*, se inocularon con los anticuerpos específicos para cada subunidad y se revelaron por quimioluminiscencia, obteniéndose las siguientes imágenes:

Figura 19. *Western Blot* de vainas y semillas en diferentes etapas de desarrollo

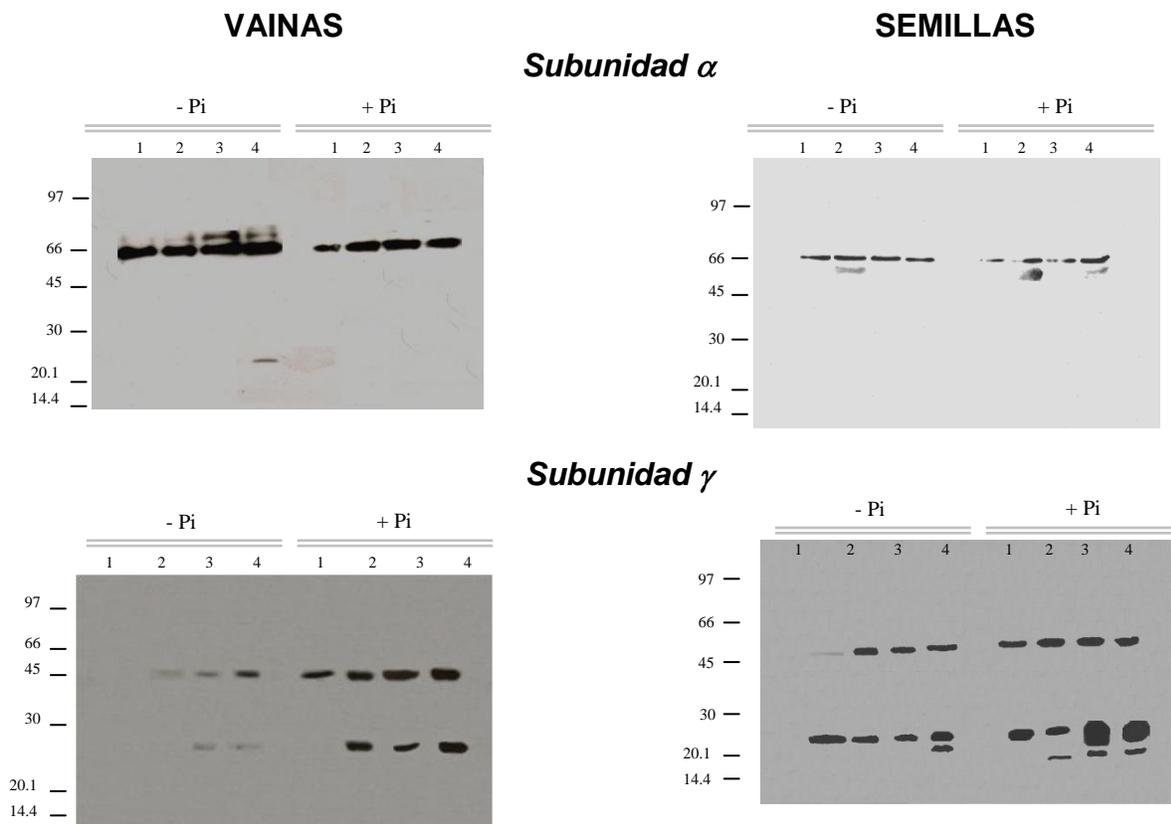
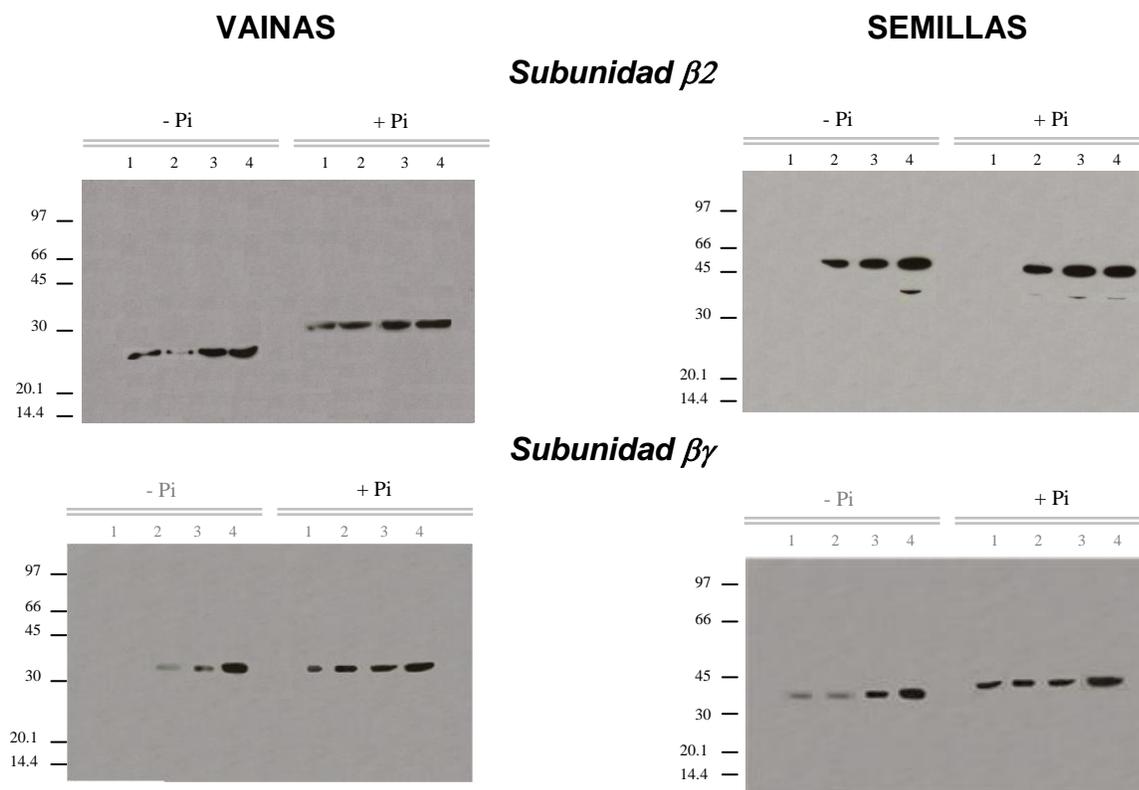


Figura 19. Western Blot de vainas y semillas en diferentes etapas de desarrollo (*continuación*)



5.2.1. Vainas en diferentes etapas de desarrollo.

En la **Figura 19**, se observa que el anticuerpo contra la subunidad catalítica (subunidad α) reconoció una proteína de 67 kDa, a una concentración que independientemente de la condición nutricional de las plantas analizadas, se incrementó gradualmente durante el desarrollo. Si bien las diferencias no son grandes, parece que la cantidad de subunidad catalítica es mayor en las vainas producidas por plantas con deficiencia de fósforo.

El anticuerpo contra la subunidad γ detectó una proteína de 43.9 kDa, cuya concentración se incrementó en las últimas etapas de desarrollo de la vaina. En este caso es evidente que la cantidad de proteína reconocida por el anticuerpo aumentó en las vainas de plantas cultivadas con deficiencia de fósforo.

El anticuerpo contra la subunidad β_2 detectó una proteína de 25.5 kDa en vainas provenientes de plantas con deficiencia de fósforo, su concentración se incrementó gradualmente conforme la vaina se desarrolló. Mientras que en vainas provenientes de

plantas control se detectó una subunidad con una masa de 31 kDa, donde la concentración se ve modificada por la etapa de desarrollo, dado que la mayor expresión se observa en la etapa 4 (30 días).

Finalmente el anticuerpo contra la subunidad $\beta\gamma$ detectó una banda de 33 kDa. En las plantas que presentaron deficiencia de fósforo, no hay expresión de esta subunidad en la etapa 1 (15 días) mientras que en las etapas restantes la expresión fue gradual; en cambio en la vaina proveniente de la planta control, la expresión de dicha subunidad es de manera gradual dependiendo de la etapa de desarrollo, siendo la etapa 4 (30 días) donde se observa una mayor concentración.

5.2.2. Semillas en diferentes etapas de desarrollo

En la **Figura 19** se observa que el anticuerpo contra la subunidad α detectó una proteína de 65 kDa, cuya concentración se modificó por disponibilidad de fósforo. En las semillas producidas por las plantas control el nivel más alto se observó en la etapa 4 (30 días), mientras que en las provenientes de plantas con deficiencia de fósforo la mayor concentración se encontró en la etapa 2 (20 días).

El anticuerpo contra la subunidad γ detectó una banda de 52 kDa y otras de menor tamaño que probablemente sean productos de degradación. En las plantas deficientes de fósforo la concentración de la banda más grande alcanza un máximo en la etapa 2 (20 días) pero luego disminuye. En las plantas control sucede algo similar, pero el nivel de mantiene alto hasta la etapa 4 (30 días).

El anticuerpo contra la subunidad β_2 detectó una proteína de 45 kDa, cuya concentración se incrementó tanto por la disponibilidad de fósforo como por la etapa de desarrollo de la semilla. De esta manera, la banda más intensa se encuentra en la etapa 4 (30 días) de la planta control, mientras que en la primer etapa (15 días), no existe evidencia de la presencia de esta subunidad.

El anticuerpo contra la subunidad $\beta\gamma$ detectó una banda en 45 kDa. En este caso la concentración se vio modificada por la deficiencia de fósforo, dado que en las semillas provenientes de plantas deficientes de fósforo la expresión se ve disminuida en comparación con las plantas control.

Estos resultados demuestran que la concentración relativa de las diferentes subunidades varía dependiendo de la etapa de desarrollo, de la disponibilidad de fósforo y el tipo de tejido que se estudie. De acuerdo con estos resultados se puede inferir que *la actividad cinasa puede reflejar cambios en la composición del complejo*.

5.3 Expresión de las subunidades que forman el complejo SnRK-1 en semillas

De los resultados anteriores, se puede observar que el desarrollo y la falta de fósforo modifican la actividad (**Figura 17**) y la concentración relativa de las subunidades que forman el complejo *SnRK-1* (**Figura 19**).

Sin embargo, el efecto más evidente de la deficiencia de fósforo se observa sobre la actividad cuando la semilla está prácticamente formada. Es por ello que se realizó un análisis más detallado en el que se comparó la expresión de las subunidades que forman el complejo *SnRK-1* en semillas en desarrollo (de 20 días) y en semillas secas. En este experimento la semilla se seccionó en sus diferentes partes: cubierta, embrión y cotiledón, debido a que cada una tiene funciones diferentes a lo largo del desarrollo de la semilla.

Las proteínas extraídas se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes que luego se tiñeron con azul de Coomasie (**Figura 20**).

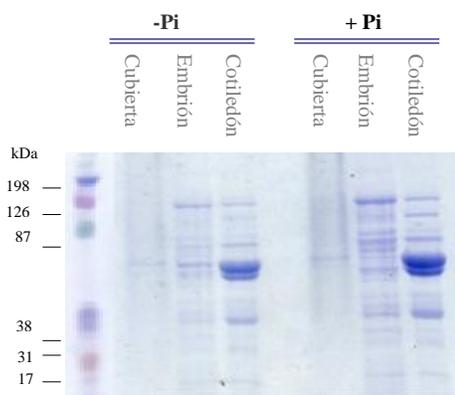


Figura 20. SDS- PAGE del extracto proteínico de cubierta, embrión y cotiledón de semillas secas.

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas *Immobilion P* y se incubaron con anticuerpos específicos para las diferentes subunidades (**Figura 21**).

Figura 21. Western Blot de semillas de 20 días de desarrollo y de semillas secas

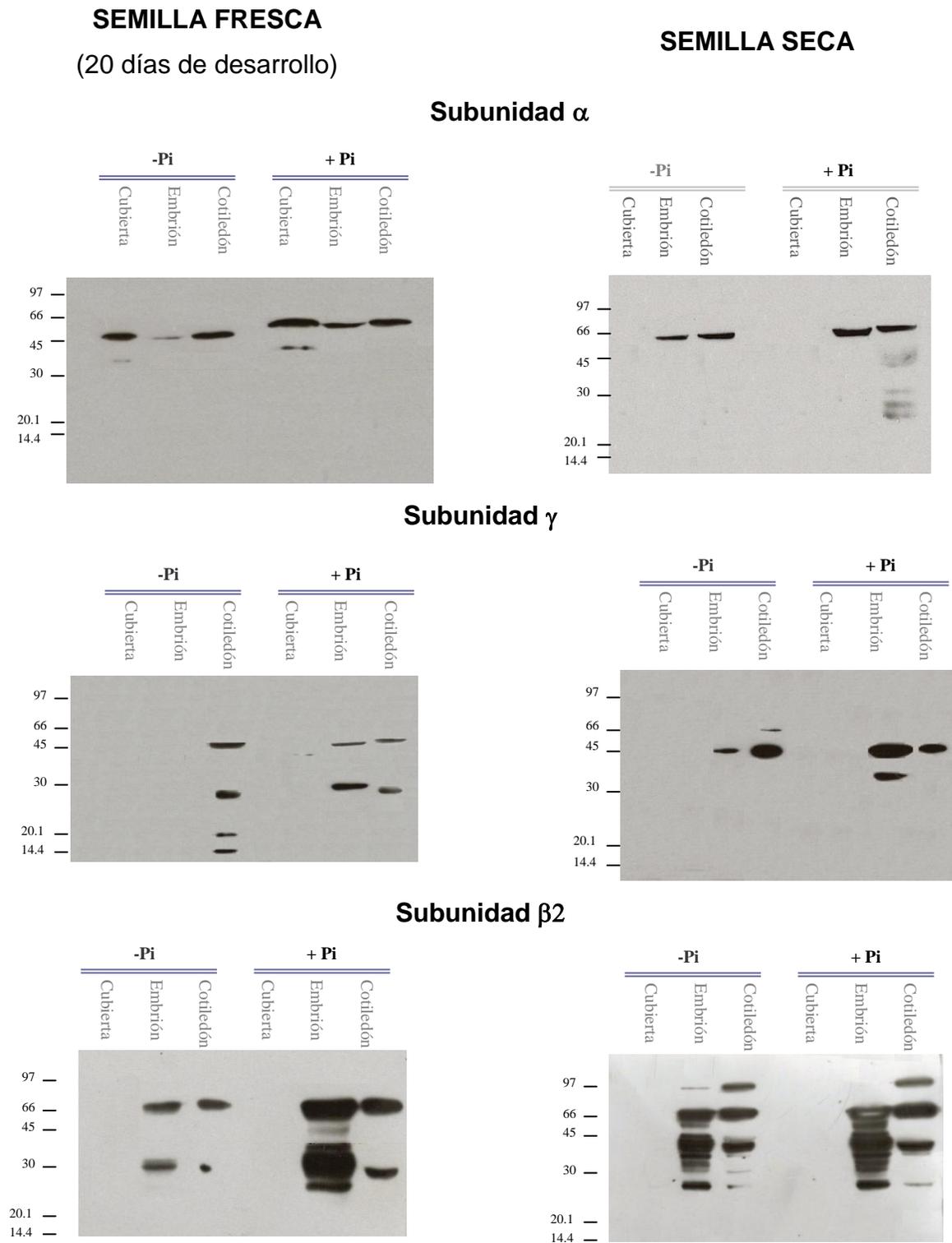
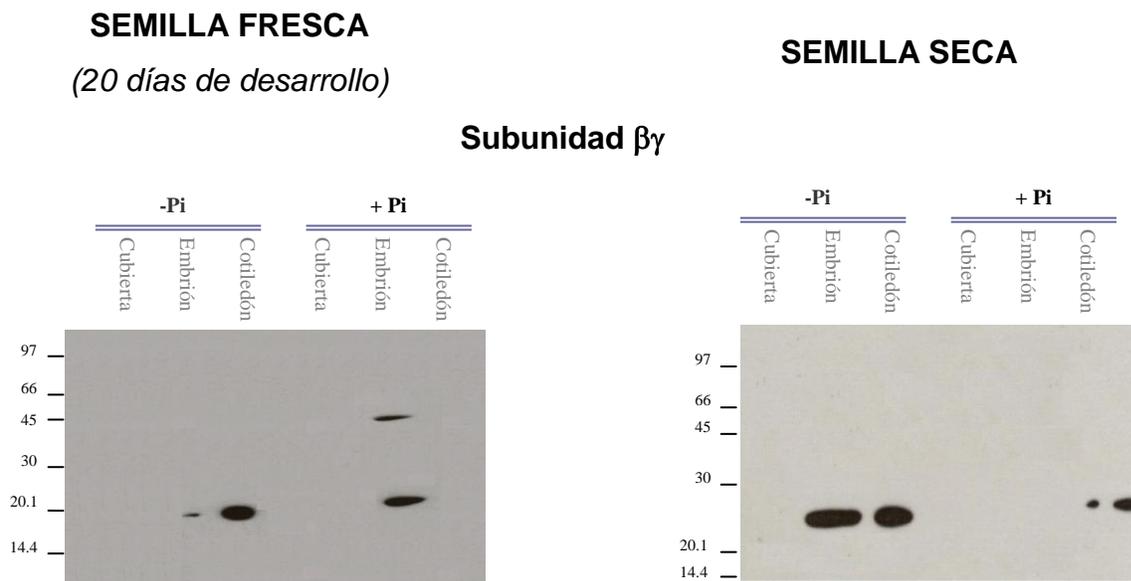


Figura 21. *Western Blot* de semillas de 20 días de desarrollo y de semillas secas
(continuación)



De la **Figura 21**, se puede observar para las subunidades del complejo lo siguiente:

a) Subunidad catalítica (α):

El anticuerpo contra la subunidad catalítica (α) reconoció a una proteína de 62.4 kDa en las semillas en desarrollo. Dicha proteína se expresa en embrión, cubierta y cotiledón bajo las dos condiciones de disponibilidad de fósforo. La expresión más alta se observó en la cubierta y en el cotiledón, pero la falta de fósforo redujo los niveles de expresión en todos los tejidos. En las semillas secas la subunidad catalítica α se expresa sólo en embrión y cotiledón.

La masa de la banda reconocida por el anticuerpo de la subunidad catalítica en las semillas provenientes de plantas cultivadas con deficiencia de fósforo fue de 63.6 kDa, mientras que en las semillas producidas por las plantas control la banda reconocida fue de 68.7 kDa. Las diferencias en las masas moleculares de las bandas reconocidas por el anticuerpo pueden ser atribuidas a modificaciones post-traduccionales.

Por otro lado, al comparar la concentración de la subunidad α en el embrión de semillas en desarrollo y el embrión de semillas secas, se observa que ésta se incrementa en la semilla seca y la banda que el anticuerpo reconoce en las proteínas de la cubierta desaparece.

b) Subunidad regulatoria γ :

En semillas en desarrollo se observa que la deficiencia de fósforo incrementa la expresión de la subunidad pero la limita sólo al cotiledón, mientras que en las plantas control la concentración es menor pero se encuentra en embrión y cotiledón.

El anticuerpo contra la subunidad γ reconoce una banda de 46.9 kDa y en todos los casos el anticuerpo reconoció otras bandas de menor masa molecular, las cuales podrían ser productos de la degradación de la proteína de 46.9 kDa.

En la semilla seca el anticuerpo contra la subunidad γ reconoció una banda principal con una masa molecular de 45.8 kDa en embriones y cotiledones. El efecto que se pudo observar por la deficiencia de fósforo consistió en la reducción de la concentración de la subunidad presente en el embrión, mientras que en los embriones de plantas control se observaron bandas que se encuentran debajo de la banda principal, lo cual puede relacionarse con una posible degradación.

c) Subunidad $\beta 2$:

En semillas en desarrollo el anticuerpo contra la subunidad $\beta 2$, reconoció bandas en embrión y cotiledón. En las semillas deficientes de fósforo la banda reconocida fue de 45.2 kDa, mientras que en las producidas por las plantas control fue de 48.9 kDa.

La imagen cambió notoriamente cuando se analizaron semillas secas, puesto que el anticuerpo reconocía a bandas que pesaban más que la banda de 45.2 kDa, pero también reconocía bandas por debajo. Esto podría indicar que esta subunidad sufre diversas modificaciones post- traduccionales.

d) Subunidad $\beta \gamma$:

Finalmente, el anticuerpo contra la subunidad $\beta \gamma$ identificó una banda de 18.5 kDa en los extractos de embrión y cotiledón de semillas en desarrollo, pero, en el extracto de embrión de las semillas producidas por las plantas control, se detectó una banda de 46.9 kDa, que probablemente corresponde al tamaño esperado de la subunidad $\beta \gamma$. Los resultados se muestran en la **Figura 22**.

Figura 22. Masas moleculares y concentración relativa de las subunidades del complejo *SnRK-1*.

Subunidad	Muestra	Deficiencia de fósforo (-Pi)				Condiciones óptimas de fósforo (+Pi)			
		Cubierta	Embrión	Cotiledón	Masa (kDa)	Cubierta	Embrión	Cotiledón	Masa (kDa)
α	SD	++	-	++	62.4	++	++	++	67.6
	SS	-	++	++	63.6	-	++	++	68.7
γ	SD	-	-	++	46.9	-	++	++	46.9
	SS	++	++	++	23.4	++	++	++	28.2
$\beta 2$	SD	-	++	++	45.2	-	++	++	48.9
	SS	-	++	++	51.3	-	++	++	56.6
$\beta \gamma$	SD	-	+	++	18.49	-	++	-	46.9
	SS	-	++	++	27.4	-	+	++	29.6

Los signos + indican la concentración relativa de las diferentes subunidades en los tejidos de semillas secas (SS) y de 20 días de desarrollo (SD). Los signos - denotan la ausencia de la expresión de las subunidades.

En el **Figura 22** se observa que tanto el desarrollo como la deficiencia de fósforo modifican la concentración de las distintas subunidades. Es posible que bajo estas condiciones las subunidades se combinen de diversas maneras para formar distintos tipos de complejos de *SnRK-1*.

Para investigar el efecto del desarrollo y de la deficiencia de fosfato sobre la composición del complejo *SnRK-1* se usaron dos estrategias. En una de ellas se emplearon anticuerpos específicos contra la subunidad catalítica (α) y proteína A-Agarosa para inmunoprecipitar los complejos y luego analizar su composición en SDS-PAGE. En la otra, los extractos se fraccionaron en una columna Superdex 200 de Cromatografía de filtración en gel y la identificación de las distintas subunidades en las fracciones por *Western Blot*.

5.4 Inmunoprecipitación

Este experimento se realizó con extractos de semillas de 20 días de desarrollo. Como se puede apreciar en la **Figura 23**, el anticuerpo contra la subunidad α y la proteína A-Agarosa inmunoprecipitan diferentes proteínas, sugiriendo que la deficiencia de fósforo puede modificar la composición del complejo *SnRK-1*.

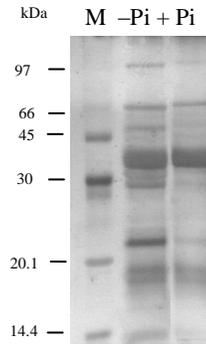


Figura 23. Gel teñido con plata de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo contra la subunidad α

5.5 Composición probable del complejo SnRK-1 en embriones de semillas de 20 días de desarrollo

De acuerdo con los resultados presentados en las **Figuras 19 y 21**, la deficiencia de fósforo modifica la concentración relativa de las subunidades que conforman el complejo SnRK-1.

En la **Figura 22** muestra que no sólo la deficiencia de fósforo es una variable en la expresión de las subunidades, sino que la concentración depende también del tipo de tejido que se esté analizando. Es por ello que para analizar la posible composición del complejo, se emplearon **embriones provenientes de semillas de 20 días de desarrollo obtenidas de plantas control** debido a que fue el único tejido en donde se encontraron las cuatro subunidades con masas moleculares similares a los reportados en la bibliografía (Hardie *et al.*, 1998).

Los extractos de embriones de semillas de 20 días de desarrollo y de semillas secas, ambas provenientes de plantas control, se fraccionaron en una columna de exclusión molecular previamente calibrada (**Figura 24**).

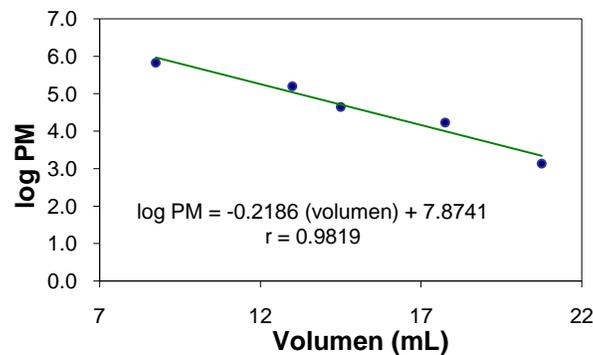


Figura 24. Calibración de la columna Superdex 200

Datos de la **Figura 24**.

Proteína	Masa (Da)	Volumen (mL)
Tiroglobulina	670 000	8.75
γ-globulina	158 000	13
Ovoalbúmina	44 000	14.5
Mioglobina	17 000	17.8
Vitamina B12	1 350	20.75

Las proteínas presentes en las diferentes fracciones se analizaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó siguiendo la técnica de tinción con plata (**Figura 25**).



Figura 25. Gel que contiene las fracciones que se colectaron en la columna Superdex 200 teñido con plata.

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas *Immobilion P* que se trataron con los anticuerpos específicos para las diferentes subunidades. Los resultados obtenidos se resumen en el **Figura 26**.

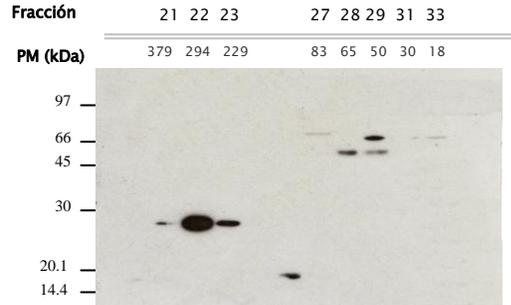
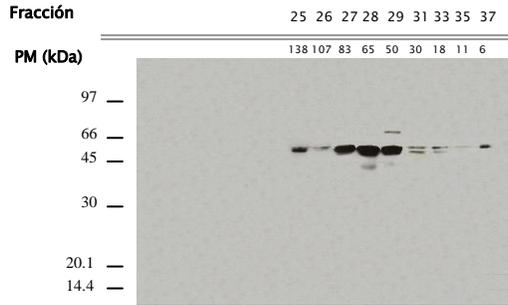
En la parte superior de los carriles se indica a qué fracción corresponde, así como la masa molecular calculado de acuerdo con la calibración de la columna. Del lado izquierdo están las masas moleculares de los marcadores empleados en la electroforesis.

Figura 26. *Western Blot* realizados a las fracciones obtenidas por la Cromatografía de Filtración en Gel

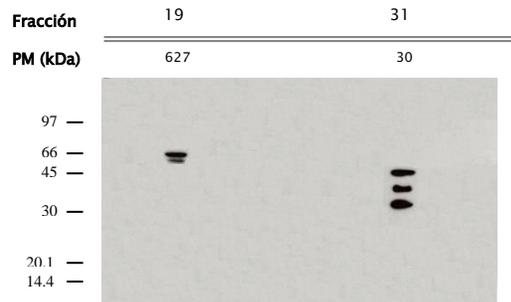
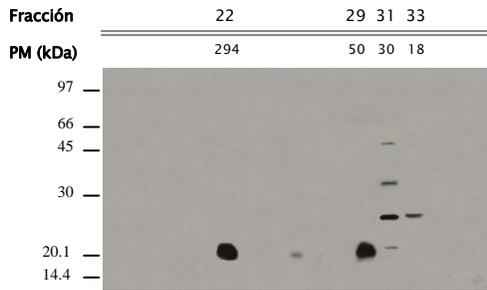
EMBRIONES EN DESARROLLO
(20 días de desarrollo, +Pi)

EMBRIONES SECOS
(+Pi)

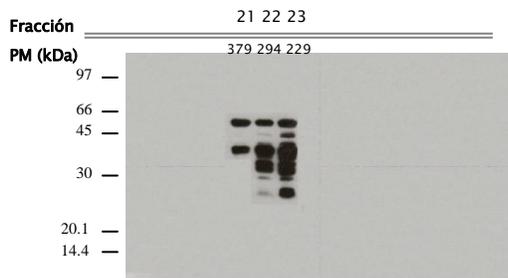
Subunidad α



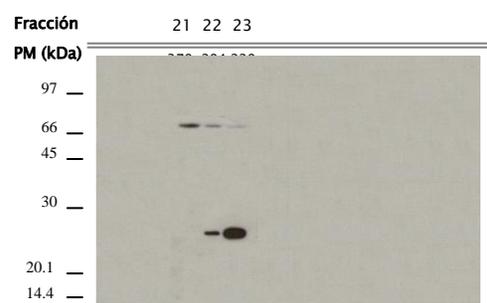
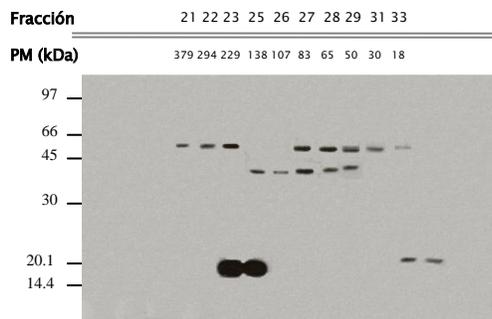
Subunidad γ



Subunidad β_2



Subunidad $\beta\gamma$



En la **Figura 26** se observa que en el extracto del embrión de semillas en desarrollo, el anticuerpo contra la subunidad α reconoce una banda de 51 kDa, la cual tiene una distribución muy amplia pues aparece en las fracciones 25 a la 35, que de acuerdo con la calibración de la columna corresponden a 138 kDa hasta 11 kDa.

En el extracto de embriones de las semillas secas, el anticuerpo contra la subunidad catalítica reconoció bandas de 62 kDa en las fracciones 27 hasta la 33. En las fracciones 21 a la 23, que corresponden a complejos de 379 kDa hasta 229 kDa, el anticuerpo reconoció una banda adicional.

Cuando los extractos de embriones en desarrollo y embriones secos se analizaron con el anticuerpo contra la subunidad γ , se identificó en la fracción 31 de ambos extractos una banda; en el caso de embriones en desarrollo la masa de la banda corresponde a 48.9 kDa mientras que en semillas secas la masa corresponde a 51.9 kDa. En ambos casos también se identificaron otras de menor tamaño que probablemente correspondan a productos de degradación. En el extracto de embriones secos también se identificó una banda de 48.9 kDa en la fracción 19 que corresponde a complejos de 627 kDa.

Cuando el extracto de embrión de semillas en desarrollo se incubó con el anticuerpo contra la subunidad β_2 ; se detectó una banda en las fracciones 21 a la 23 que corresponden a complejos con masas moleculares de 379 kDa hasta 229 kDa. En el extracto de embriones de semillas secas el anticuerpo contra la subunidad β_2 detectó una banda en la fracción 19 a la 23, cuyas masas moleculares oscilan desde los 229 kDa a los 379 kDa, las cuales corresponden a complejos moleculares grandes.

Finalmente el anticuerpo contra la subunidad $\beta\gamma$ detectó en las fracciones 21 a la 33 de los extractos de embriones de semillas en desarrollo dos bandas una de 57.5 kDa y otra de 46.9 kDa, mientras que en el eje embrionario seco las fracciones que contienen a la subunidad son la 21 a la 23 con una banda cuya masa molecular es de 66.6 kDa. Adicionalmente, en las fracciones 21 y 22 tanto de los embriones de semillas en desarrollo como de las semillas secas se observa una banda de 20 kDa, que probablemente corresponda a productos de degradación.

De acuerdo con estos datos, en embriones de semillas producidas por plantas control, en la fracción 31 se encuentran las subunidades α y $\beta\gamma$, mientras que en los extractos de los embriones de las semillas en desarrollo las mismas subunidades aparecen en las fracciones 25 a 29.

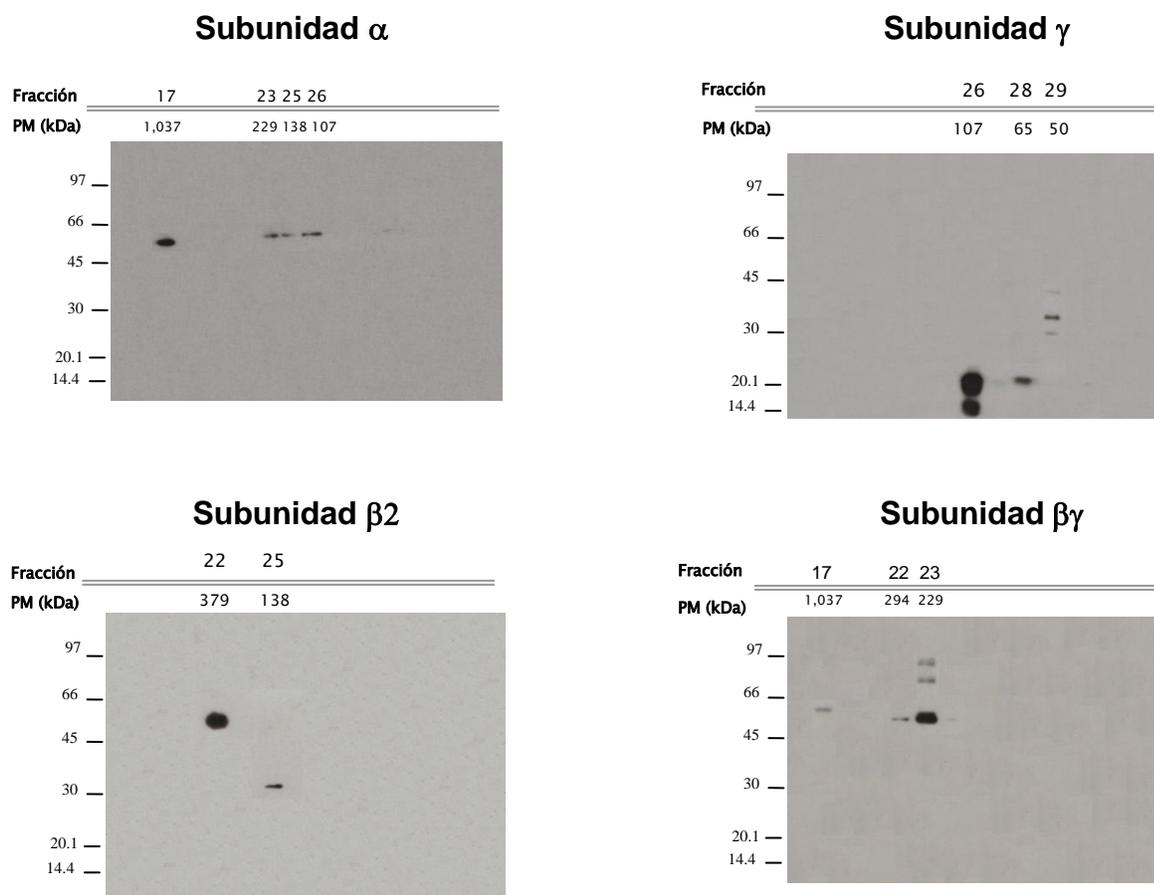
5.6 Establecimiento de la composición probable del complejo SnRK-1 en embriones de semillas de 20 días de desarrollo

Los resultados anteriores sugieren que las interacciones entre las diferentes unidades no son lo suficientemente estables y que en el transcurso del procedimiento el complejo se desintegra. Con el fin de estabilizar el complejo, el extracto de embriones de semillas con 20 días de desarrollo se trató con el entrecruzador DSP y posteriormente se fraccionó en la columna de exclusión molecular (Superdex 200). Las fracciones se analizaron de manera similar y los resultados se reportan en la **Figura 27**.

Figura 27. Western Blot realizados a las fracciones obtenidas por la Cromatografía de Filtración en Gel usando el entrecruzador DSP

EMBRION DE SEMILLAS EN DESARROLLO

De semilla de 20 días de desarrollo proveniente de una planta sin deficiencia de fósforo



Como se puede observar, el anticuerpo contra la subunidad α detecta una banda en la fracción 17 y vuelve a reconocer otra banda en las fracciones 23 hasta la 26. La primera corresponde a un agregado de 1,037 kDa, mientras que las otras corresponden a complejos de 229 kDa a 138 kDa.

En cambio la subunidad γ se encontró en las fracciones 26, 28 y 29, aunque solamente en la fracción 29 la banda reconocida tiene una masa molecular cercana a la reportada para la subunidad completa. Para la subunidad β_2 , se detectaron bandas en las fracciones 22 y 25, en la primera fracción la banda tiene una masa molecular de 48.9 kDa y en la segunda fracción la banda tiene una masa molecular de 31.2 kDa. La primera banda se encuentra en una fracción donde se asocia a un complejo que tiene una masa de 379 kDa y la segunda banda está en la fracción cuya masa se relaciona a un agregado de 138 kDa.

Finalmente, el anticuerpo contra la subunidad $\beta\gamma$ identificó varias bandas en las fracciones 17, 22 y 23. En la fracción 17 reconoció una banda de 57.5 kDa, en la 22 otra banda de 62.3 kDa y en la 23 tres bandas cuyas masas son de 85 kDa, 78 kDa y 62.3 kDa. La fracción 17 está asociada a un complejo de 1,037 kDa, mientras que las fracciones 22 y 23 forman parte de agregados de 294 kDa y 229 kDa respectivamente.

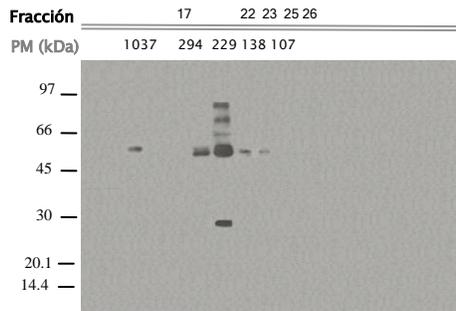
Este resultado muestra que las subunidades α y $\beta\gamma$ podrían formar un complejo. Llama la atención que las mismas subunidades se encuentren asociadas a complejos muy grandes, es decir, que se encuentren en fracciones cuyas masas son altas como la fracción 17. Probablemente se encuentren en estas fracciones porque forman parte del *proteasoma*, como un paso previo a su degradación.

5.7 Determinación de la presencia de ubiquitina

Muchas de las proteínas que son degradadas por la vía del proteasoma son primero ubiquitinadas, es decir son marcadas por proteínas de baja masa molecular, para que una vez señalizadas sigan el proceso de degradación.

Para poder comprender por qué aparecían subunidades en fracciones asociadas a altas masas moleculares, además de explicar la presencia de bandas que aparecían por arriba o debajo de la banda de interés, se decidió probar una de las membranas elaboradas con el anticuerpo contra la ubiquitina.

Figura 28. *Western Blot* realizado con el anticuerpo contra ubiquitina.



El resultado se presenta en la **Figura 28**; en donde se aprecia que el anticuerpo detecta proteínas en las fracciones 17 y en las fracciones 22, 23, 25 y 26, cuyo patrón se parece mucho a los obtenidos con los anticuerpos contra las subunidades α y $\beta\gamma$. Los resultados obtenidos empleando el entrecruzador para detectar a los posibles complejos, aunados con los resultados obtenidos al emplear el anticuerpo contra ubiquitina, se resumen en la **Figura 29**.

Figura 29. Elucidación de subunidades del complejo *SnRK-1* en extractos de embriones de semillas de 20 días de desarrollo entrecruzados con DSP Ditiobis (propianato de succimidil) y fraccionados en una columna de exclusión molecular.

Subunidad	Masa (kDa)	Fracciones donde se expresa la subunidad													
		17	19	21	22	23	25	26	27	28	29	31	33	35	37
α	64.5	✓				✓	✓	✓							
γ	41.6							✓		✓	✓				
$\beta 2$	62.7				✓		✓								
$\beta\gamma$	63.7	✓			✓	✓									
Ubiquitina	-----	✓			✓	✓	✓	✓							
Complejo		$\alpha\beta\gamma$			$\beta 2\beta\gamma$	$\alpha\beta\gamma$	$\alpha\beta 2$	$\alpha\gamma$							
Tamaño del complejo		1037			294	229	138	107							

Con esta experimentación no fue posible identificar algún complejo en donde se encontraran presentes las tres subunidades; sin embargo se demostró la combinación entre pares de ellas, algunas de las cuales probablemente presenten el proceso de ubiquitinización.

Capítulo 6. Discusión de resultados

Las cinasas del tipo *SnRK-1* son un grupo de enzimas estrechamente relacionadas con las AMP cinasas. Últimamente han recibido mucha atención pues se ha sugerido que en plantas, al igual que en animales, también podrían activarse en respuesta a situaciones ambientales que reducen la disponibilidad de energía, debido a que fosforilan enzimas clave para la regulación de distintas rutas metabólicas que facilitan la sobrevivencia bajo esas condiciones. Se ha propuesto que las *SnRK-1* son complejos formados por una subunidad catalítica (α) y dos regulatorias (β y γ). Se han identificado variantes de las subunidades (Polge Cecile *et al.*, 2007) haciendo posible la combinación entre ellas, sugiriendo diferentes tipos de complejos, que probablemente sean responsables de fosforilar diferentes proteínas.

En el caso de las plantas de frijol, la deficiencia de fósforo es una condición que reduce la producción y ocasiona grandes pérdidas en todo el país. La falta de fósforo produce múltiples efectos, pero una de sus primeras manifestaciones consiste en la disminución de los niveles de ATP (Bao *et al.*, 2009). Se sabe que la deficiencia de fósforo afecta a todas las plantas, pero se han identificado genotipos que tienen mayor capacidad para enfrentar los problemas derivados de su ausencia. Es por ello que un objetivo a largo plazo es establecer si la actividad del complejo *SnRK-1* contribuye a mejorar el desempeño de las plantas bajo esas condiciones. En frijol existen pocos antecedentes al respecto y el presente trabajo se ha enfocado a evaluar el impacto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad y la probable composición de los complejos *SnRK-1* durante el desarrollo de los frutos de las plantas de frijol.

La determinación de la actividad cinasa, medida como la incorporación de ^{32}P en el péptido sintético SAMS a partir de ATP marcado, mostró que en las **vainas** la actividad se incrementa después de la polinización. Cabe señalar que la deficiencia de fósforo aceleró dicho incremento (**Figura 17**). Por otro lado, la actividad en **semillas** producidas por las plantas control se incrementa durante el desarrollo (**Figura 17**) y la deficiencia de fósforo origina que el aumento fuera considerablemente menor. El hecho de que la actividad se incremente durante el desarrollo de la semilla hace suponer que el complejo es importante para regular la acumulación de reservas; sin embargo, el hallazgo de que la mayor actividad

se presenta cuando el desarrollo de la semilla prácticamente ha concluido sugiere que la actividad del complejo *SnRK-1* también puede ser importante para que la semilla adquiera tolerancia a la desecación.

Los análisis por *Western Blot*, empleando anticuerpos específicos para las diferentes subunidades en extractos de vainas y semillas (**Figura 19**), demostraron que tanto el desarrollo como la disponibilidad de fósforo alteran la concentración relativa de las mismas. Para caracterizar mejor el efecto de estas dos variables sobre el desarrollo de las semillas, se analizaron semillas en desarrollo (20 días después de la polinización) y secas. Los resultados obtenidos de los *Western Blot* confirman el comportamiento de la actividad cinasa evaluada con anterioridad, pues la cantidad de subunidad catalítica es mayor en las semillas secas que en las que están en desarrollo.

Si bien la subunidad α está presente en todos los tejidos, existen factores que afectan la distribución de subunidades regulatorias y por ende la actividad del complejo *SnRK-1*, tales como el tipo de tejido, el tiempo de desarrollo de la planta, pues son notables las diferencias entre los perfiles de semillas en desarrollo y secas, así como la deficiencia de micro y macronutrientes en el ambiente (**Figura 21**).

Aunado a los cambios en los niveles de las distintas subunidades, la modificación postraduccional (degradación y ubiquitinización entre otras) contribuye a la regulación del complejo (Kurepa y Smalle, 2008).

Un elemento clave para entender la participación del complejo *SnRK-1* en la regulación de distintos procesos metabólicos es la posibilidad de que las distintas subunidades se combinen para formar diferentes clases de complejos. En el presente trabajo se realizaron los siguientes experimentos para tratar de establecer la posible composición del(los) complejo(s):

- a) Se emplearon extractos de semillas en desarrollo producidas por plantas con deficiencia y sin deficiencia de fósforo se inmunoprecipitaron con el anticuerpo de la subunidad α . El inmunoprecipitado se analizó en SDS-PAGE que al ser teñido con plata reveló diferencias muy importantes dependiendo del extracto. La

secuenciación de las proteínas inmunoprecipitadas en ambos casos seguramente arrojará información muy interesante.

- b) El fraccionamiento en una columna de exclusión molecular fue otra herramienta empleada para tratar de establecer la composición del complejo. En este caso los extractos se prepararon con embriones de semillas secas y en desarrollo (20 días después de la polinización), provenientes de plantas cultivadas sin deficiencia de fósforo. Se seleccionó este tejido ya que resultó ser el único en donde están presentes todas las subunidades. Los resultados de estos experimentos se resumen en el **Figura 26**.

Aun cuando varias subunidades pudieran estar en la misma fracción, las subunidades eluyen de acuerdo con su masa molecular, lo cual sugiere que no forman ningún complejo o bien que las interacciones que las unen no son suficientemente fuertes o resistentes al proceso de separación y por ello el complejo se desensambla durante la manipulación.

Con el fin de estabilizar los complejos los extractos se trataron con el entrecruzador DSP y después se fraccionaron en la columna de exclusión molecular Superdex 200. Los resultados se muestran en la **Figura 29**.

De acuerdo con ellos, se puede sugerir que en embriones de semillas de frijol de 20 días de desarrollo provenientes de plantas control, se expresan complejos de *SnRK-1* formados por las subunidades α - $\beta\gamma$, $\beta 2$ - $\beta\gamma$, $\alpha\beta 2$ y $\alpha\gamma$; no se encontró uno en el que la subunidad catalítica estuviera unida a dos subunidades regulatorias. Es probable que ese complejo sea particularmente inestable y que para detectarlo el procedimiento deba ser optimizado. El hecho de que las fuerzas que unen a las subunidades sean débiles puede ser ventajoso y hacer del ensamblaje un proceso dinámico: ensamblarse de una forma, desensamblarse y ensamblarse de otra para satisfacer las necesidades de la planta.

Según Gissot y sus colaboradores (2004) el complejo α - $\beta\gamma$ puede ser activo. En base a ello se pueden plantear las siguientes perspectivas:

1. Investigar si con extractos de cotiledones se encuentran complejos similares.
2. Evaluar si alguna de esas asociaciones tiene actividad de cinasa.

En semillas secas fue evidente que algunas de las subunidades tenían masas moleculares superiores a los observados en los extractos de semillas en desarrollo (**Figura 26**). En el extracto de embriones de semillas secas que se fraccionó sin que se haya usado el entrecruzador, se observó que el anticuerpo contra la subunidad α reconoce una proteína pequeña que aparece asociada a agregados de alta masa molecular (**Figura 26**). Esto supone que la degradación del complejo o de algunas de las subunidades se lleva a cabo vía proteasoma. La ubiquitinización es un paso previo para muchas de las proteínas que son degradadas de esta manera.

El análisis con anticuerpos contra ubiquitina (**Figura 28**) de fracciones de extracto que antes de ser separados fueron tratados con el entrecruzador muestra un parecido sorprendente con el que bajo las mismas condiciones se obtuvo usando anticuerpos contra la subunidad α (**Figura 27**). Estos resultados sugieren que la degradación de algunas subunidades del complejo *SnRK-1* (o el complejo en su conjunto) ocurre vía proteasomal. Sin embargo, será necesario investigar los detalles del proceso y si éste es modificado por la deficiencia de fósforo.

Capítulo 7. Conclusiones

- Los resultados del presente trabajo muestran que la actividad de cinasa del complejo *SnRK-1* se modifica en respuesta a factores endógenos (desarrollo y tejido) y exógenos (disponibilidad de fosfato).
- El curso de la actividad durante el desarrollo de la semilla sugiere que el complejo *SnRK-1* puede estar involucrado tanto en la acumulación de reservas como en la adquisición de tolerancia a la desecación.
- La expresión diferencial de las distintas subunidades y la modificación postraducciona l de algunas de ellas son elementos que contribuyen a la regulación de la actividad del complejo *SnRK-1*.
- Las subunidades que forman el complejo *SnRK-1* están unidas por interacciones débiles, lo cual tal vez facilite el recambio de sus subunidades y con ello la participación en múltiples procesos.
- La posible vía de degradación de las subunidades del complejo *SnRK-1* involucraría su ubiquitinización y su posterior procesamiento en el proteasoma.

Bibliografía

- BAENA González Elena y SHEEN Jen, (2008), **Convergent energy and stress signaling**, Trends in Plant Science 13: 474-482.
- BAENA González Elena, ROLLAND Filip, THEVELEIN Johan y SHEEN Jen (2007) **A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling**. Nature 448:938–942
- BAO Jinxiang, ZHANG Shuhua, LU Wenjing, GUO Chengjin, GU Juntao, XIAO Kai (2009), **Transcriptional responses and regulations to deficient phosphorus in plants**, Front Agricultural China, 3: 47–54
- BORNEMISZA, E. (1982) **Introducción a la química de suelos**. Washington: OEA, 74p.
- BOULY Jean-Pierre, GISSOT Lionel, LESSARD Philippe, KREIS Martin and THOMAS Martine. (1999) **Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN1, an SNF1-like protein kinase**. Plant Journal 18:541–550
- BRADFORD, Marion, (1976), **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding**, Analytical Biochemistry, 7 : 248-254
- CELENZA, John, CARLSON, Marian, (1986), **A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase**, Science 233: 1175-1180
- CARLSON, Marian., (1998), **Regulation of glucose utilization in yeast**, Current Opinion in Genetics and Development 8: 560-564
- CRAFTS-Brandner Steven J, (1992) **Phosphorus Nutrition Influence on Starch and Sucrose Accumulation, and Activities of ADP-Glucose Pyrophosphorylase and Sucrose-Phosphate Synthase during the Grain Filling Period in Soybean**, Plant Physiology, 98:1133-1138
- DALE Susan, WILSON Wayne, EDELMAN Arthur y HARDIE Grahame (1995) **Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulindependent protein kinase I**. FEBS Letters 361:191–195
- DAVIES Stephen P., CARLING David y HARDIE D. Grahame, (1989) **Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay** European Journal Biochemistry 186: 123- 128
- DAVIES, Stephen .P, HAWLEY Simon A, WOODS A, CARLING D, HAYSTEAD TA y HARDIE D. Grahame (1994) **Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure**.European Journal Biochemistry 223 :351–357
- FASSBENDER, H.(1966) **La adsorción de fosfatos en suelos fuertemente ácidos y su evaluación usando la isoterma de Langmuir**. Fitotecnia Latinoamericana, 3: 203-216, 196
- FRAGOSO, Selene, ESPÍNDOLA Laura, PAÉZ Valencia Julio, CAMACHO Yolanda, MARTÍNEZ Eleazar y COELLO Patricia, (2009), **SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 Are Differentially Regulated in Arabidopsis Plants under Phosphate Starvation**, Plant Physiology, 149:1906-1916

GEIGENBERGER, Peter, (2003) **Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers.** *Journal of Experimental Botany*, 54: 457–465

GISSOT, Lionel, POLGE Cécile, BOULY Jean Pierre, LEMAITRE Thomas, KREIS Martin y THOMAS Martine (2004) **AKINb3, a plant specific SnRK-1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic b subunits.** *Plant Molecular Biology* 56: 747–759

GUTIERREZ, Laurent, VAN Wuytswinkel Olivier, CASTELAIN Mathieu y BELLINI Catherine (2007); **Combined networks regulating seed maturation,** *Trends in Plant Science*, 12: 294 – 301

HALFORD Nigel G. , HEY Sandra, JHURREEA Deveraj, LAURIE Sophie, McKIBBIN Rowan S., ZHANG Yuhua y PAUL Matthew J. (2004), **Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism,** *Journal of Experimental Botany*, 55:35-42

HALFORD Nigel, HEY Sandra, JHURREEA Deveraj, LAURIE Sophie, McKIBBIN Rowan y ZHANG Yuhua, (2003) **Metabolic signalling and carbon partitioning: role of SNF1-related (SnRK-1) protein kinase.** *Journal of Experimental Botany*. 54:467–475

HALFORD Nigel y HARDIE Grahame (1998) **SNF1-related protein kinase: global regulators of carbon metabolism in plants.** *Plant Molecular Biology*, 37: 735-748

HARDIE, D.Grahame. (2004) **The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream.** *Journal of Cell Science*. 117: 5479–5487

HARDIE, D.Grahame y SAKAMOTO Kei. (2006) **AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle.** *Physiology* 21:48–60

HARDIE D. Grahame, CARLING David y CARLSON Marian, (1998) **The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?** *Annual Review of Biochemistry*, 67:821-855

HARDIE, Grahame (2007), **AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy,** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*

HARTHILL Jean, MEEK Sarah, MORRICE Nick, PEGGIE Mark, BORCH Jonas, WONG Barry y MACKINTOSH Carol, (2006) **Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose.** *Plant Journal* 47: 211–223.

HERNÁNDEZ Georgina, RAMIREZ Mario, VALDÉS Oswaldo, TESFAYE Mesfin, GRAHAM Michelle, CZECHWOSKI Tomasz, SCHLERETH Armin, WANDREY Maren, ERBAN Alexander, CHEUNG Foo, WU Hank, LARA Miguel, TOWN Christopher, KOPKA Joachim, UDVARDI Michael y VANCE Carroll (2007) **Phosphorus Stress in Common Bean: Root Transcript and Metabolic Responses,** *Plant Physiology*, 144: 752–767

HOEKSTRA F.A., GOLOVINA E.A. y BUITINK J. (2001) **Mechanisms of plant desiccation tolerance.** *Trends in Plant Science* 5: 431–438.

HUDSON E.R, PAN D.A, JAMES J, LUCOCQ J, HAWLEY, GREEN, TERASHIMA, HARDIE (2003) **A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias.** *Current Biology*; 13: 867-871

JIANG, R. y Carlson, M. (1997) **The SNF1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex.** *Molecular and Cellular Biology*,

17: 2099–2106

KUREPA, Jasmina, SMALLE, Jan; (2008); **Structure, function and regulation of plant proteosomes**, *Biochimistry*, 90: 324-335

LAURIE Sophie, ROWAN S. y HALFORD Nigel, (2003) **Antisense *SNF1*-related (*SnRK-1*) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos**. *Journal of Experimental Botany*. 54: 739–747

LÓPEZ Bucio José, RAMÍREZ Cruz Alfredo, HERRERA Estrella Luis, (2003) **The role of nutrient availability in regulating root architecture** *Current Opinion in Plant Biology*, 6:280–287

LUMBRERAS Victoria, ALBA Mar, KLEINOW Tatjana, KONCZ Csaba y PAGÉS Monsterrat; (2001) **Domain fussion between *SNF1* related kinase subunits during plant evolution**. *European Molecular Biology Organization*, 2: 55-60

MIMURA Tetsuro (1995) **Homeostasis and Transport of Inorganic Phosphate in Plants** *Plant Cell Physiology*. 36(1): 1-7

MINOKOSHI, Yasuhiko, KIM Young, PERONI Odile, FRYER Lee, MULLER Corinna, CARLING David y KAHN Barbara (2002) **Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase**. *Nature* 415: 339–343

MUKATIRA Uthappa T., LIU Chunming, VARADARAJAN Deepa K., RAGHOTHAMA Kashchandra G. (2001), **Negative Regulation of Phosphate Starvation-Induced Genes**, *Plant Physiology*, 127:1854–1862

POIRIER Y., BUCHER M. (2002), **Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis**. CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists

POLGE Cécile y THOMAS Martine (2006), ***SNF1/AMPK/SnRK-1* kinases, global regulators at the heart of energy control?**, *TRENDS in Plant Science*.12 :1-9

Rendimiento y calidad nutrimental de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris*) en épocas de siembra *Revista fitotecnia Mexicana* 2008 31:235- 241

RAGHOTHAMA, K. G. (1999) **Phosphate acquisition**. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 665-693

ROLLAND Filio, GONZÁLEZ Elena y SHEEN Jen (2006) **Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms**. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675–709

ROSALES, Serna Rigoberto, OCHOA, Márquez Roberto y ACOSTA, Gallegos Jorge, (2001), **Fenología y Rendimiento del Frijol en el antiplano de México y su respuesta al fotoperiodo**, *Agrociencia*, Vol. 35 pp 513-523.

SALISBURY, F. B. y ROSS C. W.,(1969) **Plant Physiology**, Wadsworth Pu. Co. Inc. Belmont, cuarta edición, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California pp 62-92.

SCOTT John, HAWLEY Simon, GREEN Kevin, ANIS Miliea, STEWART Greg, SCULLION Gillian, NORMAN David, HARDIE Grahame (2004),**CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations**, *Journal Clinic Investigation*; 113: 274-284.

SUGDEN Christopher, DONAGHY Paul, HALFORD Nigel, HARDIE Grahame, (1999), **Two SNF1-Related Protein Kinases from Spinach Leaf Phosphorylate and Inactivate 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- Coenzyme A Reductase, Nitrate Reductase, and Sucrose Phosphate Synthase in Vitro** *Plant Physiology*, 120:257–274

YANG X., HUBBARD E. y CARLSON M. (1992), **A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system.** *Science*, **257**: 680–682.

YANG X, JIANG R y CARLSON M, (1994), **A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex** *European Molecular Biology Organization* **13**: 5878–5886.

WEI-Yi Lin, SHU-I Lin, TZYY-Jen Chiou,(2009) **Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants** *Journal of Experimental Botany*, 60:1427-1438