



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA A DEFICIENCIA DE
FÓSFORO EN PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana* COMO EFECTO DE LA
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE UNA PIROFOSFATASA INORGÁNICA
SOLUBLE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

FERNANDO OROZCO NERI

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX

2017





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 está 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: DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ

VOCAL: DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SECRETARIO: DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

1° SUPLENTE: DR. HIRAM FERNANDO RAMÍREZ CAHERO

2° SUPLENTE: DR. FÉLIX MORALES FLORES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 115, Conjunto E, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. LILIÁN GABRIELA VALENCIA TURCOTTE

SUSTENTANTE:

FERNANDO OROZCO NERI

Agradecimientos

Se agradece por el financiamiento de la DGAPA, UNAM, a través del proyecto PAPIIT IN216815, el financiamiento de la Facultad de Química, a través del presupuesto PAIP 5000-9122, y al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química, por el apoyo económico otorgado al sustentante también se agradece por el financiamiento del CONACYT a través del proyecto INFRA-2015-252001.

I. Índice

I. Índice.....	1
II. Resumen.....	3
III. Abreviaturas.....	4
IV. Símbolos y Unidades.....	5
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	8
2.1. Arabidopsis como modelo vegetal.....	8
2.2. El fósforo, un nutriente esencial.....	11
2.3. El estrés por deficiencia de fósforo en plantas.....	14
2.4. El pirofosfato y las pirofosfatasas.....	17
2.5. La proteómica como abordaje de la respuesta de organismos a condiciones de estrés.....	23
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos particulares.....	31
5. Materiales y Métodos.....	32
5.1. Material biológico.....	32
5.2. Materiales y equipo de laboratorio.....	32
5.3. Reactivos y sustratos.....	33
5.4. Amortiguadores y disoluciones.....	33

5.5. Germinación de las semillas y crecimiento de plantas.....	34
5.6. Extracción de proteína total para 2D-SDSPAGE.....	35
5.7. Elaboración de geles 2D-SDSPAGE.....	36
5.8. Documentación de imágenes, comparación de patrones e identificación...	38
6. Resultados.....	39
7. Discusión de resultados.....	61
8. Conclusiones.....	66
9. Perspectivas.....	67
10. Referencias.....	68

II. Resumen

Se llevó a cabo el cultivo de plantas silvestres y mutantes para la isoforma 4 de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana* (AtPPiase4) tanto mutantes con baja expresión, como transgénicas sobreexpresoras. Las plantas fueron sometidas a condiciones control en suficiencia de fósforo y a condiciones de estrés por insuficiencia de fósforo. Se realizó la extracción de proteínas totales solubles y su separación en geles bidimensionales teñidos con azul de Coomassie coloidal. Se realizó la comparación de los patrones obtenidos mediante el uso de PDQuest 2-D Analysis Software v8.0 de Bio-Rad® y se procedió a la identificación de proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas de fragmentos trípticos. Los resultados revelan cambios importantes en un conjunto limitado de proteínas, previamente reportadas como relevantes a la respuesta por deficiencia de fósforo. Sin embargo, las mutantes mostraron diferencias importantes en su comportamiento respecto al control, lo que apoya propuestas recientes sobre el papel significativo para el metabolismo del pirofosfato en la respuesta a la deficiencia de fósforo.

III. Abreviaturas

AtPPiase4	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 4
PPi	Pirofosfato
PPiase	Pirofosfatasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNAseq	Secuenciación de RNA
P	Fósforo
Pi	Fosfato inorgánico u ortofosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
PSR	(Phosphate starvation response) Respuesta a inanición de fosfato
PUE	(Phosphate use efficiency) Eficiencia de uso del fosfato
UV	Ultravioleta
Ca	Calcio
Fe	Hierro
Al	Aluminio
PEP	Fosfoenolpiruvato
H ⁺	Protón
siPPiase	Pirofosfatasa inorgánica soluble
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
IEF	Enfoque isoeléctrico o Isoelectroenfoque
pI	Punto isoeléctrico
2D-E	Electroforesis bidimensional
MS	Espectrometría de masas
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
NH ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
Tris-HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
atppa4 ^{tDNA}	Plantas de la mutante de baja expresión para AtPPa4
ATPPA4CFP ^{35::S}	Plantas transgénicas sobreexpresoras de la proteína de fusión 35S-AtPPa4-CFP
WT	Plantas de tipo silvestre ecotipo Columbia-0
M&S	Medio de cultivo Murashige & Skoog

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
N ₂	Nitrógeno
BSA	Albúmina sérica bovina
GFP	Proteína verde fluorescente
CFP	Proteína cian fluorescente
tDNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
CHAPS	3 - [(3-colamidopropil) dimetilamonio] -1-propanosulfonato

IV. Símbolos y Unidades

pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
mM	Milimolar
ΔG°	Energía libre estándar
kJ	Kilojoules
m/v	Relación masa/volumen
v/v	Relación volumen/volumen
M	Molar
min	Minutos
g	Gramos
L	Litro
°C	Grados Celcius
h	Horas
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
μ g	Microgramos
G	Fuerza en veces la gravedad terrestre.
cm	Centímetros
V	Voltios
Vh	Voltios por hora

1. Introducción

El fósforo es indispensable para la vida ya que es parte de diversas macromoléculas biológicas y participa en el metabolismo energético de la célula (Sternier & Elser, 2002; Nelson & Cox, 2009). Las plantas deben obtener este elemento del suelo pero, después del nitrógeno, es el elemento que más limita los cultivos agrícolas debido a su baja solubilidad y biodisponibilidad (Halvin *et al.*, 2005; Vance *et al.*, 2003; Raghothama, 2000). Las plantas se han adaptado a tales deficiencias y en su genética existen patrones de respuesta para adaptar su fisiología y morfología a falta de dicho elemento (Plaxton, 2010).

Para mejorar el crecimiento y la bioproduktividad de los cultivos agrícolas, el uso de fertilizantes con fosfato es una alternativa muy empleada, pero que no será viable en el largo plazo, debido a lo reducido de los yacimientos con minerales ricos en fósforo y al costo excesivo de recuperar fósforo de los minerales insolubles en el suelo (Filippelli, 2008). El metabolismo biosintético genera pirofosfato (PPi) como subproducto de las reacciones de biosíntesis de ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos. (Nelson & Cox, 2009; Jones *et al.*, 2010). Las pirofosfatasas inorgánicas solubles (PPiase) hidrolizan el PPi producido durante las reacciones biosintéticas en dos moléculas de fosfato (Pi), y podrían estar implicadas en estos mecanismos de adaptación (Navarro De la Sancha *et al.*, 2007; Hernández Domínguez *et al.*, 2012), pero poco se sabe de los mecanismos que regulan su actividad.

El genoma de la planta modelo *A. thaliana* posee seis genes que codifican para diferentes isoformas de la enzima PPiase (Schulze *et al.* 2004; Gutiérrez-Luna *et al.*, 2016). Estudios anteriores en *Arabidopsis* han mostrado que el metabolismo del PPi está implicado en la respuesta al estrés en plantas verdes (Plaxton, 2010; Gaxiola *et al.*, 2011) y que las plantas que carecen de alguna isoforma de PPiase presentan cambios fenotípicos modestos, pero entre ellos, despliegan una mayor tolerancia a algunos tipos de estrés abiótico, destacablemente las plantas mutantes para la pirofosfatasa isoforma 4 (AtPPiase4) presentan mayor tolerancia a la deficiencia de fósforo (Perales Baños, 2008; De Villafranca Casas, 2010; Hernández Domínguez *et al.*, 2012). Interesantemente, en reportes anteriores se ha observado la sobreexpresión a nivel de transcrito y de proteína de la AtPPa4 en respuesta a deficiencia de fósforo en raíces de *Arabidopsis*, lo que sugiere su importancia en la adaptación a este tipo de estrés (Lan, *et al.*, 2012; Hoehenwarter *et al.*, 2016).

Aunado a lo anterior, en reportes previos, en el estudio de plantas transgénicas de papa con un metabolismo alterado de PPi, se han observado cambios en el crecimiento, debidos probablemente a cambios en el metabolismo de carbohidratos, lo que resalta la importancia del metabolismo del PPi en plantas de interés agrícola (Farré *et al.*, 2001; Farré *et al.*, 2006). Está bien demostrado que la adaptación de las plantas al estrés está asociada a cambios importantes en su proteoma y su estudio puede contribuir de forma significativa a identificar a las proteínas cuya participación es clave en la adaptación de los vegetales a la deficiencia de fósforo (Kosová *et al.*, 2011).

2. Antecedentes

2.1. Arabidopsis como modelo vegetal

Desde hace más de 20 años, la planta con flor *Arabidopsis thaliana* fue adoptada como organismo modelo por muchos investigadores (Fig. A). Esto ha llevado al desarrollo de importantes herramientas, recursos y enfoques experimentales que han impulsado en gran medida la investigación bioquímica en plantas (Meyerowitz, 1989; Somerville & Koornneef, 2002; Hays, 2002).



Figura A. Plantas de *Arabidopsis thaliana*. Somerville & Koornneef, 2002.

Debido a la divergencia de las plantas con flor a partir de un ancestro común, *Arabidopsis* se encuentra emparentada con varios cientos de miles de especies de plantas, por lo que se le considera un excelente modelo biológico para la investigación de la biología, fisiología y bioquímica de los vegetales fotosintéticos. La amplia aceptación de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo se ha traducido en métodos bien establecidos, recursos genéticos e información genómica, que se encuentran disponibles para su estudio, facilitando la investigación de una gran variedad de problemas biológicos y bioquímicos en esta especie (Somerville & Koornneef, 2002).

El pequeño tamaño y requerimientos relativamente simples para el crecimiento de *Arabidopsis* la vuelven fácil de cultivar en condiciones de laboratorio. Esta planta es un diploide auto-fertilizable que produce un gran número de semillas a partir de un solo individuo, facilitando así la producción rápida de una numerosa progenie a partir de una sola mutante o planta transgénica de interés. Además, tiene un ciclo de vida relativamente corto para ser una planta con flor, que es de aproximadamente 8 semanas. *Arabidopsis* puede transformarse con facilidad asperjando sus flores con bacterias que contengan un gen de interés en un plásmido transponible y, posteriormente, puede ser seleccionando siguiendo la presencia del transgen en la siguiente generación. Para facilitar la selección de las transformantes, generalmente se acompaña la construcción de marcadores de resistencia a antibióticos y/o agroquímicos (Meyerowitz, 1989; Somerville & Koornneef, 2002; Hays, 2002).

Arabidopsis posee uno de los genomas más pequeños entre las plantas con flor, además de que los recursos genéticos que se encuentran disponibles incluyen una vasta colección de mutaciones por inserción ordenadas y secuenciadas. Además, se cuenta con una extensa colección de datos de expresión en forma de bases de datos del genoma, de microarreglos de DNA y de RNAseq, todos asociados a un extenso acervo de publicaciones científicas que soportan dicho conocimiento. Los microarreglos se pueden adquirir comercialmente y el genoma está completamente secuenciado y bastante bien anotado, estando disponible públicamente la base de datos respectiva, conocida como TAIR (Lamesch et al., 2012). También, se encuentran disponibles dos extensas colecciones de plantas transgénicas, en las que varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta han sido afectados, mediante la interrupción de genes específicos por un transposón (Meyerowitz, 1989; Somerville & Koornneef, 2002; Hays, 2002). Estas colecciones se conocen como la colección SAIL (syngenta™) y la colección SALK (SALK institute) que son mantenidas por el "Arabidopsis Biological Resource Center" de la Universidad del Estado de Ohio.

Una de las estrategias fundamentales en el estudio del análisis funcional de los genes en un organismo es la mutación por pérdida de función de uno o más genes, una forma común de lograr esto en *Arabidopsis thaliana* y en otras plantas es utilizar a una cepa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que ha sido sujeto de ingeniería genética para substituir por marcadores de selección a los genes de infección del transposón T, pero respetando las secuencias necesarias para la integración de dicho transposón al genoma vegetal (Alonso et al., 2003).

Es de suma importancia mantener presente el objetivo de estudiar a *Arabidopsis*, que es el de facilitar la comprensión de las bases bioquímicas y genéticas que sustentan la fisiología de las plantas angiospermas, en particular, y de los organismos fotosintéticos, en general. Debido a la importancia agrícola de ciertas especies para el humano, será necesario hallar el justo medio entre los enfoques prácticos que se centran en plantas con valor agrícola y aquellos que consideran imperativo el invertir en la comprensión profunda y básica de las plantas y de sus mecanismos de adaptación a las condiciones naturales y agrícolas (Somerville & Koornneef, 2002).

2.2. El fósforo, un nutriente esencial

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para todos los organismos vivos que forma parte de procesos biológicos básicos. Como elemento estructural forma parte de ácidos nucleicos y fosfolípidos, nucleótidos y fosfoproteínas. Toma un papel central en el metabolismo de energía, en la activación de intermediarios metabólicos, como componente en cascadas de señalización, en la regulación de enzimas (Sternier & Elser, 2002; Nelson & Cox, 2009) y, por ello, juega un papel central en virtualmente todos los procesos metabólicos centrales en plantas, de manera muy sobresaliente, en la fotosíntesis y la respiración. Así, el P es indispensable para acoplar las reacciones de fase luminosa y fase oscura de la fotosíntesis, constituyendo un componente esencial de la cadena de conversión de energía y la asimilación del carbono (Ticconi & Abel, 2004; Plaxton & Tran, 2011).

El fósforo se encuentra presente en forma de minerales como el ortofosfato (Pi) en el suelo y las plantas absorben ortofosfato como H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} dependiendo del pH del suelo. A pH 7.2, las cantidades de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} son muy similares; sin embargo la asimilación de H_2PO_4^- es mucho más rápida que la de HPO_4^{2-} (Halvin *et al.*, 2005). A pesar de que el fósforo es abundante en la litósfera, las propiedades fisicoquímicas y la química del fosfato inorgánico (Pi) lo vuelven uno de los minerales menos biodisponibles. Las concentraciones de Pi soluble en el suelo (En promedio 0.05 ppm) con frecuencia son unas 1000 veces menores que las de otros iones requeridos por las plantas (Halvin *et al.*, 2005; Vance *et al.*, 2003; Raghothama, 2000). Como consecuencia, la disponibilidad de fosfato en el suelo afecta también a la asimilación de nitrógeno y azufre, pues dicha asimilación requiere de un suministro adecuado de esqueletos de carbono de provenientes de la fotosíntesis, que como ya se dijo no puede ocurrir sin fosfato (Epstein *et al.*, 2004).

La estabilidad química y retención celular de ácidos nucleicos, fosfolípidos y muchos metabolitos es dependiente del fosfato debido a que el Pi es el único anión inorgánico capaz de formar diésteres cargados a pH fisiológico (Epstein *et al.*, 2004). No es pues de sorprender que la disponibilidad de fosfato afecte profundamente el metabolismo de las plantas y el rendimiento de los cultivos agrícolas (Ticconi & Abel 2004).

En particular, muchos metabolitos son monoésteres de ortofosfato, mientras que los enlaces de compuestos fosfoanhídrido como el ATP funcionan para canalizar energía desde los procesos productores de energía a los procesos celulares dependientes de energía, como la biosíntesis, el bombeo de iones y trabajo mecánico.

Muchos suelos presentan una biodisponibilidad de fósforo insuficiente para el crecimiento de los cultivos agrícolas y el uso masivo de fertilizantes que contienen P_i busca atacar este problema de manera inmediata (Plaxton & Tran, 2011). Pero, el uso de fertilizantes de P_i es bastante ineficiente, pues menos del 20% del P_i aplicado es asimilado por las plantas durante su primer periodo de crecimiento. El P_i restante se insolubiliza en el suelo, o se lixivia y contamina cuerpos de agua cercanos. Los escurrimientos del P_i proveniente de la agricultura son un factor primario en la eutrofización de lagos y estuarios marinos, que con frecuencia han resultado en la proliferación de cianobacterias tóxicas (Plaxton & Tran, 2011); causando la muerte masiva de peces, crustáceos y moluscos acuáticos, además de afectar a las personas que consumen productos pesqueros de cuerpos acuáticos contaminados (Behrendt, 1993).

Con la población del mundo en rápido crecimiento, nos enfrentamos al reto de producir suficientes cultivos alimenticios afrontando además la disminución de reservas de fertilizantes de P_i (Abelson, 1999; Gilbert, 2009). El lograr una comprensión más completa de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos sobre la captación y uso de P_i en plantas es pues imperativo, ya que puede conducir al

desarrollo de cultivares eficientes en la captación de nutrientes y reducir la dependencia que tiene la agricultura tecnificada actual de los fertilizantes de Pi no renovables (Plaxton & Tran, 2011).

2.3. El estrés por deficiencia de fósforo en plantas

Un estrés se define como una condición adversa que inhibe el funcionamiento normal de un sistema biológico (Mahajan & Tuteja, 2005). Es decir, una gran variedad de condiciones ambientales pueden inducir estrés alterando significativamente el metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo el caso extremo, aquel estrés que conduce a la muerte del organismo. El estrés abiótico puede ser generado por la sequía, alta concentración de sales, temperaturas extremas, metales pesados y radiación (Taylor *et al.*, 2008).

Las plantas responden y se adaptan a estas condiciones de estrés, manifestando cambios a nivel molecular, que se traducen en cambios a nivel celular, fisiológico y bioquímico (Urano *et al.*, 2010). La adaptación al estrés es mediada a través de cambios profundos en la expresión genética, subyacente a los cambios observables, el cual es un proceso dinámico, dependiente de la intensidad y duración del estrés (Kosová *et al.*, 2011).

La deficiencia de fósforo plantea una grave amenaza para la agricultura, que, normalmente se evita en los países ricos por la extensa aplicación de fertilizantes

de Pi concentrados. Sin embargo, el rendimiento agrícola está severamente limitado por la deficiencia de Pi en regiones del mundo extensas; debido a que presentan suelos pobres y pertenecen a comunidades de escasos recursos económicos (Vance *et al.*, 2003). En cualquier caso, la sustentabilidad de las prácticas empleadas por la agricultura intensiva es muy cuestionable, ya que el abastecimiento actual de fertilizantes industrializados depende en gran medida de recursos no renovables y que están próximos a agotarse (Abelson, 1999; Gilbert, 2009).

El conjunto de características morfológicas, fisiológicas y de adaptaciones bioquímicas para adaptarse a períodos prolongados de deficiencia de Pi se conocen como la respuesta a inanición de fosfato (PSR del inglés *phosphate starving response*). La PSR inicia con la percepción de la deficiencia de Pi, que induce en forma coordinada la expresión de cientos de genes que codifican enzimas, transportadores y otras proteínas que elevan la eficiencia de uso interno de Pi (PUE del inglés *phosphate use efficiency*), al tiempo que intentan elevar la adquisición de Pi externo (Vance *et al.*, 2003; Ticconi & Abel, 2004; Fang *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2010).

La PSR incluye el ajuste del metabolismo para proteger la homeostasis intracelular de Pi, pero además puede inducir el rediseño de la estructura del sistema radicular para acelerar la exploración del suelo. Los mecanismos sensoriales que supervisan la disponibilidad de Pi en el medio ambiente y transmiten la señal para los esfuerzos de rescate de Pi son sólo parcialmente conocidos. Sin embargo, se

ha hecho un progreso importante durante los últimos años que promete revelar más sobre el control de la homeostasis del Pi, en plantas (Ticconi & Abel, 2004).

Una característica común de la PSR de plantas es el desarrollo brotes de color verde oscuro o púrpura debido a la acumulación de antocianinas provocada por el aumento en la expresión y la activación de las enzimas biosintéticas de antocianinas, que resultan inducidas por inanición de fosfato. (Vance *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2009). Las antocianinas son una clase de flavonoides de color rojo/púrpura que pueden proteger los ácidos nucleicos del daño UV y a los cloroplastos del daño fotoinhibitorio (Zeng *et al.*, 2010). En virtud de que el crecimiento se reduce e incluso se detiene bajo la PSR, también se ha propuesto que el consumo de carbono, nitrógeno y energía en estas rutas es requerido para evitar el daño al aparato fotosintético cuando este último es iluminado sin que la energía pueda ser utilizada.

La sobreexpresión de transportadores de Pi de alta afinidad de la membrana plasmática es otro componente importante de la PSR. Estos transportadores realizan transporte activo secundario, dependiente de un flujo de protones primario, impulsado por hidrólisis de ATP. Así, assimilar Pi activamente es posible, a pesar de la enorme diferencia de concentración interna de Pi y la concentración de Pi soluble en la rizósfera, que puede ser de unas 10,000 veces menor que la de las células de la raíz (Plaxton & Tran, 2011).

Otras adaptaciones consisten en la modificación de la rizósfera, mediante la secreción de ácidos orgánicos (malato, citrato y oxalato), que solubiliza Pi de los quelatos inorgánicos que forma con Ca, Fe y Al y que pueden ser abundantes en el suelo. Algunas plantas también solubilizan el Pi mediante la secreción de otros compuestos quelantes, los cuales incluyen la producción de compuestos fenólicos como ácido pídico y alfafurano (Raghothama, 1999; Raghothama & Karthikeyan, 2004). Las plantas mantienen una concentración suficiente y constante de Pi en las células y, cuando existe una situación de suficiencia de Pi, éstas lo almacenan en vacuolas o lo secretan por las raíces (Raghothama & Karthikeyan, 2004).

Un aspecto poco entendido del metabolismo de respuesta a la deficiencia de Pi es la constancia del nivel de pirofosfato en el citoplasma de las células vegetales (Duff *et al.*, 1989; Rychter & Randall, 1994). Por ello, se ha propuesto que las pirofosfatasas inorgánicas solubles (PPiase), responsables de reciclar el PPI producido durante las reacciones biosintéticas, podrían estar implicadas en los mecanismos de adaptación a estrés abiótico (Navarro De la Sancha *et al.*, 2007; Hernández Domíguez *et al.*, 2012).

2.4. El pirofosfato y las pirofosfatasas

El pirofosfato inorgánico (PPI) es un subproducto de una serie de reacciones biosintéticas, incluyendo las reacciones de polimerización involucradas en los

pasos finales de la síntesis de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos (Nelson & Cox, 2009; Jones *et al.*, 2012; Plaxton, 2010).

Un paradigma de la bioenergética celular, derivado de estudios en animales y propuesto por Arthur Kornberg (1962), asume que el enlace anhidro del PPi no puede ser utilizado para llevar a cabo trabajo celular, ya que es inmediatamente hidrolizado por una o más pirofosfatasa inorgánicas solubles (PPiase), muy activas. No obstante, las grandes cantidades de PPi que se producen durante la biosíntesis no siempre se desperdician y la evidencia indica que pueden ser empleadas por varios microorganismos anaerobios (Chi & Kemp, 2000; Thaker *et al.*, 2012) para mejorar la eficiencia energética de múltiples procesos en la célula. El conocimiento de la importancia del PPi en la bioenergética de algunos organismos se entendió mejor a partir de la investigación sobre microorganismos anaerobios pobres en energía, tales como las bacterias *Propionibacterium shermanii* y los protistas parásitos *Entamoeba histolytica* y, aunque la comprensión de los mismos es parcial, mecanismos equivalentes parecen presentarse en las plantas bajo condiciones de estrés que se traducen en déficit energético (Plaxton, 2010).

Una característica muy particular del metabolismo de carbohidratos en plantas es que la vía glucolítica citosólica es una red compleja que contiene reacciones enzimáticas de libramiento, paralelas a las clásicas, a nivel de la conversión de sacarosa (Sweetlove *et al.*, 1996), fructosa-6-fosfato (Clayton *et al.*, 1993), gliceraldehído-3-fosfato (Duff *et al.*, 1989) y fosfoenolpiruvato (PEP; Kondracka &

Rychter, 1997; Le Roux *et al.*, 2006). Cada reacción de libramiento de la glucólisis citosólica elude una reacción glucolítica como la conocemos en células animales. Se trata de reacciones que, en la vía clásica, dependen de ATP o fosfato inorgánico (Pi) como co-sustrato, pero en la reacción alternativa pueden emplear pirofosfato, o generar fosfato inorgánico. Esta flexibilidad metabólica, según ha planteado Plaxton (2010) permite la utilización de pirofosfato inorgánico (PPi) como un donador de energía alternativo, especialmente cuando las pozas de ATP celulares disminuyen debido al estrés causado por la anoxia o la inanición de fosfato (Dancer *et al.*, 1990;. Plaxton, 2010; Igamberdiev & Kleczkowski, 2011). El citosol de las plantas acumula PPi en concentraciones de hasta 0.3 mM (Weiner *et al.*, 1987); que, como se mencionó es notoriamente estable frente a la anoxia o la inanición de Pi (Duff *et al.*, 1989; Rychter & Randall, 1994), pero los mecanismos detrás del estricto control del contenido de PPi en las células vegetales permanecen desconocidos (Farré *et al.*, 2006; Plaxton, 2010).

El anabolismo, y por ende, la tasa de producción de PPi son generalmente activas en condiciones no estresantes; sin embargo, durante las condiciones de estrés como la anoxia o la deficiencia de Pi, el PPi debe producirse con una tasa menor, debido a que el crecimiento se detiene y la biosíntesis se limita a la producción de macromoléculas de subsistencia, esenciales para mantener la homeostasis, reponer los componentes dañados, o substituir a los que así lo requieren (Dancer *et al.*, 1990; Plaxton, 2010).

La tolerancia al estrés abiótico parece depender de una combinación de adaptaciones morfológicas y fisiológicas diversas, pero que son específicas tanto del tejido, como de la especie. Se cree que el uso de reacciones alternas citosólicas dependientes de PPI ayuda a las plantas a sobrevivir este tipo de estrés evitando las reacciones limitadas por ATP al tiempo que conserva un suministro disminuido de ATP celular (Plaxton, 2010).

La hidrólisis del PPI en dos moléculas de Pi es catalizada por las pirofosfatasas inorgánicas [PPiasas EC 3.6.1.1, Fig. B] (Kornberg, 1962; Cooperman, *et al.*, 1992; Stitt, 1998) y esta actividad es esencial para la vida debido a que la remoción del PPI provee un impulso termodinámico a la biosíntesis (Kornberg, 1962; Sivula *et al.*, 1999). Los niveles demasiado elevados de PPI que resultarían de la ausencia de las PPiasas serían tóxicos para la célula, estas enzimas también son esenciales por esta razón (Lundin *et al.*, 1992; George *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1990). En virtud de lo anterior, no resulta sorprendente que el genoma de *A. thaliana* codifique seis genes para PPiasas, de las cuales, una es cloroplástica (Schulze *et al.* 2004; Gutiérrez-Luna *et al.*, 2016).

Las pirofosfatasas inorgánicas son enzimas ubicuas en los seres vivos. La reacción de hidrólisis del PPI es altamente exergónica ($\Delta G^{\circ} = -33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$), lo que compensa los valores de ΔG° cercanos a cero de muchas de las reacciones biosintéticas de pirofosforólisis y, es por ello, como ya se ha mencionado antes, que proporciona la fuerza termodinámica impulsora para muchos procesos anabólicos (Kornberg, 1962).

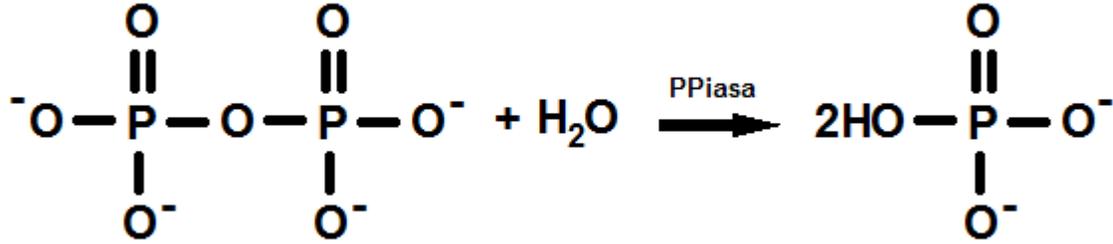


Figura B. Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizada por las difosfato inorgánico fosfohidrolasas (PPiase), E.C: 3.6.1.1

Existen al menos dos grandes superfamilias de pirofosfatasas inorgánicas (PPiases), las PPiases solubles (siPPiases) y las PPiases translocadoras de H⁺ asociadas a membrana (H⁺-PPiases; Rizhong *et al.*, 2009). Las PPiases asociadas a membrana están directamente asociadas a reacciones bioenergéticas, ya que acoplan la hidrólisis de PPI al transporte vectorial de protones. Por otra parte las PPiases solubles se han reconocido por su función de hidrólisis de PPI como subproducto de reacciones biosintéticas dependientes de ATP, facilitando dicha biosíntesis proporcionando un impulso termodinámico (Kornberg, 1962; Baltscheffsky *et al.*, 1999). Sin embargo, se han reportado sistemas vegetales en los que la ausencia de la pirofosfatasa membranales resulta en la inhibición del crecimiento (Ferjani *et al.*, 2011).

Dentro de las pirofosfatasas inorgánicas se han encontrado algunas enzimas membranales que no sólo son capaces de hidrolizar el PPI disipando la energía de su enlace fosfoanhídrido, sino que también son capaces de transformar la energía

química a eléctrica y viceversa (Mansurova, 1989). En las plantas el PPI está involucrado en funciones adicionales (Hajirezaei *et al.*, 1993; Farré *et al.*, 2006; Navarro de la Sancha *et al.*, 2007; Hernández-Domíguez *et al.*, 2012). Por ejemplo, hay evidencia de que estas enzimas también participan en la asimilación de nutrientes minerales (Du Jardin *et al.*, 1995), la germinación (Ferjani *et al.*, 2011) y la partición de fotosintatos entre órganos fuente y demanda (Geigenberger *et al.*, 1996; Farré *et al.*, 2001). Pero la participación de las pirofosfatasa está poco entendida en dichas funciones.

Estudios anteriores utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* han mostrado que el metabolismo del PPI está implicado en la respuesta al estrés en plantas verdes (Plaxton, 2010; Gaxiola *et al.*, 2011) y que las plantas que carecen de alguna isoforma de PPIasa presentan cambios fenotípicos modestos, pero presentan mayor tolerancia a algunos tipos de estrés abiótico (Navarro De la Sancha *et al.*, 2007; De Villafranca Casas, 2010; Hernández Domíguez *et al.*, 2012). Particularmente, las plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* para la pirofosfatasa inorgánica soluble isoforma 4 (AtPPIasa4) presentan mayor tolerancia al estrés salino y a la deficiencia de fósforo (Perales Baños, 2008). Es de hacer notar que esta última isoforma de siPPIasa vegetal fue recientemente localizada en el apoplasto de *Arabidopsis thaliana* (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2016).

En reportes previos, en el estudio de plantas transgénicas de papa con un metabolismo alterado de PPI, se han observado cambios en el crecimiento debidos, probablemente, a cambios en el metabolismo de carbohidratos (Farré *et*

al., 2001; Farré *et al.*, 2006). Es de hacer notar también que en reportes anteriores se ha observado la sobreexpresión a nivel de transcrito y de proteína de la AtPPa4 en respuesta a deficiencia de fósforo en raíces de arabidopsis, lo que sugiere su importancia en la adaptación a este tipo de estrés (Lan, *et al.*, 2012; Hoehenwarter *et al.*, 2016).

2.5. La proteómica como abordaje de la respuesta de organismos a condiciones de estrés

Los perfiles transcriptómicos, que miden los niveles de RNA mensajero (mRNA) que expresa un organismo en una condición particular, son técnicas ampliamente usadas que permiten la identificación de genes que responden a estrés y esto ha contribuido a comprender mejor las respuestas al estrés en especies como arabidopsis (Krebs *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Jiang & Deyholos, 2006). No obstante tienen una limitación importante, pues los niveles de mRNA suelen tener una pobre correlación con los niveles de las proteínas para las que codifican, debido en gran medida al control traduccional y a las modificaciones postraduccionales (Gygi *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2004; Mooney *et al.*, 2006).

Las proteínas intervienen virtualmente en todos los procesos celulares y ejercen una diversidad muy amplia de funciones; se hallan en todas las células y en todas las partes de la célula. Las proteínas también se presentan en gran variedad, ya

que en una sola célula puede haber miles de proteínas diferentes; puede decirse que las proteínas son los productos finales de la expresión genética de un organismo (Nelson & Cox, 2009).

Todas las proteínas son heteropolímeros contruidos a partir de un mismo conjunto de 20 aminoácidos unidos mediante enlace peptídico y cada una se distingue por su secuencia característica. Los aminoácidos poseen una estructura básica constante, pero poseen una cadena lateral que determina sus propiedades químicas particulares. Así, gracias a su diversidad de secuencias, las proteínas se presentan en gran variedad de tamaños, desde péptidos pequeños compuestos de algunos residuos de aminoácidos hasta polímeros muy grandes de masas moleculares del orden de millones (Nelson & Cox, 2009).

El conjunto de proteínas que es expresado por un genoma se denomina proteoma, término que hizo su aparición en la literatura científica en 1995; este concepto rápidamente dio origen a un nuevo campo de investigación llamado proteómica. El problema que trata la proteómica puede resumirse a grandes rasgos en que cada genoma contiene miles de genes que codifican proteínas, cuyas estructuras y funciones se pretenden conocer, pero para entender dichas funciones, es necesario determinar las propiedades y funciones de las proteínas para las que codifican dichos genes, lo cual está estrechamente ligado a los patrones de transcripción y traducción de los genes en cada linaje celular, bajo cada condición y momento de desarrollo distinto de un organismo. Así, la proteómica busca determinar los patrones de expresión, distribución y modificaciones de las

proteínas de un organismo vivo, bajo una o más condiciones definidas (Nelson & Cox, 2009).

La adaptación de las plantas al estrés está asociada a cambios importantes en su proteoma, por lo que, dado que las proteínas están directamente involucradas en la respuesta a estrés de plantas, los estudios proteómicos pueden describir las relaciones entre la abundancia de proteínas y contribuir a documentar el ajuste adaptativo que se asocia a la adaptación al estrés de la planta (Kosová *et al.*, 2011). Como fin último, este conocimiento puede resultar en información valiosa para entender los mecanismos de adaptación o tolerancia al estrés en cuestión, por parte de la planta.

En general, la función que desempeñan las proteínas puede describirse a tres niveles (Nelson & Cox, 2009):

- La función fenotípica describe los efectos de una proteína sobre un organismo completo; por ejemplo la pérdida o disminución en la expresión de una proteína puede ocasionar un crecimiento retardado del organismo, una alteración del desarrollo y/o la fisiología, o incluso la muerte del mismo.
- La función celular es una descripción de las interacciones y acciones de la proteína en el contexto celular; las interacciones con otras proteínas dentro de la célula ayudan a definir los tipos de procesos metabólicos en los que participa la proteína en cuestión.

- La función molecular se refiere a la actividad bioquímica específica de la proteína, por ejemplo las reacciones catalizadas por una enzima, o los ligandos que se son reconocidos por un receptor, entre otros aspectos.

El conocimiento sobre la estructura y función de las proteínas se construye con el estudio de muchas proteínas individuales, para estudiar a una proteína en detalle es necesario, inicialmente, el separarla del resto de las proteínas en la mezcla y disponer de técnicas que permitan determinar sus propiedades (Nelson & Cox, 2009).

En el caso de la proteómica, el nivel más básico de descripción consiste en la identificación de los cambios en el contenido de proteínas individuales que se asocian a una condición fisiológica de interés. Casi siempre, dichos cambios se analizan en referencia a una condición control, que se considera óptima o normal para el organismo en estudio. Por ello, se debe contar con técnicas que permitan separar, cuantificar e identificar las distintas proteínas del tejido o fluido biológico que se desea estudiar.

Una técnica importante y muy poderosa para la separación de proteínas se basa en el desplazamiento de las moléculas cargadas (iones) en un campo eléctrico y se denomina electroforesis. La electroforesis no es utilizada por lo general para purificar proteínas en grandes cantidades (técnicas preparativas) dado que existen otros métodos más efectivos y debido a que los métodos electroforéticos

frecuentemente alteran la estructura y la función de las proteínas, pues los más resolutivos requieren condiciones desnaturalizantes. No obstante, la electroforesis es muy útil como método analítico, ya que tiene la ventaja de que las proteínas pueden visualizarse además de separarse, lo que permite hacer una estimación rápida del número de proteínas en una mezcla compleja. Empleando métodos de tinción apropiados, la intensidad de la tinción es cuantitativa. Además, la electroforesis puede realizarse en condiciones que permiten la determinación de propiedades fundamentales, tales como su punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada (O'Farrell, 1975; Nelson & Cox, 2009).

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles de poliacrilamida, los cuales actúan como un tamiz molecular retrasando la migración de proteínas de forma proporcional a su relación carga/masa; la migración de las proteínas también se ve afectada por su forma. Un método electroforético originalmente descrito por Laemmli (1970) comúnmente utilizado emplea el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual se une a la mayoría de las proteínas de forma aproximadamente proporcional a la masa molecular de las mismas (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos). El SDS enmascara las cargas de los aminoácidos de las proteínas y les confiere un cociente carga/masa muy similar, además altera la estructura nativa de las proteínas, de modo que durante la electroforesis en presencia de éste detergente, se separa las proteínas en función de su masa (Nelson & Cox, 2009).

El enfoque isoelectrico (IEF) consiste en la separación de proteínas en presencia de un campo eléctrico y a través de un gradiente de pH inmovilizado en gel, las proteínas se desplazan hasta que alcanzan el pH igual a su punto isoelectrico (pI), así proteínas con pI diferentes se distribuyen a lo largo del gel (Bjellqvist *et al.*, 1982; Nelson & Cox, 2009).

La combinación en secuencia de enfoque isoelectrico y electroforesis en SDS es un proceso llamado electroforesis bidimensional (2D-E), que permite la resolución de mezclas complejas de proteínas. Este es un método analítico más sensible que cualquier método electroforético unidimensional (O'Farrell, 1975). La electroforesis bidimensional separa proteínas de idéntica masa molecular que difieren en su pI y también a aquellas con pI semejante, pero con masa molecular distinta.

La proteómica de expresión diferencial se basa en la comparación de la composición de diferentes proteomas, por ejemplo, en el campo de la investigación de las plantas al estrés abiótico el caso más común es la comparación de proteomas aislados de plantas no estresadas (control) y los proteomas de plantas bajo condiciones de estrés. Los estudios dirigidos a la comparación de diversos proteomas están dominados principalmente por la electroforesis bidimensional seguida por la identificación de proteínas mediante análisis por espectrometría de masas (Kosová *et al.*, 2011). Adicionalmente, la aparición o no aparición de las manchas de una proteína determinada en muestras de diferentes tejidos, de tejidos similares en diferentes etapas del desarrollo, o de

tejidos tratados de manera que simulen diversas situaciones biológicas puede ayudar a inferir su función celular (Nelson & Cox, 2009).

La espectrometría de masas (MS) proporciona una gran cantidad de información para la investigación en proteómica; estas técnicas requieren de cantidades muy pequeñas de muestra, de forma que pueden aplicarse fácilmente a las pequeñas cantidades de proteína que pueden extraerse de un gel electroforético bidimensional. La determinación precisa de la masa molecular de una proteína es uno de los parámetros críticos para su identificación, una vez que se conoce con precisión la masa de una proteína, la MS es un método conveniente y preciso para detectar cambios de masa debidos a la presencia de cofactores unidos, iones metálicos unidos, modificaciones covalentes, etc. (Nelson & Cox, 2009). Además, mediante la digestión de la proteína con proteasas específicas, es posible obtener una huella dactilar de cada proteína que permite su identificación rápida, haciendo de la MS la técnica de elección para la identificación de los polipéptidos presentes en una mancha recuperada de un gel electroforético.

3. Hipótesis

La respuesta a deficiencia de fósforo en *A. thaliana* se encontrará alterada por efecto de la expresión diferencial de la AtPPa4, dichos cambios se verán reflejados en su proteoma y revelarán componentes de las vías metabólicas que se ven afectadas por la expresión de esta enzima.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Analizar la respuesta de las plantas a estrés por deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana* silvestre y sus mutantes alteradas en la expresión de la isoforma 4 de la pirofosfatasa inorgánica soluble (sobreexpresora y subexpresora), y determinar si los componentes de otras vías metabólicas, como el metabolismo de carbohidratos, se ven afectados.

4.2. Objetivos particulares

- Establecer condiciones adecuadas para el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes crecidas en condiciones control y bajo deficiencia de fósforo.
- Obtener los perfiles proteómicos de las distintas líneas de *A. thaliana*, y determinar aquellas proteínas que modifiquen su expresión.
- Analizar los resultados en relación con el posible papel de las pirofosfatasas inorgánicas solubles y, en particular, de la isoforma 4 durante la adaptación a la deficiencia de fósforo en *A. thaliana*.

5. Materiales y Métodos

5.1. Material biológico

Las semillas de la planta mutante de baja expresión fueron obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Center localizado en la Universidad de Ohio en EUA. Las semillas de la planta transgénica expresora de la proteína de fusión AtPPa4-CFP bajo el control del promotor 35S, fueron generadas en el laboratorio 115 del conjunto “E” de la Facultad de Química. Se almacenaron maduras y secas en refrigeración en contenedores de baja humedad.

5.2. Materiales y equipo de laboratorio

Vidriería y material de plástico común para laboratorio.

PROTEAN® IEF cell de Bio-Rad®.

PROTEAN® II xi cell de Bio-Rad®.

Cámara Hoefer miniVE de Pharmacia Biotech®.

ChemiDoc™ MP Imaging System con Image Lab™ Software de Bio-Rad®.

UV/White Light Conversion Screen de Bio-Rad®.

Centrífuga Sorvall ST16R de Thermo Scientific®.

Espectrofotómetro Epoch de BioTek®.

5.3. Reactivos y sustratos

Aceite mineral grado biotecnología: Bio-Rad®.

Agar Plant TC: PhytoTechnology Laboratories®.

Agarosa grado biología molecular: Bio-Rad®.

Anfolitas acarreadoras para IEF (100X Bio-Lyte 3-10 Ampholyte de Bio-Rad®).

Azul de Coomasie G-250: Bio-Rad®.

Coctel inhibidor de proteasas: COMPLETE®.

IPG pH 4-7 de 17 cm ReadyStrip™ de Bio-Rad®.

IPG pH 5-8 de 7 cm ReadyStrip™ de Bio-Rad®.

Medio basal de sales Murashige & Skoog: PhytoTechnology Laboratories®.

Medio basal de sales modificado Murashige & Skoog: PhytoTechnology Laboratories®.

El resto de los reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de los siguientes proveedores: Sigma (St. Louis, MO. EUA), Roche (Hvi Dovre, Dinamarca), Merck (Darmstadt, Alemania).

5.4. Amortiguadores y disoluciones

Ácido tricloroacético acuoso al 20% m/v.

Coomasie Blue Silver: 0.12% m/v Azul de Coomasie G-250, 10% m/v NH_2SO_4 , 10% m/v H_3PO_4 , 20% v/v Metanol.

Amortiguador de extracción: 0.1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl_2 , pH 7.5.

Amortiguador de rehidratación para IPG: 7 M Urea, 2 M Tiourea, 2% m/v CHAPS.

Amortiguador de equilibrio: 6 M Urea, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 2% m/v SDS, 20% v/v Glicerol.

Amortiguador de corrida 10x: Tris base 30.3 g, Glicina 144 g, SDS 10 g.

Amortiguador separador 4x: Tris base 118.5 g, llevar a 1L con agua desionizada, pH 8.8.

Disolución de fijación: 30% v/v Metanol, 10% v/v Ácido acético.

Disolución de lavado: 10% v/v Hipoclorito de sodio, 0.1% v/v Triton X-100.

5.5. Germinación de las semillas y crecimiento de plantas

Se cultivaron plantas de la mutante de baja expresión para AtPPa4, plantas transgénicas que expresan la proteína de fusión AtPPa4-CFP, bajo el control del promotor 35S y plantas silvestres (WT) de *Arabidopsis thaliana*, para lo cual, se siguieron los siguiente pasos:

1. Desinfección de semillas en disolución de lavado por 5 min, múltiples enjuagues con agua destilada, desionizada y estéril.
2. Siembra en medio de cultivo Murashige & Skoog (M&S) a concentración 0.5x adicionado con 2% de sacarosa.
3. Estratificación de las semillas: por 48 h a 4 °C en oscuridad seguido de exposición a la luz por 5 h y posterior almacenamiento en oscuridad por 48 h a 21 °C.
4. Se realizó la selección previa de las mutantes durante la germinación y los primeros 5 días de crecimiento en medio M&S 0.5x con herbicida BASTA®

- (Glufosinato de amonio), transfiriendo a M&S 0.5x regular para completar el crecimiento, sólo aquellas plantas que no mostraron síntomas de marchitez.
5. Las semillas se sometieron a un periodo de crecimiento de 17 días con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 21 °C.
 6. Al término del periodo de crecimiento, se sometió a las plantas a condiciones control (C) en medio M&S 0.5x y condiciones de deficiencia de fósforo (-P) en medio M&S 0.5x modificado durante 9 días con un fotoperiodo idéntico al de crecimiento.

5.6. Extracción de proteína total para 2D-SDSPAGE

1. Al finalizar el periodo de estrés se dividieron las muestras en dos fracciones: roseta (parte aérea) y raíz.
2. Se extrajo proteína total por congelación con nitrógeno líquido, se trituraron las fracciones hasta formación de polvo fino.
3. Se realizó la suspensión en amortiguador de extracción con 1 tableta de coctel inhibidor de proteasas COMPLETE® por cada 50 mL; se añadieron aproximadamente 10 mL de amortiguador por cada 1 g de tejido.
4. Se eliminó el tejido por centrifugación a 12,000 G por 10 min, y se recuperó el sobrenadante.
5. Se precipitó la proteína mezclando el extracto crudo con ácido tricloroacético al 20% (m/v), proporción 1:1 (v/v) y se dejó reposar por 1h en baño de hielo.
6. El precipitado se centrifugó a 15000 G por 15 min.

7. Se realizaron 2 lavados con 1.5 mL de acetona por muestra seguido de una posterior centrifugación a 13000 G por 15 min.
8. El precipitado se recuperó y secó con N₂ gas.
9. El precipitado se resuspendió en amortiguador de rehidratación para IPG, alrededor de 200 µL para precipitados de proteína de roseta y 100 µL para precipitados de proteína de raíz.
10. Se realizó la cuantificación de proteína por el método Bradford usando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) de 0 a 4.8 µg.

5.7. Elaboración de geles 2D-SDSPAGE

Se realizó la estandarización para la elaboración de geles 2D usando geles SDS-PAGE 1D como controles de carga con 10 µg de proteína en equivalentes de BSA de cada muestra.

1. Rehidratación pasiva de las IPG: Se añadieron 300 µg de proteína de roseta en tiras de pH 4-7 de 17 cm o 25 µg de las muestras de raíz en tiras de pH 5-8 de 7 cm, en amortiguador de rehidratación, suplementado con 2.5%(m/v) DTT, 1%(v/v) de anfolitas y 0.002%(m/v) de azul de bromofenol.
2. Isoelectroenfoque (IEF) de las muestras: Se realizó en un equipo PROTEAN® IEF cell de Bio-Rad® siguiendo los protocolos descritos en las tablas 1 y 2 para las tiras de 17 y 7 cm respectivamente:

Tabla 1. Programa de IEF tiras 17 cm pH 4-7 tiempo de corrida total 18 h.

Paso	Voltaje	Vh
1	500V	500
2	1000V	1000
3	10000V	18500
4	10000V	29500
5	500V	500
6	1000V	1000
7	10000V	18500
8	10000V	29500
9	500V	∞

Tabla 2. Programa de IEF tiras 7 cm pH 5-8 tiempo de corrida total 5 h.

Paso	Voltaje	h:min
1	300v	00:30
2	1000v	00:30
3	5000v	01:20
4	300v	00:30
5	1000v	00:30
6	5000v	01:20
7	500v	∞

3. Equilibrio de las tiras IPG en dos pasos con amortiguador de equilibrio adicionado de 1% DTT para el paso de reducción a 15 min y 2.5% yodoacetamida para el paso de alquilación durante 15 min.
4. Segunda dimensión: Se realizó en geles de poliacrilamida al 11% (m/v) de 20x20 cm para las tiras pH 4-7 (muestras de roseta) y 10x10 cm para las tiras pH 5-8 (muestras de raíz), para la elaboración de los geles se empleó un sistema vertical.
5. Se efectuó corrida a 70v 21h para los geles 20x20 y 200v 2h para los geles 10x10; utilizando los equipos PROTEAN® II xi cell de Bio-Rad® y Hoefer

miniVE de Pharmacia Biotech® para electroforesis vertical.

6. Los geles obtenidos se sometieron a fijación durante ~12h en disolución de fijación y posteriormente se realizó la tinción con *blue silver* de acuerdo al protocolo de Candiano *et al.* (2004).

5.8. Documentación de imágenes, comparación de patrones e identificación

Se obtuvieron las imágenes digitalizadas de los patrones resueltos en 2D-SDSPAGE con el equipo *ChemiDoc™* y se procesaron con el software *Image Lab™* de BioRad, usando un filtro UV/luz blanca.

Se compararon los patrones obtenidos manipulando las imágenes digitalizadas mediante el uso del software *PDQuest 2-D v8.0* de Bio-Rad®, se realizó el análisis estadístico de los cambios en la expresión medida como densidad óptica relativa con una confiabilidad del 95% usando t de Student; los spots detectados por el software de forma automática fueron revisados por inspección visual, de manera individual.

Se procedió a cortar del gel las manchas diferencialmente expresadas para la identificación de las proteínas correspondientes mediante espectrometría de masas previa digestión en gel con tripsina.

6. Resultados

Con el fin de obtener información sobre el papel de la pirofosfatasa 4 (AtPPa4) en la respuesta de las plantas de *Arabidopsis thaliana* al estrés por deficiencia de fósforo, se comparó el comportamiento de tres diferentes líneas de esta planta bajo condiciones de inanición de fósforo: (i) la línea silvestre Col-0 (**WT**), (ii) una línea portando una inserción de tDNA en el gen que codifica para la AtPPa4 (*atppa4^{tDNA}*) y que posee muy baja expresión de este transcrito (Perales Baños 2008) y (iii) una línea transgénica que expresa, además del gen codificante de AtPPa4 endógeno, una construcción que codifica para la proteína AtPPa4 fusionada a CFP y bajo el control del promotor constitutivo CMV35s (*ATPPA4CFP^{35::S}*). La línea *atppa4^{tDNA}* resulta infértil después de la generación F1, por lo que las semillas empleadas pertenecen a esta generación, mientras que la transgénica fue seleccionada hasta la generación F4, que se considera estable. Sin embargo, el nivel de expresión del transgen en esta línea no fue particularmente alto, por lo que la actividad de pirofosfatasa extraíble tiene sólo cambios modestos (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2016).

En el crecimiento bajo condiciones control, las plantas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* presentaron crecimiento disminuido con respecto a la **WT** (Fig. 1). Además, las plantas *ATPPA4CFP^{35::S}* presentaron un sistema radicular muy pobremente desarrollado con respecto a **WT** y *atppa4^{tDNA}* (Fig. 2).



Figura 1. Apariencia fenotípica de la parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* (A) silvestres **WT**, (B) la mutante *atppa4*^{IDNA} y (C) la transgénica *ATPPA4CFP*^{35::S} creciendo bajo condiciones control. Las plantas fueron crecidas como se describe en métodos durante 4 semanas y se fotografiaron enfocando la parte aérea.

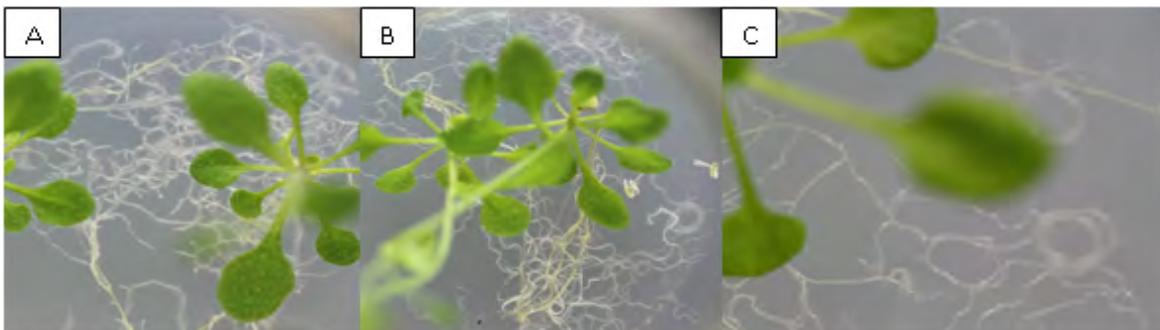


Figura 2. Apariencia fenotípica de la raíz de plantas de *Arabidopsis thaliana* (A) silvestres **WT**, (B) la mutante *atppa4*^{IDNA} y (C) la transgénica *ATPPA4CFP*^{35::S} creciendo bajo condiciones control. Las plantas fueron crecidas como se describe en métodos durante 4 semanas y se fotografiaron enfocando la raíz.

Cuando las plantas fueron sometidas a tratamiento de inanición de fósforo, las hojas de las plantas **WT** y *ATPPA4GFP*^{35::S} se observaron cualitativamente más afectadas que las hojas de las plantas *atppa4*^{IDNA}, en las dos anteriormente mencionadas, se observó mayor presencia de brotes color púrpura o verde oscuro, lo que es característico de la acumulación de antocianinas (Fig. 3). Además, se observó la aparición de raíces secundarias y un aumento en la

profusión y penetrancia del sistema radicular (Fig.4).



Figura 3. Apariencia fenotípica de la parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* (A) silvestres **WT**, (B) la mutante *atppa4^{tDNA}* y (C) la transgénica *ATPPA4CFP^{35::S}* creciendo bajo condiciones de estrés por deficiencia de fósforo. Las plantas fueron crecidas como se describe en métodos durante 4 semanas y se fotografiaron enfocando la parte aérea.



Figura 4. Apariencia fenotípica de la raíz de plantas de *Arabidopsis thaliana* (A) silvestres **WT**, (B) la mutante *atppa4^{tDNA}* y (C) la transgénica *ATPPA4CFP^{35::S}* creciendo bajo condiciones de estrés por deficiencia de fósforo. Las plantas fueron crecidas como se describe en métodos durante 4 semanas y se fotografiaron enfocando la raíz.

En particular, las plantas *ATPPA4CFP^{35::S}* presentaron un crecimiento muy retardado respecto a **WT** y *atppa4^{tDNA}*, siendo el peso fresco de la fracción aérea alrededor de 3 veces inferior a de las plantas **WT**. Por su parte, el tamaño de la

fracción radicular para *ATPPA4CFP^{35::S}* fue cualitativamente mucho menor y su peso fresco alrededor de 6 veces menor con respecto a **WT** (Fig. 5).

Bajo condiciones de inanición de fósforo, se observó una disminución de tamaño de la fracción aérea y un aumento en la profusión y penetrancia de la fracción radicular para todos los casos, lo cual se refleja además en una reducción del peso fresco en hoja y un aumento en peso fresco en raíz (Fig. 5). Resulta interesante que el peso fresco de la **WT** fue mayor al de la mutante *atppa4^{tDNA}* y al de la transgénica *ATPPA4CFP^{35::S}* aun bajo condiciones control, en inanición de fósforo las plantas *atppa4^{tDNA}* mostraron un tamaño inferior a **WT** pero se encontraron menos afectadas, en cambio, la transgénica *ATPPA4CFP^{35::S}* mostró un crecimiento muy pobre en esta condición. Debe mencionarse que este mismo comportamiento no fue observado para plantas transgénicas que expresan sólo a GFP (no se muestra).

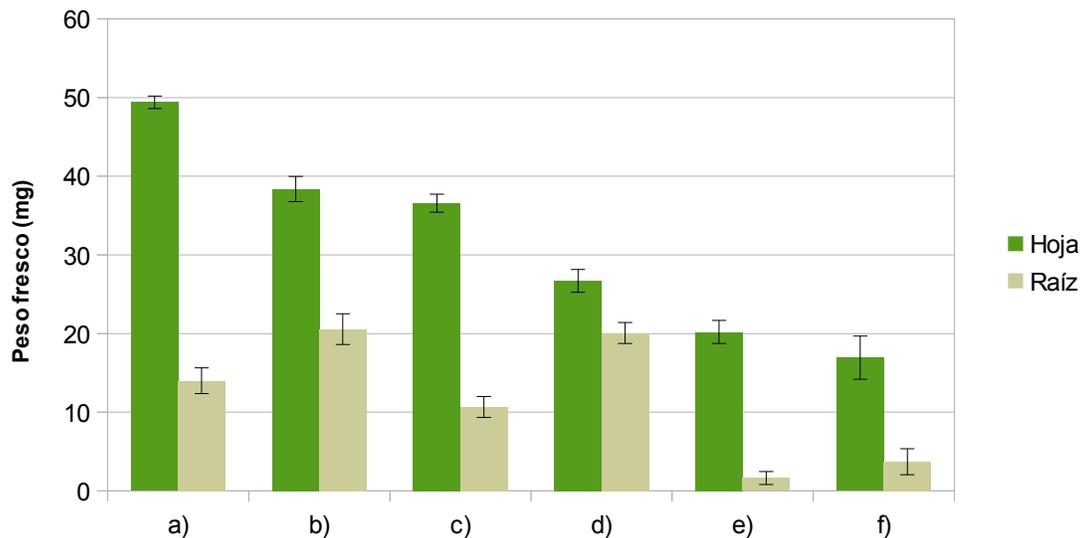


Figura 5. Peso fresco en mg de las hojas y de las raíces promedio por planta: a) WT C; b) WT -P; c) *atppa4^{tDNA}* C; d) *atppa4^{tDNA}* -P; e) *ATPPA4CFP^{35::S}* C; y f) *ATPPA4CFP^{35::S}* -P. En condiciones control (C) y de estrés por deficiencia de fósforo (-P).

En las figuras 6 y 7 se muestran fotografías representativas de la separación en 2D SDS-PAGE de las proteínas solubles totales recuperadas de hoja y raíz respectivamente. Cada gel se realizó por triplicado a partir de muestras biológicas independientes. Los patrones obtenidos en raíz muestran como principal diferencia, respecto a los patrones de hoja, la ausencia de la banda saturada de proteína en alto peso molecular; la probable identidad de dichas proteínas fue inferida como RuBisCO debido a su abundancia (Hasta 50% de la proteína total), la cual fue confirmada mediante la identificación por espectrometría de masas (Ver

tabla 4). Además, se observan diversas manchas que corresponden a proteínas de baja abundancia, mismas que fue posible observar como efecto de fraccionamiento de las muestras.

Dichos geles fueron analizados con el software *PDQuest 2D* de *Biorad* (ver métodos) y aquellas manchas con alta reproducibilidad y que mostraron cambios estadísticamente significativos entre tratamientos (t de Student a 95% de confiabilidad) se seleccionaron para incluirlas en las tablas 3 y 5. (ordenados siguiendo el sistema *Standard spot* o SSP). Todos los volúmenes (integral del área x intensidad) fueron normalizadas con respecto a la muestra **WT** en condiciones control.

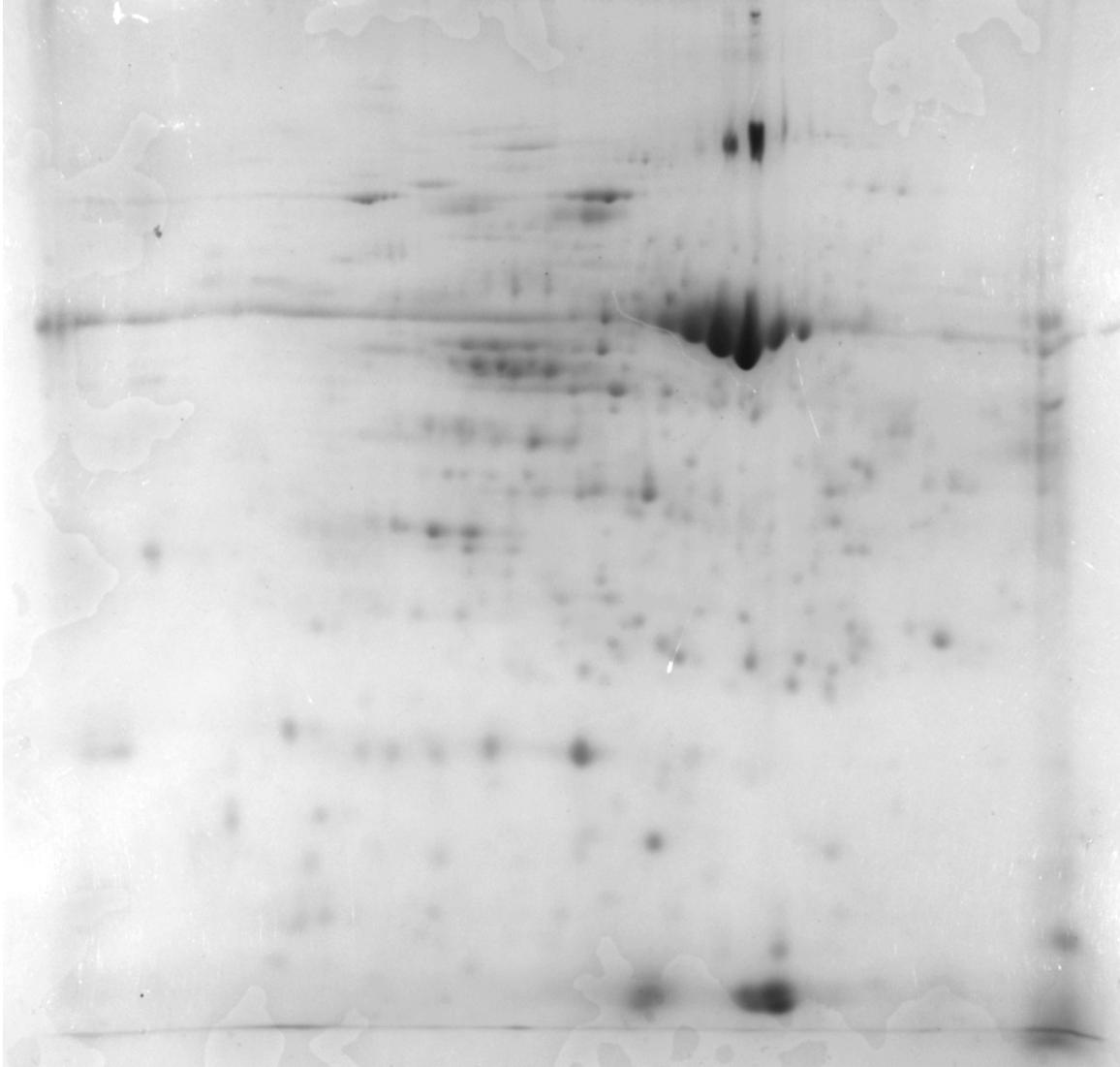


Figura 6. 2D SDS-PAGE pH 4-7 300 μ g de proteína en IPG de 17 cm representativo de hoja.

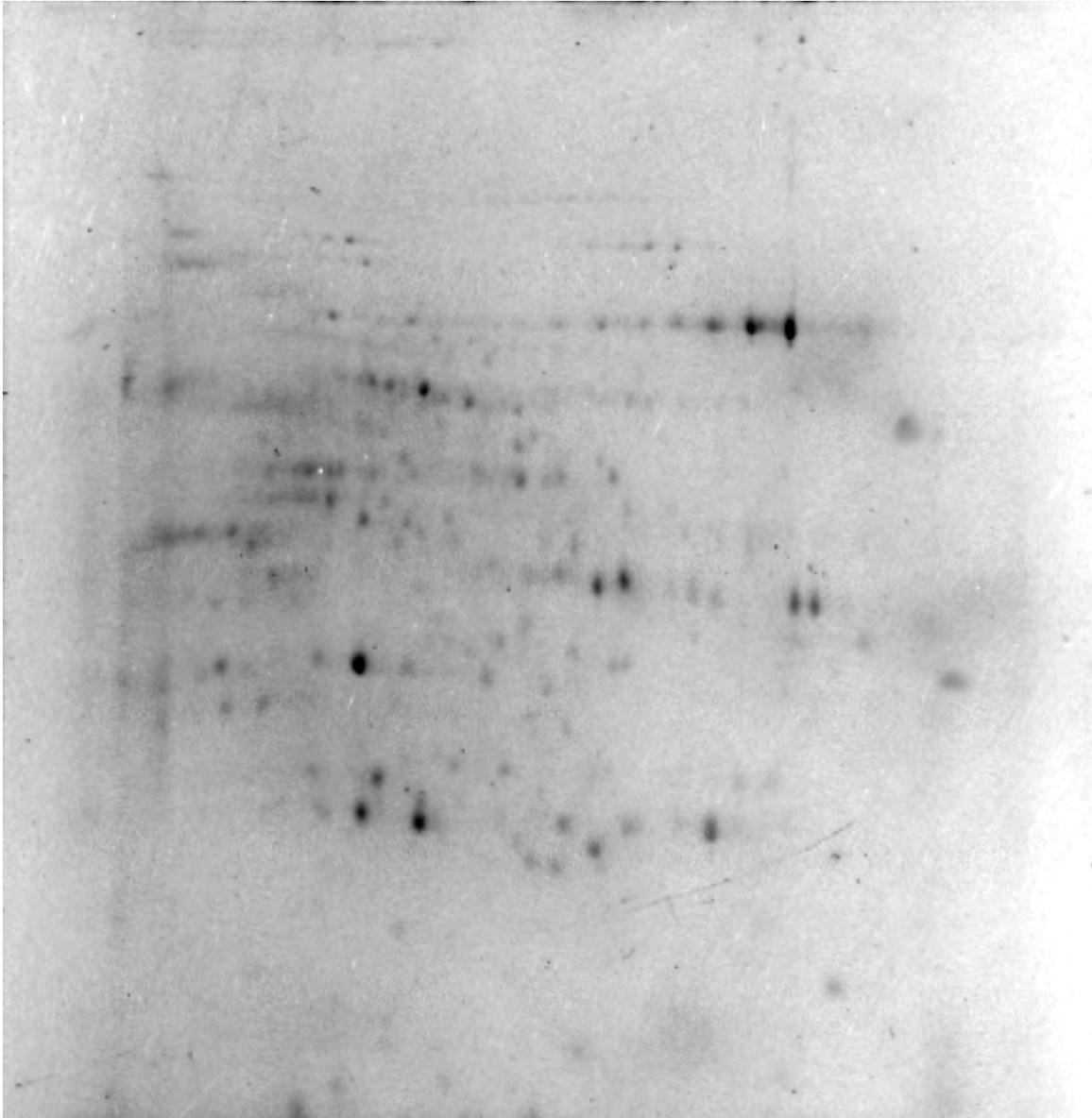


Figura 7. 2D SDS-PAGE pH 5-8 25 μ g de proteína en IPG de 7 cm representativo de raíz.

En la tabla 3 (a y b) se muestran los cambios en abundancia relativa de proteínas de la hoja comparando los tratamientos contra **WT** en condiciones control, en rojo se resaltan disminuciones bajo un factor de 0.5 y en verde aumentos sobre un factor de 2, en blanco señalados los cambios no significativos.

Tabla 3(a). Abundancia relativa de proteína de la hoja en geles 2D, para las plantas **WT**, *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP35::S* en condiciones control (C) y bajo estrés por deficiencia de fósforo (-P), valores con respecto a **WT C** (valor arbitrario de 1). En rojo se resaltan disminuciones bajo un factor de 0.5 y en verde los incrementos sobre un factor de 2. En blanco los valores que no mostraron diferencias significativas.

SSP	WT -P	<i>atppa4tDNA</i> C	<i>atppa4tDNA</i> -P	<i>ATPPA4CFP35::S</i> C	<i>ATPPA4CFP35::S</i> -P
1301	1.74	1.77	2.79	2.84	2.66
3201*	3.29	2.95	2.48	2.59	3.21
3302	2.01	2.29	1.56	2.08	1.41
5206	1.69	1.29	1.37	1.42	2.12
5601	2.77	0.63	2.25	0.74	1.6
6101	1.47	0.87	0.9	3.3	2.37
6501	0.57	0.99	1.97	2.07	3.42
6602	1.48	1.83	0.93	0.81	2.01
<u>103</u>	0.61	1.32	0.23	0.92	0.42
202	0.71	1.22	0.45	0.77	0.69
1804	0.9	0.7	0.82	0.35	0.79
2301	0.98	0.45	1.08	0.55	0.66
<u>2803</u>	0.74	0.92	0.68	1.26	0.38
<u>3203</u>	0.43	0.92	0.54	0.98	0.74
3204	0.98	0.7	0.46	0.42	0.97
<u>3301</u>	0.57	1.08	0.49	0.96	0.29
<u>3402</u>	0.4	0.6	0.37	1.14	0.18
3801	0.92	0.85	0.98	0.69	0.35
<u>4002</u>	0.45	0.72	0.55	0.99	0.46
<u>4402</u>	0.46	0.78	0.47	0.93	0.49
5602	1.52	0.74	1.05	0.46	1.18
<u>6903</u>	0.63	1.78	1.23	0.39	0.23
9101	0.2	0.43	1.42	0.61	1.09
306	0.55	1.24	1.44	0.95	0.85
1201	1.33	0.97	0.99	1.06	1.56
1302	0.88	0.74	0.76	0.76	0.66
2101	1.35	1.01	1.37	1.21	1.48
2302	1.19	0.62	1.25	1.01	0.8
2401	1.15	1.1	0.93	0.97	1.01
2701	0.8	0.53	0.57	0.6	0.63
3101	1.02	1.34	1.04	1.43	1.33

Número Standard Spot (SSP), señalado con (*) las proteínas sobreexpresadas en todos los tratamientos. En negritas las proteínas que incrementaron en deficiencia de fósforo, y subrayadas las proteínas que disminuyeron en deficiencia de fósforo.

Tabla 3(b). Abundancia relativa de proteína de la hoja en geles 2D, para las plantas **WT**, *atppa4^{IDNA}* y *ATPPA4CFP35^{::S}* en condiciones control (C) y bajo estrés por deficiencia de fósforo (-P), valores con respecto a **WT C** (valor arbitrario de 1). En blanco los valores que no mostraron diferencias significativas.

SSP	WT -P	atppa4tDNA C	atppa4tDNA -P	ATPPA4CFP35::S C	ATPPA4CFP35::S -P
<u>3202</u>	0.91	1.33	0.78	1.75	1.51
3401	1.26	0.54	1.62	1.42	1.45
3502	0.79	1.06	0.84	0.85	1.05
3701	0.9	0.85	0.84	1.52	0.87
3802	0.98	0.82	0.9	0.71	0.86
3803	0.94	0.92	1.18	0.8	1.12
4101	0.77	0.81	0.79	1.37	1
4201	1.19	0.89	0.73	1.26	1.27
4302	1.09	1.21	0.94	0.88	0.98
<u>4303</u>	0.74	0.7	0.51	0.81	0.7
4801	1.34	0.99	1.34	1.23	0.53
4802	1.15	0.86	0.72	1.25	0.86
4803	0.68	0.86	0.88	1.25	0.88
5203	1.47	0.63	1.82	1.69	1.86
5301	0.77	0.86	0.93	1.03	1.16
5402	0.55	0.85	1.18	1.2	0.86
5603	1.09	1.57	1.62	1.05	0.95
5703	1.01	0.87	1.29	1.26	1.03
6002	1.15	0.54	0.69	1.06	1.15
6102	1.04	1.04	0.74	0.85	0.95
6202	0.62	0.75	0.72	1.68	1.05
6204	0.75	0.93	0.8	1.14	1.2
6403	0.86	1.18	1.19	0.85	1.73
6601	0.61	0.75	1.29	0.87	0.95
7203	1	1.23	0.86	0.74	0.75
<u>7301</u>	0.88	1.13	0.89	1.39	0.7
7302	1.35	0.85	0.92	1.02	1.12
7303	0.67	1.08	0.99	1.41	0.71
7801	0.55	0.92	0.99	1.28	0.83
8202	0.64	1.14	1.27	1.42	0.72
<u>8801</u>	0.77	1.34	0.82	0.92	0.57

Número Standard Spot (SSP), señalado con (*) las proteínas sobreexpresadas en todos los tratamientos. En negritas las proteínas que incrementaron en deficiencia de fósforo, y subrayadas las proteínas que disminuyeron en deficiencia de fósforo.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la identificación por MS de algunas de las proteínas seleccionadas a partir de los geles 2D de hoja, se obtuvieron altos valores de cobertura para la secuencia de las proteínas identificadas. Algunas de las proteínas identificadas por comparación de los péptidos contra bases de datos arrojaron como probable especie a *Arabidopsis lyrata*, esto puede deberse a la cercanía de esta especie con *Arabidopsis thaliana*. La identificación de la misma proteína en distintas manchas puede atribuirse a la presencia de isoformas, a la degradación proteolítica o a la migración de proteínas asociadas.

Tabla 4. Identificación de proteínas recuperadas de geles 2D de hoja. En color verde las proteínas que mostraron aumento sobre un factor de 2 y en rojo aquellas que disminuyeron bajo 0.5 con respecto a **WT C**; En blanco los valores que no mostraron diferencias significativas (Ver tabla 3). Los recuadros coloreados muestran los tratamientos a) **WT -P**; b) *atppa4^{tDNA} C*; c) *atppa4^{tDNA} -P*; d) *ATPPA4CFP^{35::S} C*; y e) *ATPPA4CFP^{35::S} -P*.

SSP	Identidad	a	b	c	d	e	PM (Da)	pI (pH)	Cobertura (%)
6501	RuBisCO large chain Fragment (<i>A. thaliana</i>)						51833	6.02	55.86
1301	Oxygen evolving enhancer 33 (<i>A. thaliana</i>)						35142	5	46.70
3201*	Cpn21 protein chloroplastic (<i>A. thaliana</i>) (Precursor)						26801	9.45	45.10
4002	RuBisCO, small subunit 3B (<i>A. thaliana</i>)						20284	8.22	64.10
9101	PSII Q (<i>A. thaliana</i>)						24628	10.08	45.65
1302	Oxygen evolving enhancer 33 (<i>A. lyrata</i>)						35076	5.34	52.11
2101	Oxygen evolving enhancer protein 2 (<i>A. lyrata</i>)						28121	7.22	58.17
3101	Oxygen evolving enhancer protein 2 (Isoform, <i>A. thaliana</i>)						23744	8.42	65.75
2302	Photosystem II subunit O 2 (<i>A. lyrata</i>)						35094	5.81	47.43
2401	PRK (<i>A. thaliana</i>)						44435	5.63	55.19
3401	PRK (<i>A. thaliana</i>)						44435	5.63	55.19
6002	RuBisCO small chain 1A Fragment (<i>A. thaliana</i>)						4553	8.25	85.00
6102	Carbonic anhydrase (<i>A. thaliana</i>)						28166	5.11	68.73

Número Standard Spot (SSP), señalado con (*) las proteínas sobreexpresadas en todos los tratamientos. En negritas las proteínas que incrementaron en deficiencia de fósforo, y subrayadas las proteínas que disminuyeron en deficiencia de fósforo. PM Peso Molecular en Dalton (Da); pI Punto isoeléctrico en unidades de pH. Cobertura por ciento (%) de secuencia esperada al comparar péptidos contra base de datos.

La banda correspondiente a la cadena larga de RuBisCO (Figura 8 G0WXW0_ARATH) se encuentra en apariencia sobre representada en *ATPPA4CFP^{35::S}*, sin embargo es difícil determinar la validez de este dato debido a la saturación y poca resolución de dicha banda. RuBisCO es la enzima responsable de la fijación de dióxido de carbono en el ciclo de Calvin. En la figura 9 se observa la mancha identificada como subunidad pequeña 3B de RuBisCO, cuyos cambios en abundancia no parecen corresponderse con lo observado para la cadena larga.

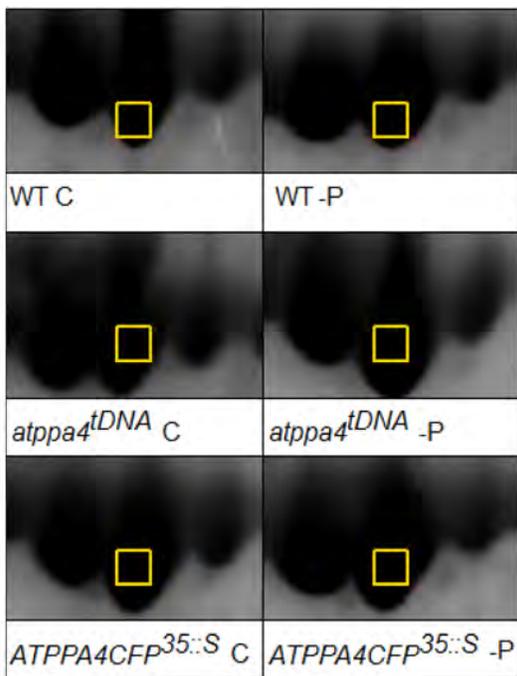


Figura 8. RuBisCO cadena larga

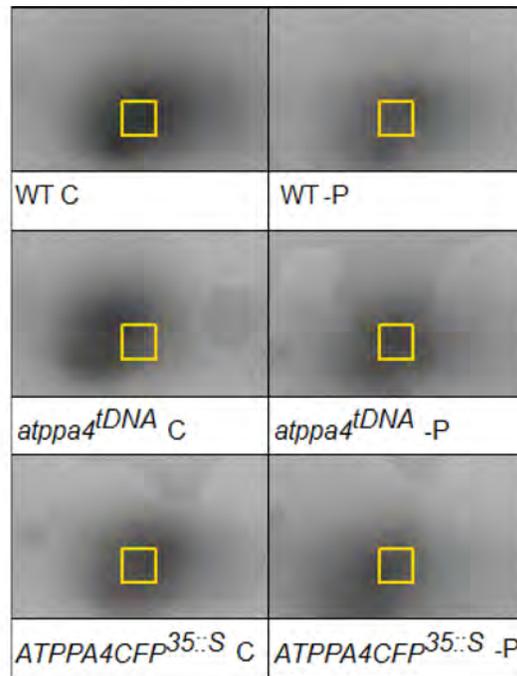


Figura 9. RuBisCO subunidad pequeña 3B

En la figura 10 se muestra a la banda de la proteína Oxygen evolving enhancer 33, que cataliza la oxidación del agua a oxígeno molecular en fotosistema II (PS II), para la cual se observó un aumento en deficiencia de fósforo para **WT** y

atppa4^{tDNA} , no así para *ATPPA4CFP^{35::S}*. Tanto *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* presentan mayor abundancia de esta misma proteína, respecto a **WT** aún en condiciones control.

En la figura 11 se muestra a la mancha identificada como PSII Q (A0A178UX57_ARATH), una proteína predicha por su secuencia que probablemente forma parte del Oxygen Evolving Complex al que también pertenece Oxygen evolving enhancer 33, la abundancia de esta proteína parece disminuir en estrés para la planta **WT** y aumentar para las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}*.



Figura 10. Oxygen evolving enhancer 33

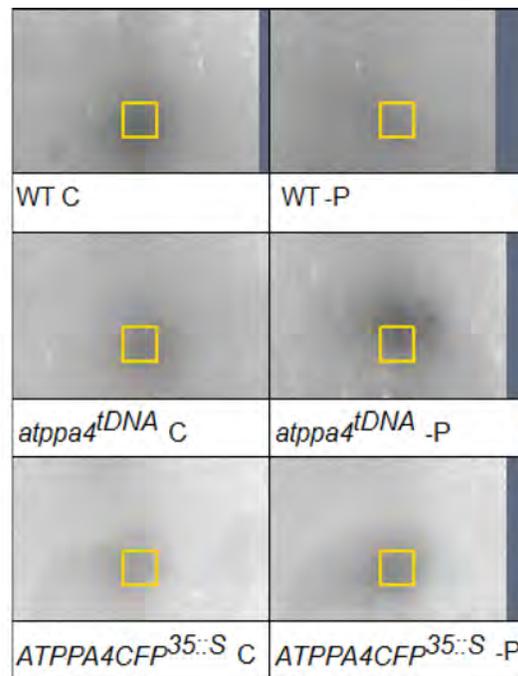


Figura 11. PSII Q

La figura 12 muestra la señal de la proteína Cpn21 (También conocida como Cpn20), una co-chaperona de Cpn60, que se sabe además participa de la

activación de la superóxido dismutasa de hierro (FeSOD) de forma independiente a su actividad co-chaperona en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* (Kuo *et al.*, 2013a), favoreciendo la unión del cofactor hierro para la formación de la holoenzima (Kuo *et al.*, 2013b). Cpn21 se observó con aumento en deficiencia de fósforo excepto para *atppa4^{tDNA}*, la abundancia de la proteína se muestra mayor en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* aún en condiciones control, esto sugiere una mayor activación de la FeSOD, lo que es de esperarse en plantas bajo estrés oxidativo.

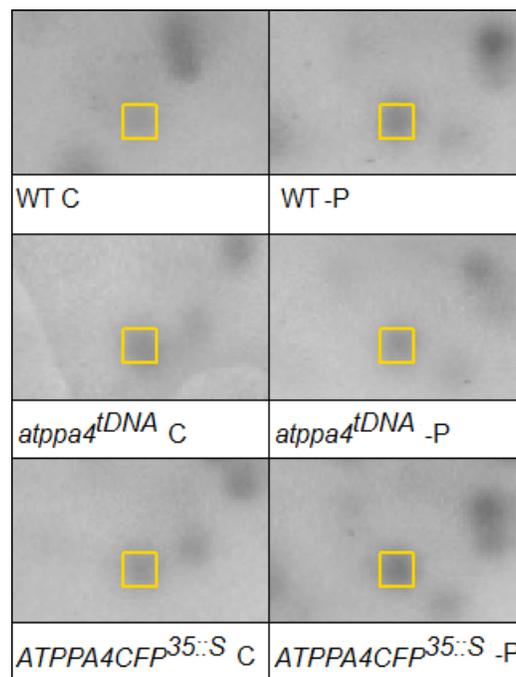


Figura 12. Cpn21

En la tabla 5 se muestran los cambios en abundancia relativa de proteínas de la raíz comparando los tratamientos contra **WT** en condiciones control, en rojo se resaltan disminuciones bajo un factor de 0.5 y en verde las que aumentaron sobre un factor de 2, en blanco señalados los cambios no significativos.

Tabla 5. Abundancia relativa de proteína de la raíz en geles 2D, para las plantas **WT**, *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP35::S* en condiciones control (C) y bajo estrés por deficiencia de fósforo (-P), valores con respecto a **WT C** (valor arbitrario de 1). En rojo se resaltan disminuciones bajo un factor de 0.5 y en verde los incrementos sobre un factor de 2. En blanco los valores que no mostraron diferencias significativas.

SSP	WT -P	atppa4tDNA C	atppa4tDNA -P	ATPPA4CFP35::S C	ATPPA4CFP35::S -P
4203	2.34	2.67	2.61	1.81	1.22
5203	1.62	2.46	2.36	0.76	2.76
7001	0.47	24.76	32.54	1.65	0.22
9002	8.79	0	1.37	0.03	0.14
602	0.19	0.38	0.34	0.1	0.16
1302	1.06	1.06	1.25	0.06	0.97
<u>1602</u>	0.65	1.43	1.29	0.54	0.07
3401	0.22	0.45	0.51	0.44	0.49
4703	0.37	0.5	0.56	0.62	0.17
5003	1.24	0.96	0.26	1.72	0.73
7201	0.85	0.47	0.88	0.5	0.9
7401	1.09	0.46	0.59	0.72	0.8
7501	1.59	0.22	0.27	0.31	0.23
<u>9404</u>	0.48	0.41	0.27	0.28	0.19
9405	0.74	0.31	0.69	0.34	0.36
9701	1.2	0.24	0.33	0.35	0.12
<u>9801</u>	0.29	0.37	0.15	0.42	0.24
9802	1.21	0.49	0.17	0.75	0.33
3201	1.12	0.64	0.72	0.79	0.52
4103	0.9	0.52	0.81	0.84	1.05
4202	1.15	0.89	1.02	0.83	0.93
4704	0.83	1.27	0.74	0.77	1.35
5201	0.61	0.53	1.1	0.74	1.18
5701	1.32	0.77	1.1	1.3	0.54
6102	1	0.91	1.05	0.77	0.86
7101	1.08	1.17	0.9	1.55	1.45
7402	0.64	0.7	0.5	0.6	0.89
8202	1.68	0.68	0.73	0.72	0.69

Número Standard Spot (SSP), señalado con negritas las proteínas que incrementaron en deficiencia de fósforo, y subrayadas las proteínas que disminuyeron en deficiencia de fósforo.

En la tabla 6 se presentan los resultados de la identificación por MS de algunas de las proteínas seleccionadas a partir de los geles 2D de raíz, se obtuvieron algunos porcentajes de cobertura de secuencia bajos, lo que disminuye la confiabilidad de la identificación realizada.

Tabla 6. Identificación de proteínas recuperadas de geles 2D de raíz. En color verde las proteínas que mostraron aumento sobre un factor de 2 y en rojo aquellas que disminuyeron bajo 0.5 con respecto a **WT** C; En blanco los valores que no mostraron diferencias significativas (Ver tabla 5). Los recuadros coloreados muestran los tratamientos a) **WT** -P; b) *atppa4*^{1DNA} C; c) *atppa4*^{1DNA} -P; d) *ATPPA4CFP*^{35::S} C; y e) *ATPPA4CFP*^{35::S} -P.

SSP	Identidad	a	b	c	d	e	PM (Da)	pI (pH)	Cobertura (%)
5003	Superoxide dismutase [Fe] (<i>A. thaliana</i>)						21084	6.18	16.67
3401	PYK10 binding protein 1 (<i>A. thaliana</i>)						32138	5.36	82.55
9701	Beta glucosidase 23 (<i>A. thaliana</i>)						59682	6.46	45.42
9802	Beta glucosidase 23 (<i>A. thaliana</i>)						59682	6.46	30.34
7001	Phosphinothricin N-acetyltransferase (BASTA-resistance)						20637	6.06	51.40
9002	Osmotin-like protein OSM34 precursor (<i>A. thaliana</i>)						26632	6.43	26.60
7401	Fructose bisphosphate aldolase (<i>A. thaliana</i>)						38515	6.02	65.64
9404	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>A. thaliana</i>)						31571	6.36	63.57
9405	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>A. thaliana</i>)						36890	6.79	64.79
9801	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (<i>A. lyrata</i>)						42493	7.74	42.93
5201	GSTU19 (<i>A. thaliana</i>)						25634	5.68	43.38
7101	GST F8 (<i>A. thaliana</i>)						19729	5.22	54.80
5701	Bifunctional enolase 2 transcriptional activator (<i>A. thaliana</i>)						47689	5.42	54.50
7402	Malate dehydrogenase cytoplasmic 1 (<i>A. thaliana</i>)						35548	6.10	60.24

Número Standard Spot (SSP), señalado con negritas las proteínas que incrementaron en deficiencia de fósforo, y subrayadas las proteínas que disminuyeron en deficiencia de fósforo.

PM Peso Molecular en Dalton (Da); pI Punto isoeléctrico en unidades de pH. Cobertura por ciento (%) de secuencia esperada al comparar péptidos contra base de datos.

En la figura 13 se muestra a la mancha identificada como superóxido dismutasa de hierro (FeSOD), la cuál es una enzima de respuesta a estrés oxidativo encargada de destruir a los radicales superóxido y es activada por la proteína Cpn21 (ver figura 12). Se observó que la abundancia relativa de esta enzima disminuye en deficiencia de fósforo en las líneas *atppa4*^{1DNA} y *ATPPA4CFP*^{35::S}

pero aumenta para la **WT**; esto aunado a la mayor abundancia de Cpn21 en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* sugiere una respuesta alterada al estrés oxidativo. La baja cobertura de secuencia para la identificación por MS puede deberse a una baja recuperación de proteína en los extractos de raíz.

En la figura 14 se observa la presencia de la señal correspondiente a fosfinotricina N-acetiltransferasa, dicha proteína corresponde al marcador de selección que confiere la resistencia al herbicida BASTA (glufosinato de amonio) a las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}*, sin embargo sólo fue detectada en *atppa4^{tDNA}* en condiciones control y de deficiencia de fósforo; es posible que la proteína no fuera detectable en *ATPPA4CFP^{35::S}* debido a la baja cantidad de proteína usada para los geles de raíz, y, posiblemente, ésta proteína se traduce además en niveles muy inferiores en dicha planta, respecto a *atppa4^{tDNA}*, lo que podría explicar el fenotipo de tamaño reducido de la línea *ATPPA4CFP^{35::S}* respecto *atppa4^{tDNA}* durante la germinación en medio selectivo (no se muestra).

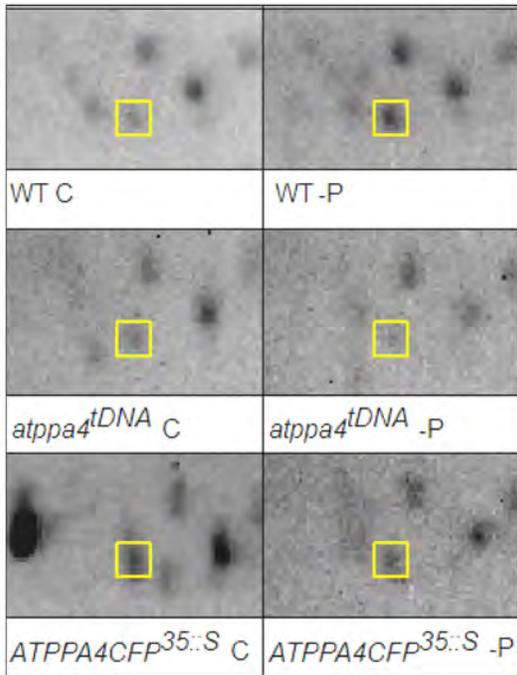


Figura 13. Superóxido dismutasa

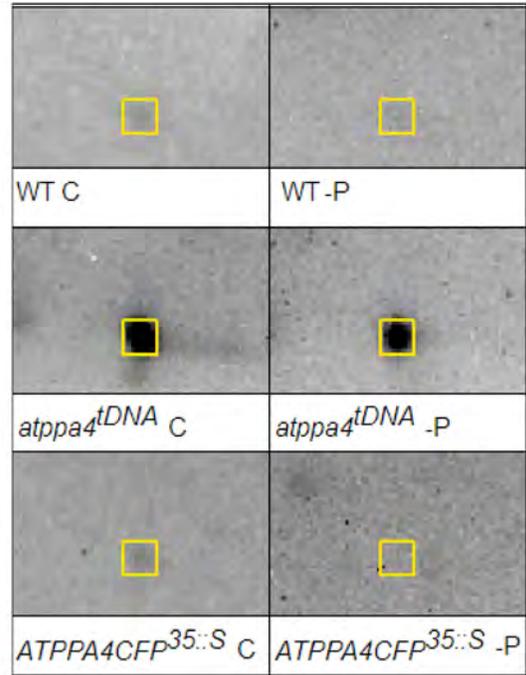


Figura 14. Fosfinotricina N-acetiltransferasa

En la figura 15 se muestra la banda que corresponde a PYK10 binding protein 1 (PBP1) es una enzima que podría regular la correcta polimerización de PYK10 durante la reparación de tejido dañado en raíz. PYK10, cuya señal se muestra en las figuras 16 y 17, también conocida como Beta Glucosidasa 23 (BGLU23), forma polímeros insolubles activos cuando se asocia a PBP1 en respuesta a daño en raíz (Nagano *et al.*, 2005), interesantemente PBP1 parece incrementar su abundancia en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* en respuesta a estrés, contrario a lo que se observó en la línea **WT**, sin embargo, es de destacar que dichos niveles son inferiores a lo observado en condiciones control en **WT**. PYK10/BGLU23 aumenta su abundancia en deficiencia de fósforo en la línea **WT**, pero disminuye en respuesta a dicho estrés en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}*, es posible que las plantas transformadas presenten dicha

disminución debido a la formación de los complejos insolubles característicos de esta proteína, lo que indica que su respuesta se encuentra alterada respecto a **WT**.

La figura 18 muestra la mancha identificada como OSM34, que es una proteína que se ha reportado asociada en respuesta a estrés salino (Jiang *et al.*, 2007) y su abundancia relativa se observó en incremento en deficiencia de fósforo para todas las líneas de *Arabidopsis thaliana* aquí estudiadas, sin embargo sus niveles se encontraron abatidos para las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* respecto a **WT**.

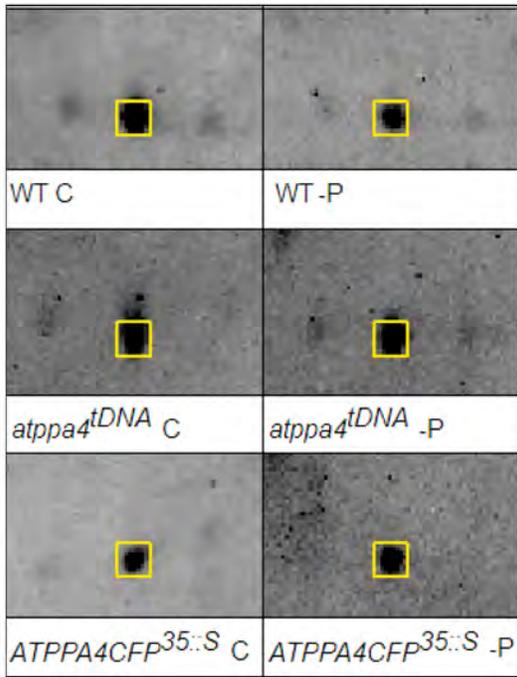


Figura 15. PYK10 binding protein 1

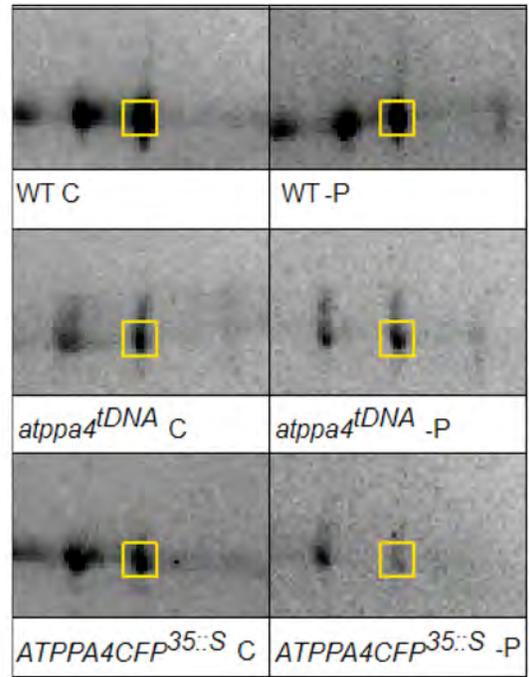


Figura 16. PYK10/BGLU23

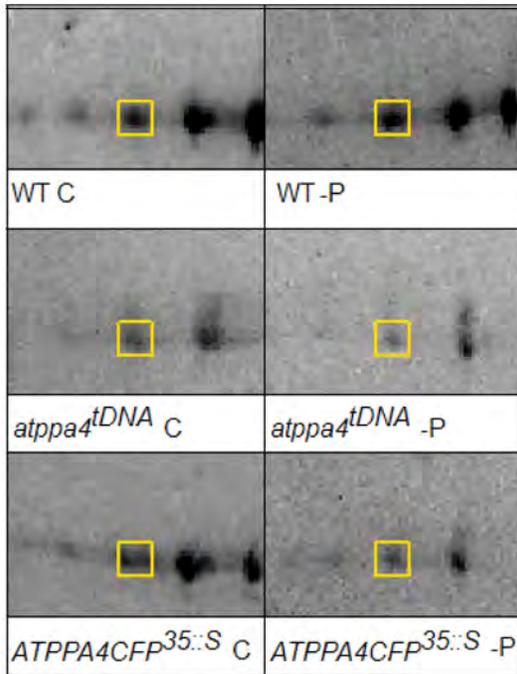


Figura 17. PYK10/BGLU23

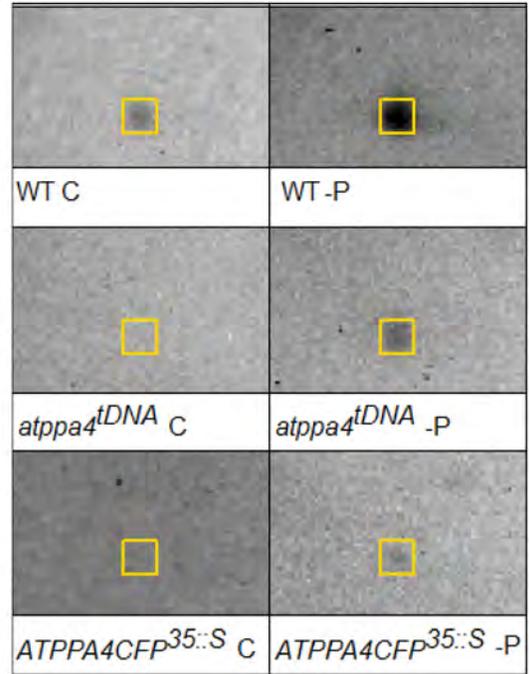


Figura 18. Osmotin-like protein OSM34

La fructosa bifosfato aldolasa (ALFC8_ARATH), cuya señal se muestra en la figura 19, es una enzima clave en la glucólisis, encargada de transformar a la fructosa-1,6-bifosfato en dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato; su abundancia relativa no cambia significativamente en deficiencia de fósforo, sin embargo esta enzima se ve sub representada en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* respecto a **WT**.

En las figuras 20 a 22 se observan las manchas identificadas como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (A0A178VKK2_ARATH, A0A178W4Q5_ARATH y D7LR77_ARALL respectivamente), esta enzima se encarga de la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato. La abundancia de esta proteína se vio disminuida en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* respecto a **WT**.

En otros reportes en plantas transgénicas con un metabolismo alterado de PPI, se han observado cambios en el crecimiento probablemente debidos a cambios en el metabolismo de carbohidratos (Farré *et al.*, 2001; Farré *et al.*, 2006), de modo que la observación de cambios en enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos podría contribuir a explicar las observaciones previas.

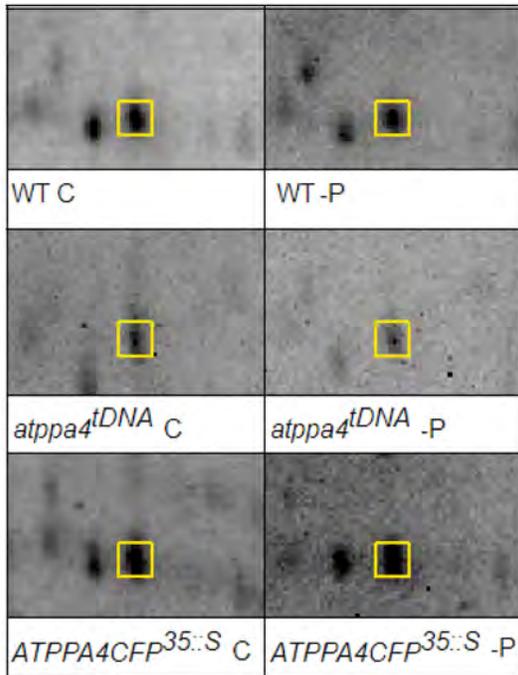


Figura 19. Fructosa bifosfato aldolasa

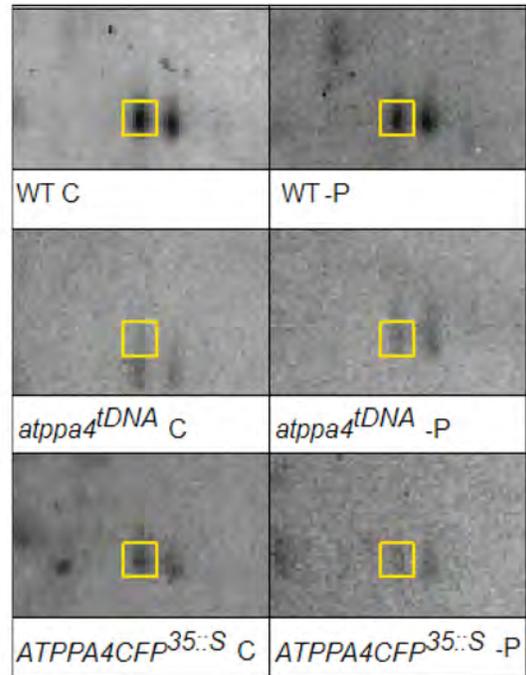


Figura 20. Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

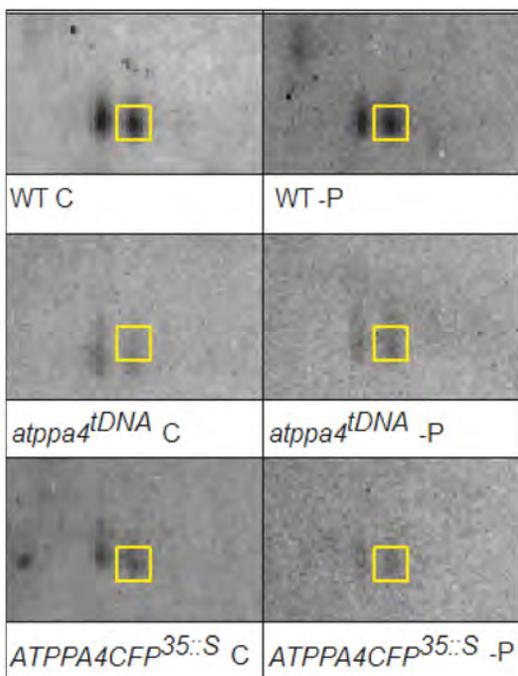


Figura 21. Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

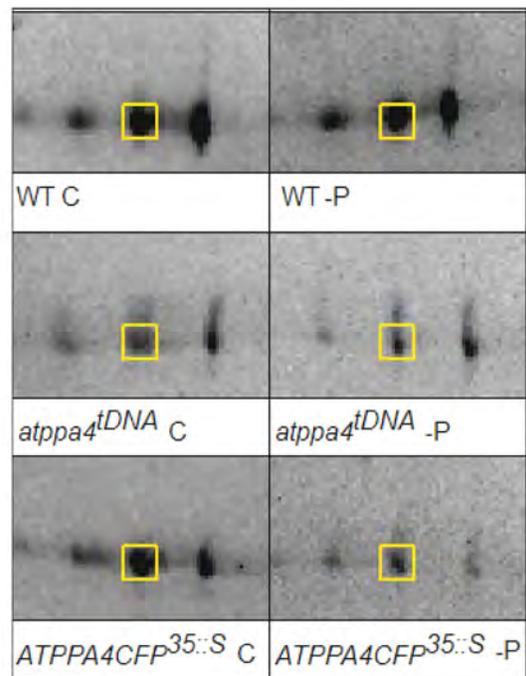


Figura 22. Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

7. Discusión de resultados

Durante el análisis proteómico de plantas *atppa4^{TDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* con respecto a **WT** sometidas a estrés por deficiencia fósforo se observaron cambios primordialmente en 3 grupos de proteínas:

1) enzimas relacionadas a fotosíntesis, 2) enzimas involucradas en respuesta a estrés oxidativo y de defensa (respuesta a daño en raíz y estrés osmótico), y 3) enzimas de metabolismo de carbohidratos; las modificaciones en estos grupos de enzimas se ha reportado, previamente, que están relacionadas con la respuesta de la planta a diferentes tipos de estrés; dichas respuestas involucran la inhibición del crecimiento y también de una disminución en el proceso fotosintético en las plantas, ya que su metabolismo celular se redirige a la biosíntesis de compuestos con efecto protector. Dado que el proceso de adaptación al estrés se asocia a síntesis *de novo* de dichos compuestos, los requerimientos energéticos de la planta incrementan (Kosová *et al.*, 2011). Además se ha observado con anterioridad que las plantas que pueden mantener ritmos fotosintéticos y de asimilación de carbono aumentados presentan mayor tolerancia a estrés abiótico (Askari *et al.*, 2006; Tuomainen *et al.*, 2006).

Considerando lo anterior, los cambios observados en diferentes enzimas en deficiencia de fósforo, como el incremento considerable de la Oxygen evolving enhancer 33, y RuBisCO (cadena larga), además del incremento modesto de la

abundancia en esta misma condición de la enzima PSII Q para las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}*, podrían ser indicio de una actividad fotosintética incrementada; sin embargo, es necesario realizar pruebas como medición en peso seco y asimilación de CO₂ para determinar si este es el caso. El reducido tamaño de la planta *ATPPA4CFP^{35::S}*, su escaso peso fresco y la sobreexpresión de estas enzimas, sugieren que podría existir daño en el aparato fotosintético de la planta, sin embargo en pruebas realizadas sobre fotosistema II no se detectaron daños (Gutiérrez-Luna, datos no publicados); es posible entonces que esta línea en particular presente un aparato fotosintético más denso pero no necesariamente más activo, otra posibilidad es que la línea *ATPPA4CFP^{35::S}* presente únicamente retardo en su crecimiento sin que necesariamente su reducido tamaño y el cambio en abundancia de proteínas refleje un daño auténtico.

Por otra parte, la respuesta a distintos tipos de estrés comparte características como la acumulación de enzimas degradadoras de especies reactivas de oxígeno, compuestos con actividad antioxidante y chaperonas involucradas en plegamiento de proteínas, además aumenta la actividad en dichas vías metabólicas, lo que origina la acumulación de compuestos osmóticamente activos. (Kosová *et al.*, 2011). Sería de esperar, en consecuencia, que enzimas como FeSOD y Cpn21 se acumularan en deficiencia de fósforo, lo cual fue observado en plantas WT, sin embargo FeSOD abate sus niveles en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* en respuesta a dicho estrés; y aunado al hecho que Cpn21 se encuentra muy sobre-

representada en dichas líneas, es muy probable que tengan un mecanismo alterado de respuesta a estrés oxidativo, que en el caso de la línea *atppa4^{tDNA}* parece atribuirle una mayor tolerancia con respecto a las líneas **WT** y *ATPPA4CFP^{35::S}*. Adicionalmente el incremento en deficiencia de fósforo de la proteína Osm34 podría reflejar una adaptación de las plantas ante la acumulación de compuestos con actividad osmótica, sin embargo, aunque las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* mostraron el mismo comportamiento que **WT**, sus niveles se encontraron muy abatidos respecto a **WT**, lo que podría indicar una mejor eficiencia frente a la formación de dichas especies al menos para la línea *atppa4^{tDNA}*, ya que se observa fenotípicamente menos afectada.

En lo que refiere a PBP1 y PYK10/BGLU23, estas proteínas presentaron una disminución en su abundancia en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* con respecto a **WT**, lo que podría deberse a la formación de los complejos insolubles mencionados con anterioridad, que han sido caracterizados como respuesta a daño mecánico en raíz. Es posible que esto refleje una adaptación favorable para la planta *atppa4^{tDNA}*, la cual se observó menos afectada en deficiencia de fósforo, y que podría estar involucrada con el rediseño de la arquitectura radicular; sin embargo el reducido tamaño del sistema radicular en la línea *ATPPA4CFP^{35::S}* podría indicar algún tipo de daño en la regulación de crecimiento en la raíz. Esto se refuerza observando los fenotipos de las raíces sometidas a deficiencia de fósforo, que aunque presentan respuestas similares en cuanto a la formación de

pelos radiculares y un aumento general en la profusión y penetrancia (ver figura 6), muestran diferencias importantes en su apariencia y en el peso fresco de las fracciones radiculares.

También se ha propuesto que las plantas bajo condiciones de estrés tienden a disminuir sus niveles del metabolismo energético para conservar energía y limitar la generación de especies reactivas de oxígeno (Møller, 2001). Reforzando lo anterior, en otros estudios en plantas sometidas a estrés abiótico se detectaron disminuciones a nivel de transcrito y de proteína de componentes de la glucólisis, como fructosa bifosfato aldolasa y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, entre otras (Jiang & Deyholos, 2006; Jiang *et al.*, 2007).

En el presente estudio, la fructosa bifosfato aldolasa mostró una expresión abatida en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* con respecto a **WT**, sin embargo no se observaron diferencias en respuesta a deficiencia de fósforo; adicionalmente la abundancia de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa si se vio disminuida en respuesta a estrés en prácticamente todos los casos, lo que es consistente con reportes previos, además dicha enzima se ve subrepresentada en las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}* con respecto a **WT**, lo que sugiere un metabolismo de carbohidratos alterado.

Cabe destacar que en reportes anteriores se ha observado la sobreexpresión a nivel de transcrito y de proteína de la AtPPa4 en respuesta a deficiencia de fósforo en raíces de arabidopsis, lo que sugiere su importancia en la adaptación a este tipo de estrés (Lan, *et al.*, 2012; Hoehenwarter *et al.*, 2016); sin embargo en el presente estudio no fue posible detectar esta proteína, seguramente por la escasa cantidad de proteína total empleada para la elaboración de los geles de raíz. Es de hacer notar la imposibilidad de obtener progenie de las mutantes *atppa4^{tDNA}* más allá de la F1, lo que aunado al marcado retraso en el crecimiento de las transgénicas *ATPPA4CFP^{35::S}* sugiere que la AtPPa4 requiere de una regulación muy precisa, y que tiene una importancia mayor en el metabolismo de arabidopsis.

Es notorio que la respuesta frente a la deficiencia de fósforo no es equivalente entre las distintas líneas analizadas, incluso los niveles de proteína en condiciones control muestran algunas diferencias importantes, de modo que la información obtenida en el presente trabajo permite afirmar que la hipótesis inicial es correcta. También se logró reforzar la evidencia sobre la función adicional de las PPiasas en el metabolismo, los datos sugieren una alteración metabólica de carbohidratos, de especies reactivas de oxígeno y posiblemente de la asimilación de carbono como efecto de la mutación y de la transformación con un transgen. Además se proporcionó más evidencia sobre el posible papel de las PPiasas en la respuesta a estrés en plantas, y en particular a la deficiencia de fósforo; sin embargo, se desconoce aun si esta regulación es directa; y por lo tanto, el mecanismo exacto por el cual podría suceder lo anterior aun debe ser determinado.

8. Conclusiones

- La expresión alterada de la AtPPa4 converge en la modificación de la expresión de proteínas de estrés oxidativo, metabolismo de carbohidratos y de defensa. Sin embargo dichas modificaciones no son equivalentes entre las líneas *atppa4^{tDNA}* y *ATPPA4CFP^{35::S}*.
- Es probable que la AtPPa4 participe de la regulación de las vías antes mencionadas, no obstante, se desconoce si dicha regulación es directa.
- La evidencia obtenida sugiere que la AtPPa4 tiene un papel importante en la respuesta a deficiencia de fósforo.

9. Perspectivas

Será necesario confirmar la identidad de las proteínas observadas mediante secuenciación para validar los datos arrojados por MS. Es deseable también determinar los niveles de los transcritos correspondientes mediante ensayos de RNAseq y PCR tiempo real para determinar si los cambios aparentes en abundancia de proteína reflejan cambios a nivel de expresión. Realizar mediciones de actividad de enzimas glucolíticas y de estrés oxidativo sobre plantas tratadas permitirá determinar si estos metabolismos se encuentran alterados. En el caso particular de la línea transgénica *ATPPA4CFP^{35::S}* aun debe determinarse si existe sobreexpresión de la proteína AtPPa4 y deben generarse otras líneas transformantes con dicha construcción y realizar el análisis de su respuesta a deficiencia de fósforo, para descartar que los cambios observados en este estudio sean imputables como efecto de la posición del inserto en el genoma de la planta.

10. Referencias

- Alonso M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn, P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom M., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C.C., Ecker J. R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(September): 653–657.
- Abelson PH (1999) A potential phosphate crisis. *Science* 283(5410):2015.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M., & Salekdeh, G. H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics* 6(8): 2542–2554.
- Baltscheffsky M., Schultz A., & Baltscheffsky H. (1999). H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: A tightly membrane-bound family. *FEBS Letters* 452(3): 121-127.
- Behrendt H. & Boekhold A. (1993). Phosphorus saturation in soils and groundwaters. *Land Degradation & Development* 4(4):233--243.
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gorg A., Westermeier R., & Postel W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and*

Biophysical Methods 6(April): 317–339.

- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., & Righetti P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333.
- Chen J, Brevet A, Fromant M, Lévêque F, Schmitter JM, Blanquet S, & Plateau P (1990) Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 172(10):5686-5689.
- Chi A & Kemp RG (2000) The primordial high energy compound: ATP or inorganic pyrophosphate? *Journal of Biological Chemistry* 275(46):35677-35679.
- Clayton H, Ranson J, & Rees T (1993) Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and fructose 2,6-bisphosphate in the bundle sheath of maize leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301(1):151-157.
- Cooperman B.S., Baykov A.A., Lahti R. (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase, *Trends in Biochemical Sciences* 17: 262–266.
- Dancer J, Veith R, Feil R, Komor E, & Stitt M (1990) Independent changes of inorganic pyrophosphate and the AT/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Science* 66(1):59 - 63.
- De Villafranca Casas M.J. (2010). Tesis de Licenciatura. Alteraciones en la

expresión génica de mutantes de *Arabidopsis thaliana* como resultado de la deficiencia en una pirofosfatasa inorgánica soluble. FQ-UNAM.

- Du Jardin P., Rojas-Beltran J., Gebhardt C., & Brasseur R. (1995). Molecular cloning and characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase in potato. *Plant Physiology*, 109(3): 853-860.
- Duff SM , Moorhead GB , Lefebvre DD , & Plaxton WC (1989) Phosphate starvation Inducible bypasses of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology* 90(4):1275-1278.
- Epstein E. & Bloom A.J., (2004) Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, *Sinauer Associates*, Sunderland, MA, USA.
- Fang Z.Y., Shao C., Meng Y.J., Wu P., Chen M. (2009). Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. *Plant Science* 176: 170–180.
- Farré, E.M., Bachmann, A., Willmitzer, L., Trethewey, R.N. (2001). Acceleration of potato tuber sprouting by the expression of a bacterial pyrophosphatase, *Nature Biotechnology* 19: 268–272.
- Farré EM , Tech S , Trethewey RN , Fernie AR , & Willmitzer L (2006) Subcellular pyrophosphate metabolism in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Molecular Biology* 62(1-2):165-179.
- Ferjani A , Segami S , Horiguchi G , Muto Y , Maeshima M , & Tsukaya H (2011) Keep an eye on PPi: the vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase regulates postgerminative development in Arabidopsis. *Plant Cell*

23(8):2895-2908.

- Filippelli GM (2008) The Global Phosphorus Cycle: Past, Present, and Future. *ELEMENTS* 4(2):89-95.
- Gaxiola R.A., Edwards M., & Elser J.J. (2011). A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. *Chemosphere* 84(6): 840-845.
- Geigenberger P , Lerchi J , Stitt M , & Sonnewald U (1996). Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant, Cell & Environment* 19(1):43-55.
- George GM , van der Merwe MJ , Nunes-Nesi A , Bauer R , Fernie AR , Kossmann J , & Lloyd JR (2010) Virus-induced gene silencing of plastidial soluble inorganic pyrophosphatase impairs essential leaf anabolic pathways and reduces drought stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* 154(1):55-66.
- Gilbert N (2009) Environment: The disappearing nutrient. *Nature* 461(7265):716-718.
- Gutiérrez-Luna, M. F., Navarro De La Sancha, E., Valencia-Turcotte, L. G., Vázquez-Santana, S., & Rodríguez-Sotres, R. (2016). Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family I isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 253: 229–242.

- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19: 1720–1730.
- Hajirezaei M , Sonnewald U , Viola R , Carlisle S , Dennis D , & Stitt M (1993) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* 192:16-30.
- Halvin J., Beaton J.D., Tisdale S.L., Nelson W.L., (2005). Soil Fertility and Fertilizers. *Pearson Education, Inc.*, Upper Saddle River, New Jersey.
- Hays J. B. (2002). *Arabidopsis thaliana* , a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair*, 1, 579–600.
- Hernández-Domíguez E.E., Valencia-Turcotte L.G., & Rodríguez-Sotres R. (2012). Changes in expression of soluble inorganic pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under phosphate starvation. *Plant Science* 187, 39-48.
- Hoehenwarter, W., Mönchgesang, S., Neumann, S., Majovsky, P., Abel, S., & Müller, J. (2016). Comparative expression profiling reveals a role of the root apoplast in local phosphate response. *BMC Plant Biology*, 16(106): 1-21.
- Igamberdiev AU & Kleczkowski LA (2011). Magnesium and cell energetics in plants under anoxia. *Biochemical Journal* 437(3):373-379.
- Islam M , Miyoshi T , Yamada M , & Tsuji Na (2005) Pyrophosphatase of the

roundworm *Ascaris suum* plays an essential role in the worm's molting and development. *Infection and Immunity* 73:1995-2004.

- Jiang Y-Q., & Deyholos M.K. (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biology* 6(25):1-20.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., & Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany.*, 58(13), 3591–3607.
- Jones R.L., Buchanan B.B., and Gruissem W. (2012). Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Kondracka A & Rychter AM (1997) The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. *Journal of Experimental Botany* 48(7):1461-1468.
- Kornberg A. (1962). On the metabolic significance of phosphorylic and pyrophosphorylic reactions, in: M. Kasha, B. Pullman (Eds.), Horizons in Biochemistry, Academic Press, New York.
- Kosová K., Vítámvás P., Tom I., & Renaut J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8): 1301–1322.
- Kreps J.A., Wu Y., Chang H., Zhu T., Wang X., Harper J.F. (2002).

Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129–2141.

- Kuo, W. Y., Huang, C. H., Liu, A. C., Cheng, C. P., Li, S. H., Chang, W. C., Weiss, C., Azem, A., Jinn, T. L. (2013a). CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis chloroplasts. *New Phytologist* 197: 99–110.
- Kuo, W., Huang, C., & Jinn, T. (2013b). Chaperonin 20 might be an iron chaperone for superoxide dismutase in activating iron superoxide dismutase (FeSOD). *Plant Signaling & Behavior*, 8(2): e23074.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lamesch P , Berardini TZ , Li D , Swarbreck D , Wilks C , Sasidharan R , Muller R , Dreher K , Alexander DL , Garcia-Hernandez M , Karthikeyan AS , Lee CH , Nelson WD , Ploetz L , Singh S , Wensel A , & Huala E (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research* 40(Database issue):D1202-D1210.
- Lan, P., Li, W., & Schmidt, W. (2012). Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient Arabidopsis roots reveals multiple levels of gene regulation. *Molecular & Cellular Proteomics* 11: 1156–1166.
- Le Roux MR , Ward CL , Botha FC , & Valentine AJ (2006) Routes of

pyruvate synthesis in phosphorus-deficient lupin roots and nodules. *New Phytologist* 169(2):399-408.

- Lin W.Y., Lin S.I., Chiou T.J. (2009). Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *Journal of Experimental Botany* 60: 1427–1438.
- Lundin M , Baltscheffsky H , & Ronne H (1991) Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry* 266(19):12168-12172.
- Mahajan S., & Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444(2): 139-158.
- Mansurova S.E. (1989). Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 977: 237–247.
- Meyerowitz E.M. (1989). Arabidopsis, a useful weed. *Cell* 56(2): 263-269.
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress : Electron Transport , NADPH Turnover , and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561–591.
- Mooney B.P., Miernyk J.A., Greenlief C.M., Thelen J.J. (2006). Using quantitative proteomics of Arabidopsis roots and leaves to predict metabolic activity. *Physiologia Plantarum* 128: 237–250.
- Navarro-De la Sancha E., Coello-Coutiño M.P., Valencia-Turcotte L.G., Hernández-Domínguez E.E., Trejo-Yepes G., Rodríguez-Sotres R. (2007).

Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 172(4): 796–807.

- Nelson D.L., and Cox M.M. (2009). *Lehninger principles of biochemistry*. New York, N.Y.: Freeman.
- Nilsson L., Müller R., Nielsen T.H. (2010). Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiologia Plantarum* 139: 129–143.
- O'Farrell P.H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250(10): 4007-4021.
- Perales Baños L.R. (2008). Tesis de Licenciatura. Caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* y su respuesta a condiciones de estrés. FQ-UNAM.
- Plaxton W. C. (2010). Metabolic flexibility helps plants to survive stress, IN: *Plant Physiology* (online). Ch. 11 pp. e11.1, Lincoln Taiz. and Eduardo Zeiger. , Eds.Sinauer.
- Plaxton W. C., & Tran, H. T. (2011). Update on Metabolic Adaptations: Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. *Plant Physiology* 156(July): 1006–1015.
- Raghothama K.G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665–693.
- Raghothama K.G. (2000). Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 182–187.

- Raghothama K.G., & Karthikeyan A.S. (2004). Phosphate acquisition. *Plant and Soil* 274: 37–49.
- Rizhong Z., Cuifang D., Xiaoyuan L., Weimin T., & Zhiyi N. (2009). Vacuolar-type inorganic pyrophosphatase located on the rubber particle in the latex is an essential enzyme in regulation of the rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* 176: 602–607.
- Rychter AM & Randall DD (1994) The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiologia Plantarum* 91(3):383-388.
- Schulze S., Mant A., Kossmann J., Lloyd J.R., (2004). Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts, *FEBS Letters* 565: 101–105.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279–292.
- Sivula T., Salminen A., Parfenyev A.N., Pohjanjoki P., Goldman A., Cooperman B.S., Baykov A.A., Lahti R., (1999). Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters* 454: 75–80.
- Somerville C., and Koornneef M. (2002). A fortunate choice: the history of

Arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3(11): 883-889.

- Sterner R.W., and Elser J.J. (2002). *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Stitt M. (1998). Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Botanica Acta* 167–175.
- Sweetlove LJ , Burrell MM , & Rees T (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADP-glucose pyrophosphorylase. *Biochemical Journal* 320 (2):493-498.
- Taylor N.L., Tan Y., Jacoby R.P., & Millar A.H. (2008). Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *Journal of Proteomics* 72(3): 367–378.
- Thaker TM , Tanabe M , Fowler ML , Preininger AM , Ingram-Smith C , Smith KS , & Iverson TM (2012) Crystal structures of acetate kinases from the eukaryotic pathogens *Entamoeba histolytica* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Structural Biology* 181(2):185-189.
- Tian Q., Stepaniants S.B., Mao M., Weng L., Feetham, M.C., Doyle M.J., Yi E.C., Dai H., Thorsson V., Eng J., Goodlett D., Berger J.P., Gunter B., Linseley P.S., Stoughton R.B., Aebersold R., Collins S.J., Hanlon W.A., Hood L.E. (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Proteomics* 3: 960–

969.

- Ticconi C.A., & Abel S. (2004). Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends in Plant Science* 9(11): 548–555.
- Tuomainen, M. H., Nunan, N., Lehesranta, S. J., Tervahauta, A. I., Hassinen, V. H., Schat, H., Koistinen, K. M., Auriola, S., McNicol, J., Kärenlampi, S. O. (2006). Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* 6(12): 3696–3706.
- Urano K., Kurihara Y., Seki M., & Shinozaki, K. (2010). 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 13(2): 132-138.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., & Allan D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 427-447.
- Weiner H., Stitt M., Heldt H.W., (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves, *Biochimica et Biophysica Acta* 893: 13–21.
- Zeng X , Chow WS , Su L , Peng X , Peng C (2010) Protective effect of supplemental anthocyanins on Arabidopsis leaves under high light. *Physiologia Plantarum* 138: 215-225.